

Biologie

Biochemische und molekularbiologische Aspekte von Zellwand-  
abbauenden Enzymen des phytopathogenen Pilzes *Fusarium grami-  
nearum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Diplom-Biologe

Thorsten Conze

aus Schmallenberg-Dorlar

2003

---

Dekan:

Prof. Dr. A. Steinbüchel

Erster Gutachter:

Prof. Dr. M. Moerschbacher

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. R. Bock

Tag der mündlichen Prüfung:

23.07.03

Tag der Promotion:

23.07.03



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> : VON DER BEDEUTUNGSLOSIGKEIT ZUM GEFÜRCHTETEN PATHOGEN.....	3
1.2	WEIZEN UND MAIS: DIE (LAND-)WIRTSCHAFTLICH BEDEUTSAMSTEN WIRTE DES PATHOGENS.....	6
1.2.1	AUFBAU DER MONOKOTYLEN ZELLWAND.....	7
1.3	PEKTIN-ABBAUENDE ENZYME: DIE ENTWICKLUNG EINES MODELLKONZEPTS FÜR MÖGLICHE VIRULENZ- ODER PATHOGENITÄTSFAKTOREN.....	10
1.4	ZIELE DER ARBEIT.....	14
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
2.1	KULTIVIERUNG UND ERNTE DER VERWENDETEN MIKROORGANISMEN.....	17
2.1.1	<i>FUSARIUM GRAMINEARUM</i> .....	17
2.1.2	<i>ASPERGILLUS NIGER</i> .....	17
2.1.3	<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	18
2.2	ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN.....	19
2.3	MÖGLICHKEITEN DER AMPLIFIKATION VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN.....	20
2.3.1	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR).....	20
2.3.2	INVERSE PCR.....	21
2.3.3	AMPLIFIKATION DES <i>PEL2</i> -GENS.....	23
2.3.4	AMPLIFIKATION DER PROMOTOREN DER GENE.....	23
2.3.5	RT-PCR.....	23
2.3.5.1	cDNA-SYNTHESE.....	23
2.3.5.2	RT-PCR-REAKTION.....	24
2.3.6	KOLONIE-PCR.....	24
2.3.7	AGAROSE-GEL ANALYTIK.....	25
2.4	SOUTHERN ANALYTIK.....	25
2.4.1	RESTRIKTIONSVERDAU DER GENOMISCHEN DNA UND VAKUUM-BLOT.....	25
2.4.2	PRÄPARATION DER SONDE.....	26
2.4.3	HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION.....	26
2.5	PRÄPARATION VON SUBGENOMISCHEN BANKEN.....	27
2.6	VEKTORKONSTRUKTION.....	28
2.6.1	PGEMT-KLONIERUNGEN.....	29
2.6.2	PROMOTOR-GUS-KONSTRUKTION.....	29

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2.6.2.1	BEREITSTELLUNG DER PROMOTOR-GUS-KASSETTE.....	29
2.6.2.2	KONSTRUKTION DER VEKTOREN FÜR DIE TRANSFORMATION VON <i>A. NIGER</i> ....	30
2.6.3	HETEROLOGE EXPRESSION DER <i>PEL</i> -GENE.....	31
2.6.3.1	BEREITSTELLUNG DER GENE.....	31
2.6.3.2	EXPRESSIONSVEKTOR.....	31
2.6.4	PLASMID-PRÄPARATION.....	32
2.7	TRANSFORMATION.....	33
2.7.1	<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	33
2.7.1.1	HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN.....	33
2.7.1.2	ELEKTROTRANSFORMATION.....	33
2.7.2	<i>ASPERGILLUS NIGER</i> .....	34
2.7.2.1	PROTOPLASTIERUNG.....	34
2.7.2.2	TRANSFORMATION.....	35
2.7.3	UNTERSUCHUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT.....	35
2.7.3.1	VERSUCHE IN <i>E. COLI</i> .....	35
2.7.3.2	VERSUCHE IN <i>A. NIGER</i> .....	36
2.7.3.2.1	ISOLATION VON DNA / RNA.....	36
2.7.3.2.2	GUS-AKTIVITÄTSTEST.....	36
2.8	SEQUENZANALYSEN.....	37
2.9	<i>IN PLANTA</i> -UNTERSUCHUNGEN.....	37
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>39</b>
3.1	CHARAKTERISIERUNG DES PEKTAT-LYASE GENS <i>PEL1</i> , SOWIE SEINES PROMOTORS.....	39
3.1.1	SOUTHERN ANALYSEN.....	41
3.1.2	SEQUENZANALYSEN.....	43
3.1.3	STRUKTURANALYSEN.....	47
3.1.4	INDUKTION IM ZEITLICHEN VERLAUF.....	48
3.1.5	<i>IN PLANTA</i> -UNTERSUCHUNGEN.....	49
3.1.6	HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION UND ENZYMCHARAKTERISIERUNG.....	50
3.1.7	PROMOTORSTUDIEN.....	54
3.1.7.1	KONSTRUKTION DER VEKTOREN pPROMO1 UND pPROMO2.....	54
3.1.7.2	VERSUCHE IN <i>E. COLI</i> .....	54
3.1.7.3	VERSUCHE IN <i>A. NIGER</i> .....	56
3.2	PEKTAT-LYASE 2.....	58
3.2.1	SEQUENZANALYSEN.....	58
3.2.2	VERGLEICH DER SEQUENZ-ALIGNMENTS.....	61
3.2.3	STRUKTURANALYSE.....	61
3.2.4	<i>IN PLANTA</i> -UNTERSUCHUNGEN.....	62

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>4.</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>65</b>
4.1	EINORDNUNG DER PEKTINOLYTISCHEN ENZYME VON <i>F. GRAMINEARUM</i> .....	67
4.1.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE PARAMETER.....	67
4.1.2	BIOCHEMISCHE PARAMETER.....	71
4.2	<i>IN PLANTA</i> -STUDIEN.....	73
4.3	PROMOTORSTUDIEN.....	75
4.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT.....	78
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>81</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>93</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

### Abkürzungen

4-MUG	4-Methyl-Umbelliferyl-Glukuronid
$\alpha$	Alpha
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Ammoniumheptamolybdat
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	Ammoniumheptamolybdat
$T_A$	Annealing Temperatur
A. bidest	bidestilliertes Wasser
BSA	Bovine Serum Albumin
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	Calciumnitrat
cpm	counts per minute
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dTTP	DesoxyThymidintriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
DTT	Dithiothreitol
$\text{FeSO}_4$	Eisensulfat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
$^\circ\text{C}$	Grad Celsius
KCl	Kaliumchlorid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
kV	Kilovolt
$\text{CoCl}_2$	Kobaltchlorid
cDNA	komplementäre DNA
$\text{CuSO}_4$	Kupfersulfat
$\text{MgSO}_4$	Magnesiumsulfat
$\text{MnCl}_2$	Manganchlorid
$\text{MnSO}_4$	Mangansulfat
$\mu\text{Ci}$	Mikro-Curie
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
min	Minute
M	Molar
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
NaCitrat	Natriumcitrat
NaOH	Natriumhydroxid
$\text{NaNO}_3$	Natriumnitrat

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

NaPhosphat	Natriumphosphat
NaPhosphat	Natriumphosphatpuffer
Ω	Ohm
PEG	Polyethylenglykol
PCR	polymerase chain reaction
PVP	Polyvinylpyrrophosphat
%	Prozent
[ <sup>32</sup> P]	radioaktives Phosphor
RNA	Ribonucleic acid
sec	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Taq	Thermus aquaticus
<i>Taq</i> <sub>TM</sub>	<i>Thermus aquaticus</i>
UV	Trademark
Upm	Ultra-Violett
U	Umdrehungen pro Minute
V	Unit
ZnSo <sub>4</sub>	Volt
	Zinksulfat



### **1. EINLEITUNG**

„Mikroben – und nicht Makroben – regieren die Welt. Sie werden zweifellos noch dann die Erde bevölkern, wenn es uns schon lange nicht mehr gibt.“ [Dixon, B. Der Pilz, der JFK zum Präsidenten machte]. Dieses Zitat zeigt, dass selbst in unserer modernen Welt – hochtechnisiert, hochzivilisiert und mit der Neigung zur Perfektion – ein Kampf stattfindet, der lange nicht gewonnen ist, wenn er überhaupt zu gewinnen ist. Wir führen einen Krieg gegen eine mikroskopische Welt aus Viren, Bakterien und Pilzen. Und in einem gewissen Sinne auch gegen uns selbst. Im gegenseitigen Spiel von Anpassung und Überwindung suchen wir nach Möglichkeiten, auf der endgültigen Seite der Sieger zu stehen. Und damit schaffen wir uns nicht selten Probleme, die uns vor neue, vielleicht noch größere Herausforderungen stellen. Ständig müssen wir auf der Suche sein nach Anpassung, nach Überwindung dieser bedrohlichen kleinen Spezies, während wir auf der anderen Seite zur Sicherung unserer Zukunft z.B. die Erträge unserer landwirtschaftlichen Produktion in immer neue Dimensionen zu treiben suchen. Immer größer ist der Bedarf an Nahrungsmitteln, und immer breiter soll die Produktpalette sein. Glauben wir einer bedrohlichen Krankheit unsere chemischen Zähne zu zeigen, entwickeln sich Resistenzen oder tauchen neue Arten und Unterarten von Erregern auf. Und nicht selten sind wir dabei zunächst diesen vermeintlich schwächeren, und doch so ungemein listigen Kreaturen unterlegen. Je größer und monotoner unsere Produktion wird, desto besser scheinen sich auch die Chancen der pathogenen Mikrowelt zu gestalten. Immer höher werden die Dosen an Antibiotika und Pestiziden, die zur Überwindung bestimmter Krankheiten gegeben werden müssen, einige Erreger sind sogar vollständig resistent geworden, so dass ständig auch neue Wirkstoffe entwickelt werden müssen. Ein Problem, das lange nicht eingesehen wurde, mittlerweile können wir mit der Produktion neuer Wirkstoffe in vielen Bereichen des Lebens schon kaum noch mithalten. HIV, BSE und ganz aktuell SARS, sind nur drei von unzähligen Beispielen ungelöster Problematiken. Selbst in der kriegerischen Auseinandersetzung verbreiten heute nicht mehr die konventionellen Waffen den größten Schrecken. Längst haben die sogenannten Biowaffen auch hier die Nase vorn und verbreiten große Ängste vor dieser viel heimtückischeren Form eines nahezu unsichtbaren Krieges. Eine weitere Problematik gibt es aus der landwirtschaftlichen Produktion zu berichten. Ist ein neues Pflanzenschutzmittel auf dem Markt, muss im Hintergrund schon wieder fieberhaft an der Weiterentwicklung bzw. der Neuentwicklung von Substanzen und an der Erforschung neuer Ziele für

## 1. EINLEITUNG

die Pathogenbekämpfung gearbeitet werden. In einigen Pathogen/Pflanze Interaktionen tappen wir sogar noch fast völlig im Dunkeln.

Ein sehr bemerkenswerter Aspekt der mikro-molekularbiologischen Forschung liegt jedoch auch jenseits vom Schlechten. In vielen Bereichen unseres alltäglichen Lebens spielen, für uns bewusst oder unbewusst, Mikroorganismen als kleine Helfer eine große Rolle. Sei es in der Fermentation von Milchprodukten, in der Silierung von Nahrungsstoffen für Mensch und Tier, in der Sanierung von Abwässern und Böden oder bei vielen weiteren Anwendungen, deren Zahl mittlerweile die Aufzählungsgrenze weit sprengen würde. Interessant nur noch eine Tatsache: in der Nahrungsmittelindustrie werden große Anstrengungen unternommen, um gesunde Nahrungsergänzungs- oder Nahrungersatzstoffe zu finden. Und hier kommt auch, oder vielleicht sogar besonders, den Mikroorganismen eine wichtige Rolle zu. Selbst der sonst nur als Phytopathogen bekannte Pilz *Fusarium graminearum* ist seit mehr als einem Jahrzehnt in einer apathogenen Form in Großbritannien unter dem Markennamen „Quorn“ als proteinreiche Nahrungsergänzung, garantiert frei von tierischen Einflüssen, auf dem Markt. Probiotische Lebensmittel mit den verschiedensten mikrobiellen Organismen werden vermehrt zur Stärkung der menschlichen Immunkräfte angeboten. Viele weitere Anwendungen von Mikroorganismen in der Nahrungsmittelproduktion lassen sich finden.

Doch zurück zur Phytopathologie, in den Bereich der Biologie, der die Abwehr und/oder Überwindung mikrobieller Pflanzenkrankheiten untersucht. Hier siedelt das Interesse unserer Arbeiten mit *Fusarium graminearum*. Als Beispiel für ein noch lange nicht ausreichend erforschtes pilzliches System, das jedoch jährlich wiederkehrend enorme Ausfälle bei der Ernte seiner Wirtspflanzen verursacht, ist dieser Getreideschädling bekannt. Dieses Phytopathogen ist in der Lage, viele verschiedene Gräser- und Getreidearten zu befallen. Die schwerwiegenden Probleme treten dabei weltweit durch die Infektionen der landwirtschaftlich bedeutenden Kulturgetreide Mais und Weizen und deren Verseuchung mit den vom Pilz gebildeten Toxinen auf [McMullen *et al.*, 1997]. Während meiner Arbeiten habe ich mich intensiv mit diesem Pathogen befasst, auch mit der Hoffnung, mögliche Mechanismen der Virulenz und Pathogenität zu verstehen und Lösungsansätze für die Bekämpfung liefern zu können. Die exakten Ziele der Arbeit sollen später definiert werden, zunächst einleitend einige Fakten zu den Themen und dem Organismus, mit dem ich mich befasst habe.

# 1. EINLEITUNG

---

## 1.1 *FUSARIUM GRAMINEARUM*: VON DER BEDEUTUNGSLOSIGKEIT ZUM GEFÜRCHTETEN PATHOGEN

Schon seit der Domestizierung unserer heute bekannten Getreide gibt es auch deren Schädlinge, die in wechselndem Maße für eine Beeinträchtigung der erzielten Ernte sorgen. Und wie es für die Wirtspflanzen gute und schlechte Jahre gibt, so gibt es diese auch für die verschiedenen Pathogene. Klimatische Begebenheiten wie Feuchtigkeit, Temperatur usw. haben dabei eine ebenso wichtige Bedeutung, wie das Inokulum der Erreger, die eingesetzten Pestizide oder die Art der Bodenbehandlung über das ganze Jahr. Zusätzlich spielen auch noch die Fruchtfolgen über mehrere Jahre und die Arten und Sorten der ausgebrachten Pflanzen in punkto Resistenz oder Anfälligkeit gegenüber bestimmten Pathogenen für die Häufigkeit und das Vorkommen der Erreger eine große Rolle.

Auch *F. graminearum* ist als Pathogen schon lange bekannt [Burgess *et al.*, 1996; McMullen *et al.*, 1997; Stack, 1997; Stack, 1999], alleine sein Einfluss und seine Bedeutung als Erreger von Getreidekrankheiten war in den Jahren vor 1980 eher klein, besonders hier bei uns in Mitteleuropa. Die häufigsten *Fusarium*-Phytopathogene waren zu dieser Zeit auf Weizen *F. poae* und auf Mais *F. culmorum*, daneben führten Epidemien, z.B. mit *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*, zu weitaus höheren Ernteverlusten. Die Gesamtanbaufläche dieser beiden Getreide in Europa war zu dieser Zeit vergleichsweise klein. Mit Beginn der 80er Jahre stieg die mit Weizen und Mais bebaute Fläche in Europa stark an, und gleichzeitig begann auch der Siegeszug von *F. graminearum* als bedeutendes *Fusarium*-Pathogen auf diesen



**ABBILDUNG 1.1:** Symptome ausgelöst von *F. graminearum* auf Mais (A) und Weizen (B). Der Ernteverlust geht bis zum Totalausfall, was besonders durch das Befallsbild auf Mais deutlich belegt wird. Die Linke der beiden Weizen-Ähren ist mit dem Pilz infiziert, die rechte zeigt die nicht infizierte Kontrolle zum gleichen Zeitpunkt der Infektion (28 Tage nach Inokulation). Aber auch ein nur geringer Befall mit dem Pathogen kann schon gravierende Folgen haben (siehe Text). Quelle: Mais: Internet, Weizen: eigene Infektion

## 1. EINLEITUNG

Wirten. Die Anpassung an diese neue Situation gelang dem Pilz anscheinend besser als seinen Mitbewerbern um die Wirtspflanzen. Bereits zehn Jahre später hatte *F. graminearum*, *F. poae* und *F. culmorum* in der Bedeutung als Getreidepathogen auf Weizen und Mais weit überholt und gilt bis heute als einer der gefürchtetsten Erreger von Getreidekrankheiten weltweit [Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, LPB, 2000]. Zahlreiche epidemische Studien belegen die zum Teil enormen Ernteverluste, die durch den Befall mit *F. graminearum* hervorgerufen werden. Bei besonders intensiven Epidemien waren z.B. in den USA in den letzten zehn Jahren Ernteverluste von mehr als 2,6 Milliarden US-Dollar zu verzeichnen [Schisler *et al.*, 2002; McMullen *et al.*, 1997]. Berichte von Epidemien mit großen Ausmaßen gibt es mittlerweile von fast allen Kontinenten der Erde [Nganje *et al.*, 2001; Clear *et al.*, 2000; Dalcero *et al.*, 1997; Cassini, 1991; Cook, 1991 a und b; Sutton, 1982]. Bis heute gibt es auf dem Markt nur Fungizide, die das Wachstum des Pilzes auf der Pflanze hemmen oder bestenfalls eine epidemische Ausbreitung verhindern. Eine totale Kontrolle des Pilzes durch Fungizide existiert noch nicht, gebräuchliche Wirkstoffe reduzieren den Befall um etwa 50 bis maximal 60% [McMullen *et al.*, 1999]. Ebenso wenig ist eine vollständig gegen den Befall resistente Getreidesorte bekannt, bisher wurden nur partielle aktive und passive Resistenzmechanismen beschrieben. Bei den passiven Mechanismen spielen Faktoren wie eine gesteigerte Wachstumshöhe der Pflanze, die Dichte der Ährchen oder die Zeit des Beginns der Blüte eine Rolle. Fünf verschiedene aktive Resistenzmechanismen sind beschrieben, (i) Resistenz gegen den Befall, (ii) Resistenz gegen eine Ausbreitung des Pathogens, (iii) Resistenz gegen eine Ausbreitung des Befalls auf die Körner, (iv) Toleranz und (v) Resistenz gegen die Akkumulation der Phytotoxine [Bai *et al.*, 2000; Mesterhazy *et al.*, 1999; Mesterhazy, 1995; Wang und Miller, 1988; Schroeder und Christensen, 1963].

ABBILDUNG 1.1 zeigt das Erscheinungsbild, das der Pilz auf den beiden wirtschaftlich bedeutsamsten Wirtspflanzen Weizen und Mais ausprägt. Vom Befall betroffen sind bei den Pflanzen in der natürlichen Infektion ausschließlich die Blüten und damit im weiteren Verlauf die Frucht. Während das Schadensbild auf den Maiskolben von kaum ausgeprägten Symptomen über den Befall einzelner Partien des Kolbens bis hin zur totalen Auflösung des Gewebes des ganzen Maiskolbens reicht (Bild A), sind die Schäden auf Weizen auf den ersten Blick nicht ganz so dramatisch. Ohne Vergleich mit einer nicht befallenen Ähre (rechte Ähre) kann man leicht glauben, dass es sich um die reife Form des Weizens handelt. Dieses im amerikanischen als FHB (Fusarium Head Blight) bezeichnete Ausbleichen der Ähre (linke Ähre), das bereits in der frühen Phase der Infektion beginnt, verbunden mit der deutlich kleineren

## 1. EINLEITUNG

Korngröße und verschrumpelten Form der Körner infolge von weniger eingelagerten Speicherstoffen sind die Ausprägungsmerkmale auf Weizen (Bild B, eigene Aufnahme) [Tuite *et al.*, 1990; Sutton, 1982].

Die dramatischste Folge des Befalls ist jedoch visuell gar nicht einzuschätzen. Die Bildung von verschiedenen Mykotoxinen, wie z.B. die bekanntesten Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon, auf der befallenen Pflanze sind eine der verheerendsten Folgen der Infektion mit diesem Pathogen [Welling, 2002; Doyle, 2000; Trigo-Stockli *et al.*, 1998; Schuhmacher *et al.*, 1997, Bruins *et al.*, 1993]. Diese Toxine haben neben ihrer Phytotoxizität auch verschiedene Wirkungen auf Mensch und Tier und machen das Getreide für die weitere Nutzung als Futtermittel unbrauchbar [Scheinpflug *et al.*, 1998; Sweeney *et al.*, 1998]. Dabei kann schon ein vergleichsweise geringer Befall der Pflanze zu einer starken Belastung mit den Toxinen führen. Auch das Ausbringen von wachstumshemmenden Fungiziden kann die Toxinsynthese auf den befallenen Pflanzen steigern [Mielke, 1996]. Eine genauere Betrachtung des Wachstums auf der Pflanze, besonders in den ersten Stunden und Tagen der Infektion, erfolgt bei Pritsch *et al.* [2000]. Diese konnten zeigen, dass der Pilz in die Pflanze über die geöffneten Stomata einwächst, eine direkte Penetration der Kutikula unterbleibt. Anschließend wächst eine Haupthyphe zwischen Kutikula und Epidermiszellen. Ausgehend von dieser werden die Zellen der Pflanze durch sogenannte Infektionshyphen direkt penetriert und dabei letztendlich abgetötet. Ein Zyklus von der Landung einer Spore auf der Wirtspflanze bis zur Produktion neuer asexueller Sporen für die epidemische Verbreitung dauert durchschnittlich etwa 72 Stunden, der Befall der ganzen Ähre ausgehend von einer infizierten Einzelblüte ist nach wenigen Tagen erfolgt. Der Lebenszyklus des Pilzes auf seinen Wirtspflanzen, bzw. als Dauerform über den Winter, ist detailliert beschrieben [Hinze, 2000; Conze, 2000; Sutton, 1982]. Als Dauerform bildet *Fusarium* sexuelle Sporen die wahrscheinlich über mehrere Jahre im Boden keimungsfähig bleiben, teilweise erfolgt die Überwinterung auch als Mycel auf abgestorbenen Pflanzenresten. Eine neue Infektion erfolgt im Folgejahr aus diesem Inokulum. Deshalb sind der permanente Wechsel der Fruchtfolge möglichst von Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen, die intensive Bearbeitung des Bodens mit tiefem Unterpflügen der letztjährigen Pflanzenreste und damit die starke Reduktion der Ernterückstände auf den Feldern die zur Zeit wirksamsten Möglichkeiten, einen Befall mit dem Pilz im folgenden Jahr zu reduzieren [Miedaner, 2000; Miller *et al.*, 1998].

Weiterhin beschrieben sind die Kultivierungsmöglichkeiten *in vitro* [Conze, 2000] sowie die Inokulationsmöglichkeiten für *in vivo/in planta*-Untersuchungen [Pritsch *et al.*, 2001]. Die mikroklimatischen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Infektion

## 1. EINLEITUNG

der Pflanze sind ebenfalls veröffentlicht [McMullen, 2000; McMullen und Stack, 1999]. Zur Zeit der Blüte der Pflanze muss ein relativ feucht-warmes Klima mit einer Luftfeuchtigkeit von mehr als 85% und einer idealen Temperatur von  $>20^{\circ}\text{C}$  über einen Zeitraum von mehreren Tagen vorherrschen, um eine maximale Infektionsrate zu gewährleisten. Unter diesen Umständen kann bereits ein sehr kleines Inokulum zu einem sehr ausgeprägten Befallsbild führen. Weiterhin ist eine Beschreibung und Einordnung der durch den Pilz während der Infektion gebildeten Mykotoxine sehr detailliert erfolgt und kann in den angegebenen Quellen studiert werden [Doyle, 1997; Grasserbauer *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 1997; Atanassov *et al.*, 1994; Bai und Shaner, 1994; Tuite *et al.*, 1990; Miller und Wang, 1987].

### **1.2 WEIZEN UND MAIS: DIE (LAND-)WIRTSCHAFTLICH BEDEUTSAMSTEN WIRTE DES PATHOGENS**

Beschäftigt man sich mit einem phytopathogenen Pilz, so muss man sich zwangsläufig auch einige Gedanken zu den Wirten dieses Mikroorganismus machen. In meiner Betrachtung möchte ich mich auf die beiden wirtschaftlich wichtigsten Wirtspflanzen von *Fusarium graminearum*, Weizen und Mais, beschränken. Zu bedenken ist jedoch, dass es neben diesen beiden noch eine Vielzahl weiterer Gräser und Nutzgetreide gibt, die als potentielle Wirte des Pilzes in Frage kommen, die in ihrer wirtschaftlichen Bedeutung jedoch eine nicht so große Rolle spielen. Deren Rolle als Ausgangspflanzen für die Bereitstellung von neuem Inokulum darf jedoch in keinem Fall unterschätzt werden, grundsätzlich können die hier gemachten Ausführungen auch auf diese Pflanzen übertragen werden.

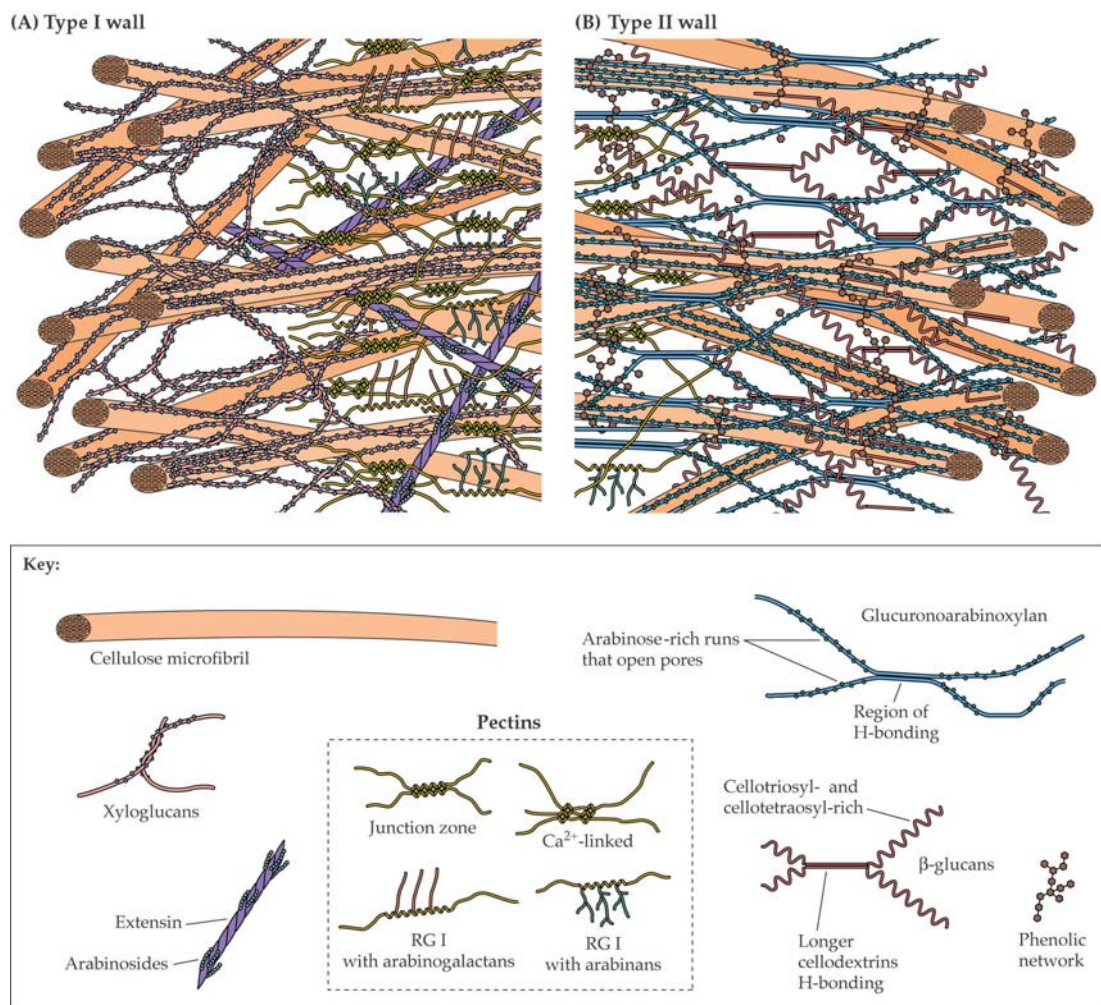
Eine eingehendere Betrachtung soll zudem der Zellwand dieser Pflanzen zuteil werden, da diese im weiteren Verlauf der Arbeit als Angriffspunkt im System Pflanze im Mittelpunkt stehen wird.

Mais, Weizen und Reis sind die weltweit am meisten angebauten Getreidearten. Auf diese drei Pflanzen entfallen über 80% der Gesamtgetreideernte pro Jahr [Quellen: FAD, USDA, ZMP EU, IGC, 2000]. Alle drei Arten gehören zu den Nutzgetreiden, taxonomisch zur Ordnung der Poales (Gräser) und zur Klasse der Einkeimblättrigen (Monokotyledones). Neben der bedeutenden Verwendung als Tierfuttermittel finden diese Getreide im Ganzen oder in Auszügen vielfältige Verwendungen als Hauptnahrungsmittel weltweit.

# 1. EINLEITUNG

## 1.2.1 AUFBAU DER MONOKOTYLEN ZELLWAND

Der Aufbau der pflanzlichen Zellwände ist eingehend studiert und beschrieben [Carpita, 1996]. Die Zellwände der Arten der Ordnung Poales unterscheiden sich grundsätzlich von denen anderer Pflanzen. Es wurden zwei Arten von pflanzlichen Zellwänden beschrieben, die mit Typ I und Typ II benannt worden sind. Bei den Zellwänden der Poales und einiger verwandter Gruppen handelt es sich um Typ II-Zellwände.



**ABBILDUNG 1.2:** Vergleich der Typ I und Typ II Zellwände der Pflanzen. Bei den Pflanzen der Ordnung Poales kommt die Typ II Zellwand vor, die sich grundsätzlich von der Typ I wand unterscheidet (siehe Text). Aus: Biochemistry and Molecular Biology of Plants, 2002.

In ABBILDUNG 1.2 sind die beiden unterschiedlichen Zellwandtypen im Vergleich dargestellt. Carpita [1996] hat einen sehr gründlichen Überblick über die Unterschiede im Aufbau der pflanzlichen Zellwände gegeben. Es wurde festgestellt, dass die Zellulose-Fibrillen in den Typ I Zellwänden hauptsächlich durch Pektine, deren

## 1. EINLEITUNG

Anteil an der Gesamttrockenmasse bei etwa 25 bis 30% liegt, und durch Hemizellulosen quervernetzt wird. Diese sind damit an der Struktur und Festigkeit der Zellwände maßgeblich beteiligt. Im weiteren spielen strukturelle Glykoproteine in den Typ I Zellwänden eine große Rolle für die Stabilität der Zellen. Glukurono-Arabino-Xylane (GAX) kommen in der Typ I Zellwand nur in sehr geringen Anteilen vor. In diesen Zellwänden sind  $\alpha$ -L-Arabinosyl-Einheiten überwiegend an der O-2 Position verestert.

Im Gegensatz dazu werden die Zellulose-Fibrillen der primären Typ II Zellwände in der Hauptsache durch Glukurono-Arabino-Xylane (GAX) und nicht-zellulosäre  $\beta$ -(1,3)- $\beta$ -(1,4)-Glukane (Zellotriosyl- und Zellotetraosyl-Einheiten) quervernetzt. Diese GAX können in den Typ II Zellwänden bis zu 50 % des Trockengewichts ausmachen, sie bestehen aus einem  $\beta$ -(1,4)-D-Xylan Grundgerüst, an das, wiederum im Gegensatz zu den Typ I Zellwänden, in O-3 Position  $\alpha$ -L-Arabinofuranosyl-Einheiten und in O-2 Position  $\alpha$ -D-Glukuronsäure-Einheiten angehängt sind. Ein weiterer Unterschied der beiden Zellwandtypen liegt darin, dass die Typ II Zellwände in der Regel nur einen vergleichsweise sehr geringen Anteil an strukturellen Glykoproteinen besitzen. Mit der Tatsache des geringen und von den anderen Pflanzen unterschiedlichen Proteingehalts in den Zellwänden und den sich daraus ergebenden Möglichkeiten einer potentiellen Bedeutung hinsichtlich von Pathogenität oder Virulenz von proteinabbauenden Enzymen von *F. graminearum* hat sich Hellweg [2003] während seiner Arbeiten auseinandergesetzt.

Die strukturelle Stabilität wird in den Typ II Zellwänden weiterhin durch einen auffallend hohen Anteil an nicht-lignifizierenden phenolischen Substanzen, in der Hauptsache Ester der Hydroxyzimt-Säure und der Ferulasäure, gewährleistet. Durch Veresterung mit diesen phenolischen Substanzen werden die GAX in der O5-Position der Arabinofuranosyl-Einheiten miteinander quervernetzt [Buchanan *et al.*, 2002; Carpita, 1996].

Gravierend ist der Unterschied bei dem Anteil der pektinartigen Stoffe, die in den Typ II Zellwänden nur etwa 5% der Gesamttrockenmasse der primären Zellwand ausmachen.

Warum die Typ II Zellwände nur einen sehr geringen Anteil an Pektin besitzen, ist nicht geklärt. Eine denkbare Theorie ist, dass im Laufe der Evolution Pektine zunehmend durch die oben genannten anderen Komponenten ersetzt wurden, und dass dieser kleine Restanteil im weiteren Evolutionsprozess weiter abnimmt. Eine andere Hypothese geht davon aus, dass die Menge an Pektinen in der Zellwand auf



## 1. EINLEITUNG

---

das absolut notwendige Minimum reduziert wurde und daher eine entscheidende Bedeutung für die Stabilität dieser Zellwände besitzt.

Im Weiteren soll kurz eine etwas eingehendere Beschreibung der Pektine in den Zellwänden erfolgen. Es werden vier verschiedene Typen innerhalb der Pektine unterschieden. Homogalakturonan (HGA) ist die einfachste Form des Pektins und besteht aus einer unverzweigten Kette sich wiederholender  $\alpha$ -(1,4)-D-Galakturonsäure-Einheiten. Des weiteren unterscheidet man Rhamnogalakturonane der Gruppen I (RG I) und II (RG II). RG I besteht aus einem Rückrat alternierender  $\alpha$ -(1,4)-D-Galakturonsäure- $\alpha$ -(1,2)-L-Rhamnose-Einheiten, die an den Sauerstoff-Atomen der Rhamnose veresterte Seitenketten in Form von  $\alpha$ - oder  $\beta$ -(1,4)- oder (1,5)-gebundenen Arabinogalaktanen, Galaktanen oder Arabinanen tragen. RG II ist eine mit vielen verschiedenen und komplexen Zuckerseitenketten verzweigte Form des HGA. Die vierte Komponente bildet das Xylogalakturonan, ebenfalls eine verzweigte Form des HGA, bei dem  $\alpha$ -D-Xylose-Einheiten in der O3-Position von fast der Hälfte der Galakturonsäure-Einheiten verestert sind. Die Komplexität des Aufbaus der verschiedenen Pektine impliziert für den enzymatischen Abbau allein dieser Zellwandkomponente die Notwendigkeit eines breiten Arsenal an verschiedenen Enzymen. Innerhalb der Typ II Zellwände sind von den Pektinen insbesondere HGA und RG I von Bedeutung, RG II kommt dagegen nur in geringen Anteilen vor, spielt aber in der Quervernetzung durch Borsäure eine entscheidende Rolle [Buchanan *et al.*, 2002].

## 1. EINLEITUNG

### **1.3 PEKTINABBAUENDE ENZYME: DIE ENTWICKLUNG EINES MODELLKONZEPTS FÜR MÖGLICHE VIRULENZ- ODER PATHOGENITÄTSFAKTOREN**

Um eine Pflanze oder eine Pflanzenzelle erobern zu können, sind für ein Pathogen mehrere Strategien denkbar. Der einfachste Weg ist, über mechanische Gewalt die Kutikula und die Zellwand der Pflanze zu durchbrechen. Einige Phytopathogene bedienen sich dieser Strategie, z.B. *Magnaporthe grisea* in der Interaktion mit Reis [Howard *et al.*, 1991]. Um den hierfür benötigten, enormen Druck aufbauen zu können, wird meistens die eigene Zellwand durch Einlagerung von sehr festen Substanzen, wie z.B. vor allem Chitin, aber auch Melanin, gestärkt. Der Druckaufbau wird über osmotisch aktive Substanzen reguliert. Meist an einer Sollbruchstelle öffnet sich die Zelle bei Erreichen des nötigen Druckes und ein Infektionskeil wird in das pflanzliche Gewebe gestoßen.

Eine aufgrund ihrer Lebensform völlig andere Strategie haben phytopathogene Viren, die zu ihrer Vermehrung nur darauf bedacht sind, ihre genetischen Informationen in die Wirtszelle einzuschleusen. Die Wirtszelle wird z.B. durch Insekten penetriert, das Virus gelangt in die Zelle.

Ein sehr elegantes System ist der Einsatz von Enzymen, die das Pathogen in die Lage versetzen, das pflanzliche Gewebe zu mazerieren und die oftmals in nur sehr geringen Mengen ausgeschieden werden. Durch diese häufig nur partielle Auflösung der Zellwandstruktur der Pflanzenzelle sind die Pathogene möglicherweise einer weniger starken Abwehrreaktion von Seiten der Pflanze ausgesetzt, als wenn einfach ganze Gewebe mechanisch oder mit anderen Mitteln zerstört werden. Biotrophe Pathogene, die auf einen lebenden Wirt angewiesen sind, bedienen sich dieser Strategie [Mendgen und Deising, 1993]. Eine größere Rolle spielt die vollständige Mazerierung der Gewebestruktur der Pflanze mit Hilfe von Enzymen bei nekrotrophen Mikroorganismen [Annis *et al.*, 1997; Cooper, 1984].

Ein wesentlicher und wichtiger Bestandteil der Zellwand von Pflanzen sind möglicherweise pektinartige Stoffe. Besonders in der Zellwand der Gräser kann den Pektinen aufgrund ihres geringen Vorkommens eine entscheidende Rolle für die Integrität und Stabilität der Zellwände zukommen. Mittlerweile sind sehr viele verschiedene phytopathogene Mikroorganismen auf das Vorhandensein von Pektinabbauenden Enzymen und deren Rolle als Pathogenitäts- oder Virulenz-Faktoren innerhalb der Pflanze-Pathogen-Interaktion untersucht worden.

Während dieser Arbeit habe ich mich mit pektinolytischen Enzymen als einer Komponente des Pektinabbaus durch *Fusarium graminearum* beschäftigt.

## 1. EINLEITUNG

Eine ganze Reihe dieser bedeutenden Phytopathogene kommt aus dem Reich der Bakterien. Das mit am besten untersuchte bakterielle System in diesem Zusammenhang ist *Erwinia*. Diese Bakteriengattung beinhaltet eine Reihe von verschiedenen Krankheitserregern auf unterschiedlichen Pflanzen. Als Modellsystem wurde vor allem *E. chrysanthemi* entwickelt. Für dieses Bakterium konnten mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden bis dato eine ganze Reihe an Pektin-abbauenden Enzymen nachgewiesen werden [Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2002]. Die biochemische, strukturelle und molekularbiologische Charakterisierung dieser Enzyme ist weit fortgeschritten. Im Falle der Pektin-abbauenden Enzyme ist eine genaue Einordnung der verschiedenen bakteriellen Lyasen und Polygalakturonasen zunächst aufgrund von Sequenzhomologien erfolgt [Heffron *et al.*, 1994; Henrissat *et al.*, 1996].

Durch Ausschalten einiger Gene, die für Pektin-abbauende Enzyme in *Erwinia chrysanthemi* codieren, wurde festgestellt, dass der Organismus dann in der Lage ist, ein zweites „Set“ an pektinolytischen Enzymen zur Mazeration des pflanzlichen Gewebes zu produzieren, auch wenn die Virulenz der Bakterien herab gesetzt war. Wahrscheinlich kann der Verlust einzelner Enzyme durch das Zusammenspiel der verbliebenen weiteren Enzyme und der Neusynthese von differenten neuen Enzymen relativ einfach kompensiert werden. Für diese Annahme spricht auch, dass Bakterien in der Regel eine sehr große Zahl an verschiedenen Enzymen für den Abbau der einzelnen Zellwandkomponenten der Pflanze besitzen [Kelemu *et al.*, 1993].

Weitere bakterielle Erreger von Pflanzenkrankheiten, die das Gewebe ihrer Wirtorganismen mit Hilfe von Enzymen mazerieren, sind unter anderem noch aus den Gattungen *Bacillus* und *Pseudomonas* bekannt [Soriano *et al.*, 2000; Henrissat *et al.*, 1995; Nikaidou *et al.*, 1993].

Im Reich der Eukaryonten sind es neben einigen Nematoden [Doyle *et al.*, 2002; Popeijus *et al.*, 2000] insbesondere die Pilze, die als phytopathogene Erreger einen hohen Stellenwert besitzen. Ähnlich wie bei den Bakterien sind bei den phytopathogenen Pilzen sehr viele Arten aus vielen verschiedenen Familien und Gattungen bekannt. Auch die Art und Weise des Befalls der Wirtspflanzen variiert ähnlich wie bei den phytopathogenen Bakterien. Der Einsatz von Gewebe-mazerierenden Enzymen spielt hier ebenfalls eine wichtige Rolle, viele verschiedene dieser Proteine sind charakterisiert [Gomez-Gomez *et al.*, 2002; Irdnum *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2001; Cano-Canchola *et al.*, 2000; Christakopoulos *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 1992]. Manche Arten, wie z.B. der Rostpilz *Puccinia graminis*, sind als biotrophe Organismen zumindest eine sehr lange Zeit während des Wachstums auf den lebenden

## 1. EINLEITUNG

---

Wirt angewiesen [Moerschbacher und Mendgen, 2000; Mendgen und Deising, 1993], sie müssen eine komplett andere Strategie haben als die nekrotrophen Pathogene, die die Pflanzenzellen während der Infektion töten und sich dann von diesem toten Gewebe ernähren und für ihre Vermehrung sorgen. Zu dieser Art von Erreger zählt auch *F. graminearum*. Weitere Beispiele für nekrotrophe Pilz-Pflanze-Interaktionen mit einem hohen Anteil an mazeriertem Gewebe sind die Systeme *Phytophthora infestans*/Kartoffel, so wie viele *Fusarium spec.* auf ihren Wirtspflanzen. Viele nicht-pathogene Pilze sind hinsichtlich ihrer Zellwand-abbauenden Enzyme ebenso untersucht worden, da eine industrielle Nutzung dieser Enzyme von hohem Interesse ist. Ein sehr gut etabliertes und untersuchtes System ist z.B. *Aspergillus niger*. Dieser u.a. biotechnologisch wichtige Pilz (z.B. als Zitronensäure-Produzent) besitzt ein ganzes Arsenal an Zellwand abbauenden Enzymen, darunter Pektin Lyasen, Pektat Lyasen, Polygalakturonasen und Pektin-Methylesterasen [Benen *et al.*, 2000; Kester *et al.*, 2000; Kusters van Someren *et al.*, 1992; Bussink *et al.*, 1992]. Viel Zeit und Arbeit ist darauf verwendet worden, diese Enzyme mit biochemischen, strukturanalytischen und molekularbiologischen Methoden genau zu charakterisieren [deVries *et al.*, 2002; Benen *et al.*, 2000; Armand *et al.*, 2000; Parenicova *et al.*, 2000 a, b; deVries *et al.*, 2000; Benen *et al.*, 1999; Vitali *et al.*, 1998].

Auch aus der Gattung *Fusarium* sind mittlerweile einige pektinolytische Enzyme und Polygalakturonasen beschrieben. Die Identifikation der lytischen Enzyme erfolgte zunächst auf genetischer Ebene. Bisher sind insgesamt fünf Pektat-Lyase identifiziert worden, davon aus *F. oxysporum* eine und vier aus *F. solani* (*peIA-D*) [DiPietro *et al.*, 1998; 1996a,b,c; Estevez *et al.*, 1996; Kollattukudy *et al.*, 1996; 1995a,b; 1992;1987]. Ebenso sind mehrere Exo- und Endopolygalakturonasen bekannt [Garcia-Maceira *et al.*, 2000; DiPietro *et al.*, 1998, 1996a, b; Guevara *et al.*, 1997].

Aufgrund der gewonnenen Sequenzdaten wurde zunächst eine Einteilung der bekannten pektinolytischen Enzyme von Bakterien und Pilzen in vier verschiedene Familien vorgenommen [Heffron *et al.*, 1994; Henrissatt *et al.*, 1996]. In Familie 1 wurden die extrazellulären Pektat Lyasen aus *Erwinia spec.*, die homolog sind zu *peIA*, D und E, eingeordnet. Familie 2 wird durch extrazelluläre Pektat-Lyase, die homolog sind zu *peIB* und C aus *Erwinia spec.*, repräsentiert. In die Familie 3 werden periplasmatische Pektat-Lyase eingeordnet, die denen aus *Yersinia pseudotuberculosis* und *E. carotovora* homolog sind. In diese drei Familien wurden zunächst nur bakterielle Lyase eingeordnet, mittlerweile sind die *Aspergillus*-Lyase aufgrund der Sequenzen in die Familie 1 eingeordnet worden. Die Gruppe 4 wird repräsentiert durch hauptsächlich pilzliche Pektat-Lyase mit vergleichsweise geringem Molekulargewicht von rund 25 kDa und nur äußerst geringen Sequenz-

## 1. EINLEITUNG

---

homologien zu den Lyasen aus den drei anderen Familien. In diese vierte Familie sind jedoch auch schon sequenzverwandte Enzyme aus Bakterien mit eingeordnet worden [Soriano *et al.*, 2000; Heffron *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 1995; Gonzalles-Candelas und Kollattukudy, 1992].

Durch weitere aktuelle Ergebnisse der Untersuchungen zu pektinolytischen Enzymen wird immer mehr deutlich, dass eine Einordnung nur aufgrund von Sequenzdaten allein nicht vorgenommen werden kann. Immer mehr pektinolytische Enzyme aus vielen verschiedenen Organismen werden entdeckt und genauer charakterisiert. Ein neues Mittel der Charakterisierung sind dabei strukturelle Untersuchungen der Proteine mit Hilfe der Röntgenkristallographie. Durch diese Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sich die Enzyme, obwohl aufgrund ihrer Sequenzen in vier verschiedene Familien einzuordnen, in ihren Strukturen sehr stark ähneln und deshalb möglicherweise eine andere Einordnung aufgrund der Funktionalität und der anzunehmenden Reaktionsmechanismen erfolgen kann. Aufgrund dieser Kriterien können zudem weitere strukturverwandte Enzyme mit in diese Protein-Gruppe zugeordnet werden [Jenkins *et al.*, 1998; Herron *et al.*, 2000]. Jenkins *et al.* [1998] haben die Strukturen von drei verschiedenen Pektat-Lyasen aus Bakterien, einer Pektin-Lyase und einer Rhamnogalakturonase aus *Aspergillus*, sowie des P22-Phagen-Tailspike-Protein (TSP) miteinander verglichen. Alle Proteine besitzen die sogenannte parallele  $\beta$ -Helix-Struktur, die zuerst bei den bakteriellen Pektat-Lyasen entdeckt wurde. Diese Proteine zeichnen sich durch strukturell wiederkehrende Coils aus, in denen jeweils drei  $\beta$ -Faltblatt-Stränge (PB1 bis PB3 genannt) zusammen mit unterbrechenden Turn-Regionen (T1 bis T3) eine parallele Anordnung bilden. Die Sequenzen der Proteine sind sehr verschieden, die strukturelle Homologie lässt jedoch auf eine divergente Entwicklung dieser Proteine ausgehend von einem oder wenigen gemeinsamen Vorfahren eher schließen, als auf eine konvergente Entwicklung vieler Proteine zu einer ähnlichen Struktur. Als Schlussfolgerung der gewonnenen Daten kommen Jenkins *et al.* [1998] zu dem Ergebnis, dass sich alle Proteine, die die oben genannte Struktur aufweisen, zu einer großen Proteinsuperfamilie zuordnen lassen, die sich aufgrund ihrer Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen zu verschiedenen Unterfamilien gruppieren lassen.

# 1. EINLEITUNG

---

## 1.4 ZIELE DER ARBEIT

Diese einleitenden Kapitel haben bewusst gemacht, um welche Komplexität sich die Fragestellungen bei der Interaktion eines Pathogens mit seiner Wirtspflanze drehen und dass es nicht einfach sein wird, diese schwierigen Systeme auch nur im Ansatz zu verstehen. Viele Modelle und Denkansätze dieser Interaktionen sind ausgearbeitet worden und eine große Zahl an Wissenschaftlern weltweit befasst sich mit diesen Problematiken.

In unserer Arbeitshypothese kommen wir zu der Annahme, dass gerade durch den geringen Anteil an Pektinen in der Zellwand der *Poales* diesen eine entscheidende Rolle bei der Stabilität und Integrität der Zellwand zukommt. Während meiner Diplomarbeit konnte durch *in vitro* Techniken und biochemische Methoden gezeigt werden, dass der Pilz mehrere Enzyme für den lytischen und hydrolytischen Abbau von Pektin besitzt. Diese Enzyme sind in Medien mit Glukose als C-Quelle nicht nachweisbar, Protein und Aktivität konnten nur in Medienüberständen gemessen werden, die mit Pektin oder Polygalakturonsäure als induktive C-Quellen und ohne Glukose versetzt waren. Erste Hinweise auf das Vorhandensein von mindestens zwei Genen, die für Pektin- oder Pektat-Lyasen kodieren, konnten ebenfalls erhalten werden [Conze, 2000].

Um an diese Ergebnisse anzuknüpfen, ist das erste Ziel dieser Arbeit die vollständige Identifizierung der genetischen Information dieser beiden und möglicher weiterer Gene, die für pektinolytische Enzyme kodieren, inklusive ihrer Promotoren. Im weiteren soll die Induktion der Enzyme *in vitro* durch Wachstum des Pilzes auf verschiedenen C-Quellen molekularbiologisch detaillierter bestimmt werden. Der Nachweis der Transkription der Gene *in planta* und damit ein erstes Indiz für die Bedeutung der Enzyme bei der Infektion der Pflanze bzw. beim Wachstum auf der Pflanze, also als mögliche Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren, soll geführt werden. Gleichzeitig sollen im Zusammenspiel mit weiteren Kollegen im Genom von *F. graminearum* Gene, die für weitere Pektin- und Zellwand-abbauende Enzyme kodieren, Polygalakturonasen, Zellulasen und Xylanasen im besonderen, identifiziert werden. Im Rahmen unserer Arbeiten ist die Existenz mindestens einer Polygalakturonase durch biochemische Methoden [Klein, 2001; Conze 2000] und durch Ansequenzierung eines aufgereinigten Proteins [Klein, 2001] bereits bewiesen worden. Diese gewonnenen Daten sollen molekulargenetisch innerhalb der Arbeitsgruppe weiter abgesichert werden.

## 1. EINLEITUNG

Des Weiteren konnte durch Bauknecht [persönliche Mitteilung] bereits gezeigt werden, dass der Pilz mehrere Endo- und Exozellulasen, sowie mindestens eine  $\beta$ -Glukosidase für den Abbau von Zellwand-gebundener Zellulose zu Glukose besitzt. Vorarbeiten im Bereich der Xylanasen sind ebenfalls durchgeführt worden.

Die Schwerpunkte im zweiten Teil dieser Arbeit sollen in der heterologen Expression der identifizierten Lyase-Gene in *A. niger* und der genauen Charakterisierung der Genprodukte hinsichtlich ihrer Substratspezifität und ihrer Fähigkeit, pflanzliche Zellwände suszeptibler und resistenter Pflanzen bzw. der aus diesen Zellwänden isolierten Pektine abzubauen, liegen. In der Zukunft sollen gegen die aufgereinigten Proteine Antikörper hergestellt werden, die ebenfalls eine weitere Charakterisierung der Situation *in planta* ermöglichen sollen und die gegebenenfalls bei initialen Versuchen als Abwehr- oder Hemmstoffe in der Pflanze eingesetzt werden können. Im weiteren Verlauf hoffen wir, ein stabiles System zur Transformation von *Fusarium graminearum* etablieren zu können, um einige Versuche im homologen System durchführen zu können. Hier ist besonders der Knock-Out der Pektat-Lyase kodierenden Gene interessant, um abzuschätzen, welche Funktion diesen Enzymen hinsichtlich Pathogenität oder Virulenz des Pilzes möglicherweise zukommt.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollen die Promotoren der Gene, die für die pektinolytischen Enzyme kodieren, eingehender untersucht werden. Da es sich bei den pektinolytischen Enzymen aus *F. graminearum* offenbar um induzierte Enzyme handelt, soll der regulatorische Mechanismus dieser Gene eingehender untersucht werden. Als erstes Ziel soll untersucht werden, ob die Promotoren durch Zugabe von Pektin oder Polygalakturonsäure als Induktor und Glukose als Repressor einfach ein- bzw. ausgeschaltet werden können. Dazu sollen die heterologen Systeme *E. coli* und *A. niger* genutzt werden, da die Transformation dieser Mikroorganismen sehr gut etabliert ist. Durch die Konstruktion geeigneter Vektoren, die das GUS-Reporter-System unter der Kontrolle der jeweiligen Promotoren besitzen, sollen die ersten Versuche durchgeführt werden.

## 1. EINLEITUNG

---



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### **2. MATERIAL UND METHODEN**

Soweit nicht anders vermerkt, wurden alle verwendeten Chemikalien über die Firma VWR International (Merck) bezogen.

#### **2.1 KULTIVIERUNG UND ERNTE DER VERWENDETEN MIKROORGANISMEN**

##### **2.1.1 *FUSARIUM GRAMINEARUM***

Die Stammhaltung des verwendeten hoch-pathogenen Stamms *F. graminearum* K59 erfolgte wie beschrieben [Conze, 2000; Pontecorvo et al., 1953]. Dieser Stamm wurde mir freundlicherweise von Frau Dr. U. Steiner von der Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die pektinolytischen Enzyme von *F. graminearum* nur in induktiven Medien, die als alternative Kohlenstoffquellen zu Glukose 0.2% Pektin (aus Zitrusfrüchten, durchschnittlicher Methylierungsgrad 93%, Sigma, Ebersbach), 0.2% Polygalakturonsäure (Sigma, Ebersbach) oder 0.2% Weizenzellwand Fragmente (aus HF-Solvolyse, [Vander, 1995]) enthalten, synthetisiert wurden [Conze, 2000]. Für die Anzucht unter induktiven Bedingungen wurden ca.  $10^6$  Sporen des Pilzes zunächst 18 Stunden lang in 20 ml CM-Medium bei 28 °C und 120 upm vorinkubiert. 5 ml dieses Ansatzes wurden am folgenden Morgen in 50 ml Induktionsmedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (Pektin, Polygalakturonsäure und Weizenzellwand-Fragmente) überführt und die Inkubation bei gleicher Temperatur und Schüttelgeschwindigkeit weitergeführt.

Die Ernte des Pilzes erfolgte wie beschrieben durch Filtration über einen Faltenfilter und anschließendes Trockensaugen des Mycels über einen Sterilfilter [Conze, 2000].

##### **2.1.2 *ASPERGILLUS NIGER***

Der für die Promotorstudien genutzte Stamm von *A. niger* (DSMZ Nr. 2466) wurde zu Stammhaltungszwecken auf Agarplatten mit dem Malzextrakt-Pepton-Medium (DSMZ-Medium 90: 30 g/l Malzextrakt, 3 g/l Soja-Pepton, pH 5.6) angeimpft. Die Inkubation erfolgte mit der Oberseite nach unten auf der Laborbank bei Raumtemperatur (RT) solange, bis die Platte nahezu komplett bewachsen war. An-

## 2. MATERIAL UND METHODEN

schließlich wurde die Platte bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Alle vier Wochen erfolgte eine Überimpfung auf eine frische Platte.

Zur Gewinnung von Sporen wurde wenig Pilzmycel von der Stammkultur entnommen und damit 300 ml CM-Medium [Pontecorvo et al., 1953] in einem 2 l-Erlenmeyer-Kolben beimpft. Die Inkubation erfolgte als Standkultur bei 30 °C solange, bis die gesamte Oberfläche des Mediums mit sporulierendem Pilzmaterial bedeckt war.

Um die Sporen zu Ernten wurde die Mycelmatte mit einer sterilen Pinzette aus dem Kolben entnommen und zu etwa gleichen Teilen in vier 50 ml-Falcon-Reaktionsgefäße überführt. Das Mycel wurde mit 10 ml Saline-Tween-Lösung (0.8% NaCl, 0.005% Tween-80) überschichtet, und drei sterile Glasmurmeln für den mechanischen Aufschluß zugegeben. Die Suspension wurde intensiv geschüttelt, eine Stunde lang mit gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und zehn Minuten lang bei 2500x g im Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand mit den Sporen wurde vorsichtig in neue Reaktionsgefäße dekantiert.

Zur Gewinnung von Pilzmaterial aus den Sporen wurde ein Minimalmedium verwendet, das für die verschiedenen Anwendungen leicht verändert wurde (2.7.2.1). Folgende Zusammensetzung war in allen verwendeten Medien auf der Grundlage des Minimalmediums identisch: Salze 6.0 g/l NaNO<sub>3</sub>, 1.5 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g/l KCl, 0.5 g/l MgSO<sub>4</sub>, 1 ml/l Vishniac Spurenelemente-Lösung [Vishniac & Santer, 1957] [10 g/l EDTA, 4.4 g/l ZnSO<sub>4</sub>, 1.0 g/l MnCl<sub>2</sub>, 0.32 g/l CoCl<sub>2</sub>, 0.32 g/l CuSO<sub>4</sub>, 0.22 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 1.47 g/l CaCl<sub>2</sub>, 1.0 g/l FeSO<sub>4</sub>]

### **2.1.3 ESCHERICHIA COLI**

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in verschiedenen Volumina Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) [Luria et al., 1960]. Die Standardkultur wurde bei 37 °C und 120 upm oder im Rotationsschüttler mit verschiedenen langen Inkubationszeiten durchgeführt. Zur Selektion positiver Transformanten wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicilin supplementiert.

Angaben bezüglich der Anzucht, Inkubation und Ernte der Organismen bei den weitergehenden Applikationen sind im Zusammenhang unter Punkt 2.7 beschrieben.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### **2.2 Isolation von Nukleinsäuren**

Zur Isolation von DNA und RNA aus den Pilzen wurde das geerntete Mycel in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in eine vorgekühlte Mörserschale gegeben. Unter Zusatz von flüssigem Stickstoff wurde das Mycel zu einem feinen Pulver zermörsert. Etwa 0.5 g des fein gemörserten Mycels wurden mit 5 ml 2x Isolationspuffer (0.6 M NaCl, 0.1 M Tris, 40 mM EDTA, 4% Sarcosyl und 1% SDS), 5 ml 10 M Harnstoff und 5 ml Phenol durch vortexen mindestens eine Minute lang gut gemischt. Zur Extraktion der Nukleinsäuren wurde das Gemisch mit 10 ml Phenol-Chloroform (1:1) versetzt und durch kräftiges Schütteln gut suspendiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation 15 Minuten lang bei 2500x g im Ausschwingrotor (Allegra™ 6KR Centrifuge, Beckmann, München). Die wässrige Phase wurde abgenommen, und die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol (2-Propanol) und Zentrifugation zwei Stunden lang bei 2500x g und 4 °C gefällt. Das erhaltene Pellet wurde in 15 ml 70%igem Ethanol 15 Minuten lang bei 2500x g und 4 °C gewaschen. Abschließend wurde das Pellet im Exsikkator zehn Minuten lang vollständig getrocknet und in 500 µl 10 mM Tris-HCl Puffer, pH 8.3, aufgenommen und für die weitere Verarbeitung bei 4 °C gelagert [Conze, 2003; siehe Anhang]. Zur Bestimmung der Konzentration der isolierten Nukleinsäuren wurden 5 µl des Isolats auf einem 1%igen Agarose Gel aufgetrennt (s. 2.3.8).

Für die weitere Isolation von reiner RNA wurde ein Teil der Nukleinsäurelösung mit DNase verdaut. Ca. 10 µg Nukleinsäureisolat wurden mit 10 µl 1 M KCl, 10 µl 30 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 und 50 U DNase (RNAse frei; Promega Life Sciences, Mannheim) versetzt und mit A. bidest auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Abbau der DNA erfolgte durch zweistündige Inkubation bei 37 °C. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem Nucleospin®-Extraction-Kit von Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) nach Vorschrift. Alternativ erfolgte die Aufreinigung durch Extraktion der Enzyme mit Phenol/Chloroform und Fällung der Nukleinsäuren mit Isopropanol (s.o.).

Ebenso wurde ein Teil der Lösung mit RNAse verdaut, um reine DNA zu erhalten. 100 µl des Isolats wurden hierzu mit 5 µl RNAse gemischt und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte wieder mit dem Nucleospin®-Extraction-Kit von Macherey und Nagel. Auch in diesem Fall erfolgte die Aufreinigung alternativ durch Extraktion der Enzyme mit Phenol-Chloroform und Fällung der Nukleinsäuren mit Isopropanol.

Alternativ erfolgte die Isolierung von DNA / RNA in kleineren Ansätzen. Dazu wurden etwa 0.1 g Frischgewicht Mycel in einem Eppendorf Reaktionsgefäß mit 300 µl

## 2. MATERIAL UND METHODEN

10 M Harnstoff und 300 µl 2x Isolationspuffer versetzt. Dazu wurden 100 µg Silica-Beads gegeben und die Zellen in der FastPrep (FP120 Bio 101, Thermo Savant, Holbrook, New York, USA) bei der Geräteeinstellung 6.0 60 Sekunden lang aufgeschlossen. Die Suspension wurde zwei Minuten lang bei voller Geschwindigkeit, 4 °C in der Tischzentrifuge (Picofuge, Heraeus, Hanau) zentrifugiert, um die durch das im Puffer verwendete Detergenz hervorgerufene Schaumbildung zu regenerieren. Zu der Suspension wurden 300 µl Phenol und 600 µl Phenol/Chloroform (1:1) gegeben und gründlich durch vortexen gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation zehn Minuten lang bei voller Geschwindigkeit und 4 °C, in der Tischzentrifuge. Die obere Phase wurde abgenommen, und die Nukleinsäuren wurden mit 0.7 Volumen Isopropanol durch Zentrifugation zwei Stunden lang bei voller Geschwindigkeit und 4 °C, gefällt. Das Nukleinsäure-Pellet wurde in 250 µl 70%igem Ethanol durch Zentrifugation 15 Minuten lang bei voller Geschwindigkeit gewaschen, anschließend im Exsikkator getrocknet und in 50 µl A. bidest oder 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8.3, aufgenommen.

### **2.3 MÖGLICHKEITEN DER AMPLIFIKATION VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN**

#### **2.3.1 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)**

Alle verwendeten Primer sind von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen worden.

Soweit nicht anders angegeben, sind für die PCR Reaktionen mit folgendem Standardreaktionsansatz angesetzt worden:

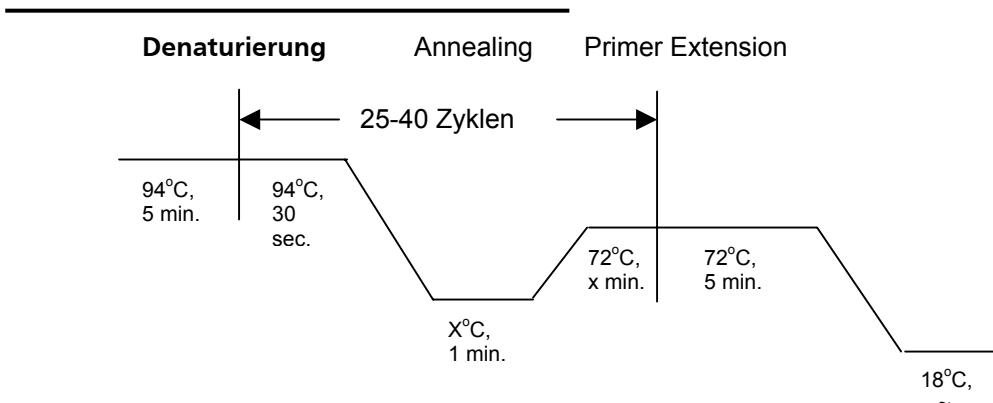
- 1.0 µl (~100 ng) Template-DNA oder -cDNA
- 1.0 µl (10 pmol) Primer forward
- 1.0 µl (10 pmol) Primer reverse
- 0.25 µl (5 U/µl) *Taq* DNA Polymerase (Qiagen, Hilden)
- 2.0 µl (25 mmol) dNTP-Mix (Qiagen, Hilden)
- 2.5 µl 10x *Taq* Polymerase Puffer (Qiagen, Hilden)
- 3.25 µl Q-solution (Qiagen, Hilden)
- 14.0 µl A. bidest

Die Annealing Temperaturen wurden nach der Formel  $T_A = [\text{vorgegebene Temperatur minus } 5 \text{ }^\circ\text{C}]$  eingestellt. Die von der Firma MWG Biotech vorgegebenen Schmelztemperaturen der verwendeten Primer können der Liste im Anhang entnommen werden. Je nach erwarteter Fragmentgröße wurde der Primer Extension Schritt (72 °C) angepasst, mit der Vorgabe, dass die *Taq*-Polymerase etwa 1000

## 2. MATERIAL UND METHODEN

---

Basenverbindungen pro Minute knüpft. Wenn nicht anders angegeben, sind 40 Synthese-Zyklen pro Ansatz durchgeführt worden. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Primus 96<sup>PLUS</sup> PCR Cycler (MWG Biotech AG, Ebersberg) durchgeführt. Im folgenden ist ein Verlaufsschema für die PCR-Reaktionen dargestellt:



**ABBILDUNG 2.1:** Standard-PCR-Profil, das in der Regel für alle Reaktionen genutzt wurde. Abweichungen bezüglich Temperatur und Zeit sind an den entsprechenden Stellen im Text gekennzeichnet.

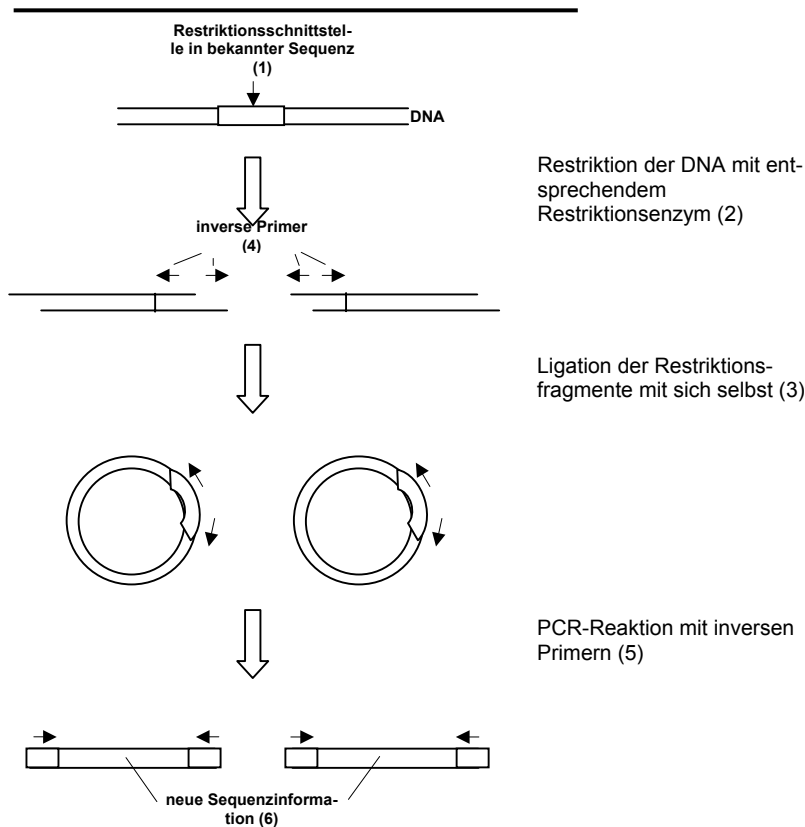
Bei einigen Reaktionen war es nötig, die optimale Annealing-Temperatur experimentell zu bestimmen. Dazu wurde die PCR in einem Gerät angesetzt, das es ermöglicht, einen Temperaturgradienten für die einzelnen Reaktionen von bis zu 20 °C einzustellen (Eppendorf Mastercycler Gradient, Eppendorf AG, Hamburg). Die PCR-Fragmente wurden zur weiteren Bearbeitung in das Plasmid pGemT ligiert (2.6.1) und in *E. coli* vermehrt (2.7.1).

### 2.3.2 INVERSE PCR [Triglia, 2000; Ochman et al., 1988; Triglia et al., 1988]

Etwa 10 µg DNA des Pilzes wurden mit je 20 Units der verschiedenen Restriktionsenzyme [*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Nde*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I (zu den Erkennungssequenzen der Enzyme siehe Anhang)] zwei Stunden lang bei 37 °C verdaut. Die Reaktionen wurden durch Auftragen auf ein 1%iges Agarose-Gel überprüft. Die Aufreinigung der verdauten DNA-Proben erfolgte mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kits von Macherey und Nagel nach den Angaben im Benutzerhandbuch. Die aufgereinigten Fragmente wurden mit sich selbst zu ringförmigen Elementen ligiert. Dazu wurde ein Ligationsansatz mit stark verdünnter Konzentration der verdauten DNA angesetzt. Zu der aufgereinigten DNA (50 µl)

## 2. MATERIAL UND METHODEN

wurden 50 µl des zehnfach verdünnten Reaktionspuffers, 10 µl T4-DNA-Ligase, 50 µl 10 mM ATP zugegeben und der Reaktionsansatz mit A. bidest auf 500 µl aufgefüllt. Die Inkubation wurde 18 Stunden lang bei 4 °C im Kühlschrank durchgeführt. Am folgenden Tag wurden die ligierten Fragmente mit 0.7 Volumen Isopropanol gefällt. Der Ansatz wurde zwei Stunden lang bei 13.000x g zentrifugiert und das DNA-Pellet anschließend in 70%igem Ethanol durch Zentrifugation 15 Minuten lang bei 13.000x g gewaschen. Nach dem Abgießen des Ethanols wurde das Pellet im Exsikkator vollständig getrocknet und in 25 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, aufgenommen. Die so präparierte DNA konnte in die PCR-Reaktionen wie unter 2.3.1 beschrieben eingesetzt werden. ABBILDUNG 2.2 zeigt schematisch den Verlauf der Inversen PCR.



**ABBILDUNG 2.2:** Schematische Darstellung der Inversen PCR. Innerhalb der genomischen DNA ist ein Sequenzabschnitt bekannt, in dem eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym liegt (1). Mit diesem Restriktionsenzym wurde die DNA verdaut (2), die entstandenen Produkte werden mit sich selbst ligiert (3). In der bekannten Sequenz werden Primer abgeleitet, die in 3'- und 5'-Richtung aus der Sequenz heraus gerichtet sind (4). Mit diesen inversen Primern wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt (5), die Amplikons mit neuer Sequenzinformation (6) liefern.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### **2.3.3 AMPLIFIKATION DES *PEL2*-GENS**

Anhand eines computergestützten Sequenz-Alignments (2.8) der Sequenzen *pelC* und *pelD* aus *Fusarium solani* wurde ein degenerierter Primer [*pel2uni*: ATGG C(CT)TGCCTCGG(AC)TACAC] abgeleitet, um das 5'-Ende des Gens zu amplifizieren. Als reverse Primer wurde der für die ursprünglich während der Diplomarbeit zur Amplifizierung der ersten Fragmente der *pel*-Gene gewählte Primer *pelR1-1* [TG(GAT)CCGTAGTTGG(CT)GTT(AG)A(CT)GCC] eingesetzt. Zusätzlich wurde ein weiterer degenerierter Primer aus den Sequenzen *pelC* und *pelD* aus *F. solani* abgeleitet, der in diesen Sequenzen ca. 100 bp vor dem Ende des Gens bindet [*peklyslIrev* (CCGTAGTTGGA(T/C)GTTGATGCC)]. Die PCR-Reaktionen wurden mit 40 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C durchgeführt. Die Primerverlängerung bei 72 °C wurde pro Zyklus zwei Minuten lang durchgeführt. Zur Amplifizierung des 3'-Endes wurde eine Inverse PCR (2.3.3) mit den Primern *pel2inv3'* (CGCCAACATCATCGGTGGTG) und *pelinvrev* (GCCCGTGTATCCGAG GCAC) bei einer Annealingtemperatur von 55 °C mit 40 Zyklen durchgeführt. Die Zweitstrangsynthese bei 72 °C wurde pro Zyklus zwei Minuten lang durchgeführt.

### **2.3.4 AMPLIFIKATION DER PROMOTOREN DER GENE**

Mit Hilfe der Inversen PCR-Technik sollten ebenfalls die Promotoren der beiden *pel*-Gene amplifiziert werden. Ausgehend von der genomischen Sequenz wurden dazu wiederum Primer abgeleitet, die an den 5'- und 3'-Enden der Gene in revers-komplementärer Ausrichtung binden. Mit diesen Primern wurde eine PCR-Reaktion mit 40 Zyklen und den mit sich selbst ligierten Fragmenten aus den DNA-Verdaus (2.3.2) angesetzt. Nachdem die Sequenz der Promotoren bekannt war, wurde mit Hilfe von homologen Primern eine PCR durchgeführt, um die Sequenz erneut zu bestätigen. Für die Untersuchungen der Promotoraktivität wurden zwei verschiedenen lange Fragmente amplifiziert, Fragment 1 hat eine Länge von etwa 300 bp, Fragment 2 eine Länge von etwa 750 bp.

### **2.3.5 RT-PCR**

#### **2.3.5.1 cDNA-SYNTHESE**

Zur Analyse der Expression der *pel*-Gene in *Fusarium* musste die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurden folgende Ansätze pipettiert. Etwa 1 µg

## 2. MATERIAL UND METHODEN

der DNA-freien RNA wurden mit 1 µl (0.1 mmol) oligo d(T)-Primer versetzt, fünf Minuten lang bei 94 °C inkubiert und dann auf der Laborbank 15 Minuten lang abgekühlt. Zu diesem Gemisch wurden 3 µl des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers, 25 U MMLV-Reverse Transkriptase (Promega Life Sciences, Mannheim), 2 µl dNTP-Lösung (je 25 mM), 3 µl 0.1M DTT zugesetzt und mit A. bi-dest auf 30 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation eine Stunde lang bei 37 °C, anschließend wurde das Enzym 15 Minuten lang bei 75 °C denaturiert. Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit dem Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kits von Macherey und Nagel nach Vorschrift des Benutzerhandbuchs.

### **2.3.5.2 RT-PCR-REAKTION**

Die auf diese Weise präparierte cDNA konnte als Template in die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Zur Amplifizierung des *pe1*-Gens wurde die Primer *pe1cDNAuni* (ATGAAGTACGCCACTATCCTCG) und *pe1cDNArev* (TTAGCAGGTCTTGGTCGC ACC) eingesetzt. Diese Primer wurden aus der genomischen Sequenz des *pe1*-Gens abgeleitet.

Für den Nachweis des *pe2*-Gens dienten die Primer *pe2cDNAuni* (ATGCACGCTC CCAGCCTTATC) und *pe2cDNArev* (CTAGCACTTGCTGGCCTTGG), die aus der genomischen Sequenz des zweiten Pektat-Lyase Gens von *Fusarium* abgeleitet wurden.

Die weiteren Reaktionskomponenten wurden in den unter Punkt 2.3.1 beschriebenen Mengen eingesetzt. Die Reaktionen wurde mit 40 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 60 °C durchgeführt. Die Primerverlängerung bei 72 °C erfolgte jeweils 1.5 Minuten lang.

### **2.3.6 KOLONIE-PCR**

Die Kolonie-PCR konnte zur Überprüfung der Transformation von *E. coli* eingesetzt werden. Mit M13-Primern, deren komplementäre Bindungsstellen in pUC-basierten Vektoren jeweils rechts und links von der multiplen-Klonierungsstelle lokalisiert sind, wurde die PCR bei einer Annealingtemperatur von 50 °C durchgeführt. Die Zyklenzahl der Reaktion wurde auf 25 Zyklen festgesetzt. Der Primer-Extension-Schritt wurde der zu erwartenden Länge des Produktes angepasst, wiederum mit der Annahme, das die *Taq*-Polymerase etwa 1 kb pro Minute synthetisiert. Anstelle von 1 µl Template DNA wurden einige Bakterienzellen in die Reaktion eingesetzt, die



## 2. MATERIAL UND METHODEN

durch den ersten Denaturierungsschritt bei 94 °C im Polymerase-Reaktionspuffer lysiert wurden. Dadurch wurde die DNA der Zellen freigesetzt. Die weiteren Reaktionskomponenten wurde in den unter Punkt 2.3.1 beschriebenen Mengen eingesetzt.

### **2.3.7 AGAROSE-GEL ANALYTIK**

Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte auf 1%igen Agarose Mini-Gelen. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8.5) gelöst und in vorgefertigte Gel-Schiffchen gegossen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V etwa 20 Minuten lang. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe von Ethidiumbromid, das in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-6}\%$  in die Gele einpolymerisiert wurde.

Sollten Fragmente im Größenbereich unter 500 bp aufgetrennt werden, sind die Gele mit 2% Agarose gegossen worden.

### **2.4 SOUTHERN ANALYTIK**

#### **2.4.1 RESTRIKTIONSVERDAU DER GENOMISCHEN DNA UND VAKUUM-BLOT**

DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen [*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Nde*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I (zu den Erkennungssequenzen der Enzyme siehe Anhang)] verdaut. Je Ansatz wurden 10 µg DNA mit 20 U des Restriktionsenzym zwei Stunden lang bei 37 °C, [Ausnahme: *Sma*I (25 °C)] inkubiert. Jeder Ansatz enthielt zusätzlich 2 µl des für das Restriktionsenzym spezifischen, zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers und A. bidest bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl. Direkt im Anschluß an die Inkubation erfolgte ein zehminütiger Denaturierungsschritt bei 75 °C und anschließender sofortiger Abkühlung der Proben auf Eis.

Die so behandelten Proben wurden zur Auftrennung auf ein großes 1%iges Agarose Gel aufgetragen und etwa 15 cm weit bei einer Spannung von 80 V aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA 30 Minuten lang in Denaturierungslösung (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) basisch denaturiert, danach wurde das Gel durch Inkubation 30 Minuten lang in Neutralisationslösung (1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 8.0) neutralisiert. Die Übertragung der jetzt einzelsträngigen DNA auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) erfolgte per Vakuumblot (BioRad Vacuum Blotter 785, BioRad Life Science, München) mit 10x SSC-Blotting Puffer (150

## 2. MATERIAL UND METHODEN

mM NaCitrat, 1.5 M NaCl) bei einem Unterdruck von 25 psi 90 Minuten lang. Die Fixierung der DNA an die Membran erfolgte durch UV-Cross-Linkage (BioRad GS Gene Cross Linker, BioRad Life Science, München) mit dem Programm C1 (50 mJoule).

### **2.4.2 PRÄPARATION DER SONDE**

Zur Ableitung einer Sonde für die Southern Blot Analysen wurde eine PCR mit den Primern *Pe/F1-1* [TGGTGGGCCGA(CT)GTCTG(CT)GAGGA(CT)GC] und *Pe/R1-1* [TG(GAT)CCGTAGTTGG(CT)GTT(AG)A(CT)GCC] bei einer Annealingtemperatur von 60 °C mit 40 Zyklen durchgeführt. Die Aufreinigung des PCR Fragments erfolgte durch Auftrennung auf einem 1%igen Agarose Gel, Extraktion der Bande und Elution der DNA mit dem Nucleospin<sup>®</sup>-Extraktion-Kit von Macherey und Nagel.

Das radioaktive Markieren der Sonde erfolgte mit dem Ready-Prime-Labeling-Kit (Amersham Biosciences Europe, Freiburg) nach Vorschrift. Dazu wurden 25 bis 50 ng der Sonde in einem Gesamtvolumen von 45 µl 10 mM Tris-Puffer, pH 8.3 verdünnt, zehn Minuten lang bei 100 °C denaturiert und auf Eis 15 Minuten lang abgekühlt. Die denaturierte Sonde wurde in das vorbereitete Reaktionsgefäß überführt. Vorgelegt im Reaktionstube war in gefriergetrockneter Form eine gepufferte Lösung von dATP, dGTP und dTTP, Klenow-Enzym und Random Primer. Dazu wurden 5 µl (50 µCi) des radioaktiven Nukleotids  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham Biosciences Europe, Freiburg) pipettiert und die Lösung gut gemischt. Die Reaktion wurde durch einstündige Inkubation bei 37 °C durchgeführt. Abschließend wurden die Sonden mittels Größenausschlußchromatographie mit Hilfe von selbstgeossenen Sephadex G25 Säulen aufgereinigt. Dazu wurde das gesamte Volumen der Markierungsreaktion auf eine 1ml Säule aufgetragen und mit 1 ml Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA) unter ständiger Kontrolle mit einem Coulter-Counter eluiert. Die radioaktive Fraktion wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Vor der Applikation auf die Membran wurde die fertige Sonde erneut durch zehnmünütige Inkubation bei 100 °C und anschließender Abkühlung 15 Minuten lang auf Eis denaturiert.

### **2.4.3 HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION**

Die Nylon-Membran mit der gebundenen DNA wurde eine Stunde lang in Vorhybridisierungslösung [10 ml Formamid, 5 ml 20x SSC, 1.6 ml 100x Denhards-Lösung

## 2. MATERIAL UND METHODEN

(2% BSA, 2% Ficoll, 2% PVP), 1 ml 1 M NaPhosphat-Puffer, pH 6.5, 100 µl 20% SDS, 100 mg denaturierte Heringssperma DNA] bei 42 °C inkubiert. Nach Austausch der Lösung und Zugabe der radioaktiv markierten und denaturierten Sonde wurde die Membran über Nacht (16-18 Stunden lang) bei 42 °C hybridisiert.

Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und die Membran einmal kurz bei Raumtemperatur mit Waschpuffer 1 (2x SSC, 0.1% SDS) gewaschen. Es folgte ein weiterer Waschschrift zehn Minuten lang mit Waschpuffer 1 bei 60 °C. Abschließend wurde die Membran mit dem stringenteren Waschpuffer 2 (0.2x SSC, 0.1% SDS) solange bei 60 °C gewaschen, bis mit dem Counter nur noch ca. 25 cpm gemessen werden konnten.

Zur Detektion der Signale wurde die Membran zwei Stunden lang auf eine Imaging Platte (BAS-MP, Fuji Photo Film Co., Ltd, Japan) gelegt und in einer BAS Kasette 2040 (Fuji Photo Film Co., Ltd, Japan) im Dunkeln inkubiert. Die Platte wurde im BAS-Reader durch einen Laserstrahl abgetastet und die Signale direkt an einen angeschlossenen PC übertragen und dort gespeichert.

### **2.5 PRÄPARATION VON SUBGENOMISCHEN BÄNKEN**

In einem zweiten Ansatz wurde die mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III und *Xba*I geschnittene DNA ebenfalls auf einem 1%igen Agarose Gel aufgetrennt. Die Größenbereiche der verdauten Proben, bei denen in der Southern-Analyse ein Signal detektiert werden konnte, wurden aus dem Gel mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kits von Macherey und Nagel eluiert und aufgereinigt.

Der Vektor pBluescript II KS (Stratagene, Amsterdam, NL; Vektorkarte siehe Anhang) wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Dazu wurde 1 µg des Vektors mit 10 Units des jeweiligen Enzyms und 2 µl des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers versetzt und das Reaktionsvolumen mit A. bidest auf 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte zwei Stunden lang bei 37 °C, anschließend wurden die Enzyme 15 Minuten lang bei 75 °C denaturiert und die Lösung direkt auf Eis abgekühlt. Zur Abspaltung der 5'-Phosphatgruppen an den überhängenden Enden des linearisierten Vektors wurde das Enzym SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase; Promega Life Sciences, Mannheim) eingesetzt. Zu dem Restriktionsansätzen wurden 3 µl des zehnfach konzentrierten SAP-Puffers und 2 µl SAP zugesetzt. Mit A. bidest wurde das Reaktionsvolumen auf 50 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde eine Stunde lang bei 37 °C durchgeführt, anschließend wurde der Vektor über ein

## 2. MATERIAL UND METHODEN

1%iges Agarose-Gel mit dem Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kit von Macherey und Nagel aufgereinigt und in die Ligationsreaktion eingesetzt.

Zur Ligation der DNA-Restriktionsfragmente wurden 100 ng des restringierten Vektors mit DNA in einem molaren Verhältnis von ungefähr 1:3 zusammengebracht. Zu diesem Ansatz wurden 1 µl T4-DNA-Ligase, 1 µl des zehnfach konzentrierten Ligationspuffers und 1 µl 10 mM ATP pipettiert und das Reaktionsvolumen mit A. bidest auf 10 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte 24 Stunden lang bei 4 °C.

Mit den durch die Ligationsreaktion entstandenen Vektoren wurde eine Elektrotransformation von *E. coli* durchgeführt (2.7.1). Der Transformationsansatz wurde jeweils zu einem Viertel auf vier 25x 25 cm große Agarplatten mit LB-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicilin, ausplattiert und über Nacht mit der Oberseite nach unten bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten wurden pro subgenomischer Bank etwa 10.000 Kolonien einzeln mit Hilfe eines Roboters (Beckman FLA, Beckman Instruments GmbH, München) in 384-Well-Platten überführt. Jedes Well war mit 60 µl LB-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicilin, gefüllt. Die Inkubation der Platte wurde über Nacht mit der Oberseite nach unten bei 37 °C durchgeführt.

Nachfolgend wurden die Einzelkolonien aus den Platten mit Hilfe eines weiteren Roboters (Genetix Q-Pix) auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham Biosciences Europe, Freiburg) überführt. Diese Membranen liegen mit der Unterseite auf LB-Amp-Medium, die Bakterien wurden erneut über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Die Kolonien von je vier Platten wurden auf eine Nylon-Membran überführt.

Am folgenden Tag wurden die Membranen mit den Bakterienkulturen von den Medien abgenommen und die Zellen basisch lysiert. Dazu wurden die Membranen auf mit Lysis-Puffer (10% SDS, 10 min lang; 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) getränkte Filterpapiere gelegt und zehn Minuten lang inkubiert. Anschließend erfolgte ein Neutralisationsreaktion (0.5 M Tris-HCl, pH 7.8, 1.5 M NaCl, 10 min lang). Die freigesetzte DNA wurde per UV-Cross-Linkage (BioRad GS Gene Cross Linker, BioRad Life Science, München) mit dem Programm C1 (50 mJoule) an die Nylon-Membran gebunden. Die so präparierten Membranen wurden wie unter Punkt 2.4.3 beschrieben hybridisiert. Positive Signale wurden mit Hilfe des BAS-Readers detektiert und mittels einer weiteren Hybridisierung verifiziert. Dazu wurde die Platte mit dem positiven Klon ein weiteres Mal auf eine Membran gespottet. Jeder Klon wurde vier Mal auf diese Membran aufgebracht.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.6 VEKTORKONSTRUKTION

Die Vermehrung der Plasmide erfolgte grundsätzlich in *E. coli*, die Selektion positiver Transformanten war möglich durch die Vermittlung der Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicilin. Die Selektion positiver Pilztransformationen erfolgte aufgrund der vermittelten Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B. Die eingesetzten Vektoren für die heterologe Überexpression der *pel*-Gene in *A. niger* besaßen keine Selektionskassette, so dass der Pilz auf normalen CM-Medium-Platten gezogen werden mußte.

#### 2.6.1 pGemT-Klonierungen

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pGemT (Promega Life Science, Mannheim) benutzt. Als Standardreaktionsansatz wurden hier 1 µl (50 ng) Vektor, 3 µl des PCR-Amplikons, 1 µl T4-DNA-Ligase und 5 µl 2x Reaktionspuffer (Rapid Ligation Buffer, 60 mM Tris/HCl, pH 7.8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% PEG-8000) vorgelegt und mindestens vier Stunden lang bei 4 °C inkubiert. Zur Vermehrung wurden die Plasmide in *E. coli* DH10b-Zellen transformiert (2.7.1).

#### 2.6.2 PROMOTOR-GUS-KONSTRUKTION

##### 2.6.2.1 BEREITSTELLUNG DER PROMOTOR-GUS-KASSETTE

Promotoren des *pel1*-Gens verschiedener Längen wurden per PCR aus dem Genom von *F. graminearum* isoliert und zunächst in pGemT kloniert. Aus den entstandenen Plasmiden konnten die Promotorfragmente als *HindIII/RcaI* Fragmente isoliert werden. Dazu wurden etwa 1 µg des Plasmids mit je 10 U der Enzyme versetzt, 2 µl des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers zugesetzt und das Reaktionsvolumen mit *A. bidest* auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die isolierten Fragmente wurden auf 1%igen Agarose-Gelen aufgetrennt, aus dem Gel isoliert und mit Hilfe des Nucleospin®-Extraction-Kit von Macherey und Nagel aufgereinigt.

Die Promotorfragmente sollten als Kontrollelemente vor das GUS-Gen, das für die β-Glukuronidase aus *E. coli* codiert, ligiert werden. Dazu wurde aus dem Plasmid pRT-104-GUS der 35S-Promotor mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NcoI*

## 2. MATERIAL UND METHODEN

durch Restriktion entfernt. Wieder wurden etwa 1 µg des Plasmids mit je 10 U der Restriktionsenzyme versetzt, 2 µl des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers zugesetzt und das Reaktionsvolumen mit *A. nidulans* auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung des restringierten Vektors erfolgte mit dem Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kit von Macherey und Nagel nach Auftrennung des Vektors auf einem 1%igen Agarose-Gel.

Die kompatiblen Promotorfragmente wurden in die restringierten Vektoren ligiert. Etwa 100 ng des aufgereinigten Vektors wurden zu diesem Zweck mit den geschnittenen und aufgereinigten Promotorfragmenten in einem molaren Verhältnis von ca. 1:3 vermischt, 1 µl T4-DNA-Ligase, 1 µl des zehnfach konzentrierten Ligase-Puffers, 1 µl 10 mM ATP und *A. nidulans* bis zu einem Gesamtvolumen von 10 µl zugegeben und die Reaktion 24 Stunden lang bei 4 °C im Kühlschrank durchgeführt. Wiederum wurden die Plasmide pPromo-GUS zur Vermehrung in *E. coli* DH10b-Zellen transformiert (2.7.1) und anschließend wieder isoliert.

### **2.6.2.2 KONSTRUKTION DER VEKTOREN FÜR DIE TRANSFORMATION VON *A. NIGER***

Als Basisplasmid für die heterologen Promotor-Studien in Pilzen wurde das Plasmid pCB1003 verwendet, das mir freundlicherweise von Frau PD Dr. S. Pöggeler von der Ruhruniversität Bochum zur Verfügung gestellt wurde [Caroll *et al.*, 1994]. In dieses Plasmid auf der Basis von pUC19 wurde das Gen, das für die Hygromycin Phosphotransferase B codiert, zusammen mit dem Promotor der Pyruvat Kinase aus *A. niger* als *Eco*RI Fragment inkloniert. Das Promotor-GUS-Konstrukt wurde als PCR-Fragment mit den Primern ProGUSKasfor (AACGGTACCAGTGCCAAGC TTGCATGCCTG) und ProGUSKasrev (TATGGTACCGTTAGCTCACTCATTAGGC ACC), die gleichzeitig eine *Kpn*I-Schnittstelle (unterstrichen) bereitstellen, aus dem Vektor pRT-Promo-GUS isoliert (Annealing 55 °C, 35 Zyklen). Die isolierten Fragmente wurden durch Restriktionsverdau mit *Kpn*I für die Ligation in den ebenfalls *Kpn*I geschnittenen Vektor pCB1003 vorbereitet. Die Restriktions- und Ligationsansätze wurden analog den unter Punkt 2.6.2.1 beschriebenen Reaktionsschemata durchgeführt. Die entstehenden Vektoren pPromo1 (Promotor 756 bp lang) und pPromo2 (Promotor 358 bp lang) wurden wieder in *E. coli* vermehrt und zur Transformation in *A. niger* als Midi-Präparation mit dem Nucleobond<sup>®</sup> AX PC 500 Kit von Macherey und Nagel vorbereitet.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.6.3 HETEROLOGE EXPRESSION DER PEL-GENE

#### 2.6.3.1 BEREITSTELLUNG DER GENE

Für die heterologe Expression der Pektat-Lyase aus *Fusarium* wurden zunächst full-length-RT-PCR-Amplikons benötigt. Der Pilz wurde in Induktionsmedium angezogen, aus dem geernteten Mycel RNA isoliert (2.2) und daraus cDNA synthetisiert (2.3.6.1). Zur Amplifizierung des *pel1*-Gens wurden die Primer *pel1uni* (CCC AAGCTTGAAGCTTAGCTTCCCCCTTTGG) und *protexpel1stopNotI* (GCAGCGGCC GCTTAGCAGGTCTTGGTCGC) eingesetzt. Für das *pel2*-Gen kommen die Primer *pel2cDNAuniRcaI* (ATCATGAACGCTCCCAGCCTTATC) und *pel2cDNArevNotI* (AAGGCGGCCGCCTAGCACTTGCTGGC) zum Einsatz. Eine 5'-*RcaI*-Schnittstelle ist im Startcodon des *pel1*-Gens natürlicherweise vorhanden, im *pel2*-Gen wurde sie, ebenso wie die *NotI*-Schnittstellen am 3'-Ende der Gene, durch die PCR eingefügt. Die durch die Primer inserierten Restriktionsschnittstellen sind jeweils unterstrichen. Die PCR wurde mit 40 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 56 °C durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pGemT kloniert (2.6.1) und vermehrt. Durch Restriktion mit den Enzymen *RcaI* und *NotI* wurden die Gene aus den Vektoren isoliert. Wieder wurde etwa 1 µg des Vektors mit je 10 U der Restriktionsenzyme versetzt, 2 µl des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers zugesetzt und das Reaktionsvolumen mit A. bidest auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der Gene erfolgte mit dem Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kit von Macherey und Nagel nach Auftrennung auf einem 1%igen Agarose-Gel.

#### 2.6.3.2 EXPRESSIONSVEKTOR

Der Expressionsvektor für die heterologe Expression der Gene in *A. niger* wurde mir freundlicherweise von Herrn Dr. J. A. E. Benen vom Institut für Genetik Industrieller Mikroorganismen der Universität Wageningen zur Verfügung gestellt [de Graff, 1989]. In diesen Vektor wurden die *pel*-Gene unter der Kontrolle des Promotors der Pyruvat-Kinase aus *A. niger* als *RcaI/NotI* Fragmente kloniert. Da der Expressionsvektor zusätzlich jedoch noch zwei weitere Schnittstellen für *RcaI* besitzt, mußte die Klonierung in mehreren Schritten erfolgen. Zunächst wurde eine Pyruvat-Kinase-Promotor/Gen Kasette mit den Enzymen *HindIII* und *NotI* isoliert und aufgereinigt. Der Promotor wurde anschließend durch einen Verdau mit *RcaI* aus diesem Frag-

## 2. MATERIAL UND METHODEN

ment gewonnen. Zur Vorbereitung des Vektors wurden etwa 1 µg mit je 10 U der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Not*I versetzt, 2 µl des zehnfach konzentrierten Reaktionspuffers zugesetzt und das Reaktionsvolumen mit A. bidest auf 20 µl aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung des restringierten Vektors und des Promotor-Gen Inserts erfolgte mit dem Nucleospin<sup>®</sup>-Extraction-Kit von Macherey und Nagel nach Auftrennung auf einem 1%igen Agarose-Gel. Das aufgereinigte Promotor-Gen Fragment wurde anschließend *Rca*I verdaut und der Promotor erneut aufgereinigt. In der anschließenden Ligationsreaktion wurden der Pyruvat Kinase Promotor als *Hind*III/*Rca*I Isolation, die *pel*-Gene als *Rca*I/*Not*I Fragmente in den *Hind*III/*Not*I vorbereiteten Vektoren eingesetzt. Etwa 100 ng des aufgereinigten Vektors wurden zu diesem Zweck mit dem Promotor und den Genen in einem molaren Verhältnis von ca. 1:3 vermischt, 2 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl des zehnfach konzentrierten Ligase-Puffers, 2 µl 10 mM ATP und A. bidest bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben und die Reaktion 24 Stunden lang bei 4 °C im Kühlschrank durchgeführt. Wiederum wurden die Plasmide zur Vermehrung in *E. coli* DH10b-Zellen transformiert (2.7.1) und anschließend isoliert.

Die so entstandenen Plasmide pHex1 und pHex2 wurden für die heterologe Genexpression in *A. niger* verwendet. Die Transformation von *A. niger* zur heterologen Expression von *pel*1 und die Aufreinigung und Charakterisierung des Proteins wurde in Wageningen im Labor von Dr. Benen durchgeführt.

### **2.6.4 PLASMID-PRÄPARATION**

Die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* im kleinen Maßstab (Ausbeute 100–250 ng Plasmid) erfolgte mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup>-Plasmid-Mini-Kits von Macherey und Nagel nach der Vorschrift im Benutzerhandbuch.

Präparationen im größeren Stil (Ausbeute 500–1000 ng Plasmid) wurden mit dem Nucleobond<sup>®</sup> AX PC 500 Kit von Macherey und Nagel durchgeführt.



## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.7 TRANSFORMATION

#### 2.7.1 *ESCHERICHIA COLI*

##### 2.7.1.1 HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER ZELLEN

Zur Herstellung elektrokompeter Zellen wurde am Vorabend der Präparation eine Einzelkolonie des Stammes *E. coli* DH10b von einer Agar-Platte in 10 ml LB-Flüssig-medium [Luria et al., 1960] angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 120 upm inkubiert. Am folgenden Morgen wurden 5 ml dieser Kultur als Starter für die Inokulation von 500 ml TYP-Medium (16 g/l Trypton, 16 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2.5 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) benutzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C solange, bis die Kultur eine optische Dichte (OD) zwischen 0.6 und 0.9 erreicht hat. In der Zwischenzeit wurden alle benötigten Lösungen und Materialien auf 4 °C vorgekühlt. Die gewachsenen Zellen wurden 15 Minuten lang im Eis gekühlt und anschließend 12 Minuten lang bei 2500x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml eiskaltem, sterilem A. bidest resuspendiert. Das Volumen wurde mit eiskaltem A. bidest auf 500 ml erhöht. Die Zellen wurden erneut durch Zentrifugation 12 Minuten lang bei 4000x g und 4 °C pellettiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zwei Mal wiederholt. In einem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 25 ml 10%igem Glycerin resuspendiert und in ein Falcon-Tube überführt. Die Zellen wurden wieder durch Zentrifugation 12 Minuten lang bei 4000x g und 4 °C pellettiert. Abschließend wurde das Pellet in 1.5 ml 10%igem Glycerin resuspendiert, in Portionen zu je 100 µl abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der elektrokompeter Zellen erfolgte bei -80 °C.

##### 2.7.1.2 ELEKTROTRANSFORMATION

Das Einbringen von Fremd-DNA in *E. coli* DH10b-Zellen erfolgte per Elektrottransformation. Durch Anlegen eines kurzen elektrischen Impulses mit hoher Spannung (1.8 kV, 25 µF, 200 Ω, 4 ms; BioRad Gene Pulser™ II, BioRad Pulse Controller Plus, BioRad Capacitance Extender Plus; BioRad Life Sciences, München) wurden die Zellen zur Aufnahme der Fremd-DNA angeregt. Dazu wurden 1 µl des Ligationssatzes mit 40 µl der elektrokompeter Zellen versetzt und in die vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Unmittelbar im Anschluß an den Stromstoß wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und eine Stunde lang bei 37 °C

## 2. MATERIAL UND METHODEN

und 600 upm regeneriert. Jeweils ein Viertel des Ansatzes wurde auf LB-Medium, supplementiert mit dem Antibiotikum Ampicilin zur Selektion der positiven Transformatanten, ausplattiert. Die Platten wurden mit der Oberseite nach unten 16 bis 18 Stunden lang bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

Zur Kontrolle der Transformation wurden am folgenden Tag Einzelkolonien von den Platten gepickt. Die Zellen wurden in eine Kolonie-PCR-Reaktion (2.3.5) eingesetzt und gleichzeitig in 3 ml LB-Amp-Flüssigmedium angeimpft. Dieser Ansatz wurde wiederum 18 Stunden lang bei 37 °C im Rotationsschüttler inkubiert. Mit Hilfe des Nucleospin<sup>®</sup>-Plasmid-Mini-Kits von Macherey und Nagel wurden die Plasmide am folgenden Tag aus den Bakterienzellen präpariert.

### **2.7.2 ASPERGILLUS NIGER**

#### **2.7.2.1 PROTOPLASTIERUNG**

Das Protokoll zur Gewinnung von Protoplasten aus *A. niger* und deren Transformation wurde mir freundlicherweise von Dr. J. A. E. Benen von der Universität Wageningen zur Verfügung gestellt. Im folgenden sind die Arbeitsschritte kurz erläutert. Etwa  $5 \times 10^6$  Sporen des Pilzes wurden als Übernachtskultur (18 Stunden) in Transformationsmedium [Minimal Medium Salze (2.1.2), 1ml Vishniac-Lösung (2.1.2), 0.5% Hefeextrakt, 0.2% Caseinsäurehydrolysat, 2% Glukose, pH 6.0] angesetzt. Die Sporen wurden in 300 ml Transformationsmedium in einem 1 l Kolben bei 30 °C und 220 upm inkubiert. Am folgenden Tag wurde das gewachsene Mycel zunächst über einen Faltenfilter abfiltriert und anschließend über einen Sterilfilter trockengesaugt. Abschließend wurde zwei Mal mit SMC-Puffer (1.33 M Sorbitol, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 20 mM MES, pH 5.8) gewaschen. Etwa 1 g Frischgewicht des Pilzes wurden in 50 ml SMC-Puffer supplementiert mit den Enzymen Glucanex (50 mg/ml; GeWe Biotechnologie GmbH, Bad Kreuznach) und Driselase (10 mg/ml; Sigma Aldrich Chemie, Schnelldorf) bei 28 °C und 120 upm drei Stunden lang inkubiert. Wenn ausreichend Protoplasten vorhanden waren ( $>1 \times 10^7$ /ml), wurden die Protoplasten über ein Stahlsieb mit einer Porengröße von 250 µm vom restlichen Mycel getrennt. Eine weitere Aufreinigung der Protoplastenfraction wurde durch Filtration über vier Lagen Linsenreinigungspapier (Lens Tissue; Whatman) erzielt. Die gewonnenen Protoplasten wurden durch Zentrifugation mit 2500x g pellettiert und in 5 ml STC-Puffer (1.33 M Sorbitol, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5) resuspendiert und erneut wie vor pellettiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zwei Mal

## 2. MATERIAL UND METHODEN

wiederholt. Schließlich wurden die Protoplasten in einer Konzentration von etwa  $1 \times 10^6$ /ml in STC-Puffer aufgenommen.

### **2.7.2.2 TRANSFORMATION**

200  $\mu$ l der Protoplastensuspension wurden für die folgenden Transformationsansätze eingesetzt. Zu der Suspension wurden in einem 50 ml Falcon-Tube 5  $\mu$ g der zu transformierenden DNA und 50  $\mu$ l einer 25%igen PEG-6000 Lösung (in 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM Tris/HCl, pH 7.5) zugesetzt. Die Komponenten wurden vorsichtig gemischt und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden weitere 2 ml des PEG-Puffers zugesetzt und noch einmal fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 4 ml des STC-Puffers zugegeben, dann das Tube bis zur 45 ml Marke mit MMS-Top-Agar mit 150  $\mu$ g/ml Hygromycin B gefüllt, ehe die Suspension auf vier MMS-Agar-Platten [Minimal Medium Salze (2.1.2), 1 ml Vishniac-Lösung (2.1.2), 0.95 M Saccharose, pH 6.0) mit 150  $\mu$ g/ml Hygromycin B ausplattiert wurde. Die Inkubation der Platten erfolgte vier Tage lang mit der Oberseite nach unten bei 30 °C.

Transformiert wurde der Pilz mit folgenden Vektoren: pCB1003 als Kontrolle, pPromo1 und pPromo2 für die Promotor-Studien.

Gewachsene Kolonien wurden nach vier Tagen Wachstum auf CM-Medium Platten, supplementiert mit 150  $\mu$ g/ml Hygromycin B, umgesetzt. Diese Platten wurden weitere drei Tage lang bei 30 °C mit der Oberseite nach unten inkubiert.

### **2.7.3 UNTERSUCHUNG DER PROMOTORAKTIVITÄT**

#### **2.7.3.1 VERSUCHE IN *E. COLI***

Die Vermehrung des Vektors erfolgte in *E. coli* nach dem Standardprotokoll. Die ersten Versuche zur Promotoraktivität sollten ebenfalls in *E. coli* durchgeführt werden. Dazu wurden einzelne Kolonien von der Transformationsplatte gepickt und in 3 ml LB-Flüssigmedium, supplementiert mit Ampicilin als Marker, gepickt und durch Inkubation 18 Stunden lang bei 37 °C und 120 upm vermehrt. Aus dieser Starterkultur wurden verschiedene Medien (CM, Pektin, Polygalakturonsäure) angeimpft und die Zellen 24 Stunden lang bei 37 °C und 120 upm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation zwei Minuten lang bei voller Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge pellettiert und das überstehende Medium abdekantiert. Die Zellen wurden in 50  $\mu$ l GUS-Extraktionspuffer (50 mM NaPhosphat, pH 7.0, 10 mM EDTA,

## 2. MATERIAL UND METHODEN

0.1% Triton X-100, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) aufgenommen und mit 100 mg Silica Beads versetzt. Der Aufschluß der Zellen in der Zelmühle wurde 40 Sekunden lang bei Geschwindigkeit 6.0 durchgeführt. Der Zellschrott wurde durch Zentrifugation zwei Minuten lang bei voller Geschwindigkeit und 4 °C vom Überstand getrennt. 10  $\mu$ l des Überstandes wurden mit weiteren 35  $\mu$ l des Extraktionspuffers und 5  $\mu$ l Substratlösung (4 mM 4-MUG in GUS-Extraktionspuffer) gemischt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stoppuffer (0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) gestoppt. Die Dokumentation der Ergebnisse erfolgte unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 375 nm durch Fotografie mit einer Digitalkamera.

### **2.7.3.2 VERSUCHE IN *A. NIGER***

#### **2.7.3.2.1 ISOLATION VON DNA / RNA**

Zur Untersuchung der Promotoraktivität wurden von den CM-Platten mit transformiertem *A. niger* 25 ml Kulturen in CM-Flüssigmedium und Polygalakturonsäure Induktionsmedium in 100 ml Erlenmeyer-Kolben angeimpft. Die Glukose Konzentration im CM-Medium betrug 2.5 mM. Nach drei Tagen Wachstum als Standkultur bei 28 °C wurde wenig Mycel (ca. 100 mg Frischgewicht) zur Isolierung von DNA und RNA entnommen.

Der Zellaufschluß erfolgte mit Hilfe von Silica-Beads (~100 mg) in 300  $\mu$ l 2x Isolationspuffer und 300  $\mu$ l 10 M Harnstoff (2.2) in der FastPrep 2x 20 Sekunden lang bei der Geschwindigkeitseinstellung 6.0. Die Lösung wurde zwei Minuten lang bei 12.000x g und 4 °C zentrifugiert, anschließend wurden 300  $\mu$ l Phenol und 600  $\mu$ l Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt und auf dem Vortex-Mixer gut geschüttelt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation 15 Minuten lang bei 12.000x g und 4 °C. Die wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0.7 Volumen Isopropanol (2-Propanol) versetzt. Zur Fällung der Nukleinsäuren wurde das Gemisch zwei Stunden lang bei 12.000x g und 4 °C zentrifugiert. Die gefällten Nukleinsäuren wurden mit 70%igen Ethanol gewaschen und anschließend im Exsikkator getrocknet. Die trockenen Pellets wurden in 50  $\mu$ l *A. bidest* resuspendiert und bei 4 °C im Kühlschrank für die weiteren Applikationen gelagert.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### **2.7.3.2.2 GUS-AKTIVITÄTSTEST**

Zur Bestimmung der Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase wurde ebenfalls ein wenig des Mycels entnommen und die Zellen aufgeschlossen. Dazu wurde das Mycel mit 50  $\mu$ l GUS-Extraktionspuffer (50 mM NaPhosphat, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) und 100 mg Silica Beads versetzt und die Zellen in der Zelmühle 40 Sekunden lang bei Geschwindigkeit 6.0 aufgeschlossen. Der Zellschrott wurde durch Zentrifugation fünf Minuten lang bei 10.000x g und 4 °C vom Überstand getrennt. 10  $\mu$ l des Überstandes wurden mit weiteren 35  $\mu$ l des Extraktionspuffers und 5  $\mu$ l Substratlösung (4 mM 4-MUG in GUS-Extraktionspuffer) gemischt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu$ l Stoppuffer (0.2 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) gestoppt.

### **2.8 SEQUENZANALYSEN**

Die aus den Sequenzierungen gewonnenen Daten wurden am PC bearbeitet. Für Sequenzvergleiche mit Datenbanken wurden die Programme blastn zum Abgleich von Nukleotidsequenzen und blastx zum Abgleich von in Proteinsequenzen umgeschriebenen Nukleotidsequenzen von NCBI benutzt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Für Vergleiche von gewonnenen Sequenzdaten untereinander wurde das Programm Biology Work Bench (<http://biowb.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>) genutzt, in dem Alignments sowohl von Nukleotid- als auch von Proteinsequenzen, das Umschreiben von Nukleotid- in Proteinsequenzen und viele weitere Funktionen zur Verfügung stehen.

Für das virtuelle Modellieren von Proteinen wurde das Programm Swiss-Model (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) benutzt, mit dem dreidimensionale Modelle von Proteinen aufgrund der Aminosäureanordnung vorgeschlagen werden können.

### **2.9 IN PLANTA-UNTERSUCHUNGEN**

Um bestimmen zu können, ob die Pektat-Lyasen des Pilzes im natürlichen Infektionsprozeß des Pilzes eine Rolle spielen, sollte untersucht werden, ob eine Transkription der Gene während der Infektion der Pflanze stattfindet. Dazu wurden Weizenpflanzen der Sorte Bobby White zur Zeit ihrer Blüte mit einer Sporensuspension des Pilzes inokuliert. Die Sporen wurden in einer Verdünnung von ca.  $1 \times 10^8$ /ml in *A. bidest* eingesetzt. Mit einer Einwegspritze wurde die Suspension in die Blüte

## 2. MATERIAL UND METHODEN

der Pflanze eingespritzt. Die gesamte Ähre wurde mit einer Plastiktüte umhüllt, in die, um optimale Infektionsbedingungen zu schaffen, Feuchtigkeit eingespritzt wurde. Die Inkubation erfolgte zwei Tage lang im Dauerlicht bei Raumtemperatur. Danach wurde die Plastikfolie abgenommen und die Inkubation im Dauerlicht bei Raumtemperatur weitergeführt. Nach den Zeitpunkten drei Tage und 28 Tage nach Inokulation wurden jeweils infizierte- und nicht-infizierte Kontroll-Ähren geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Gewinnung von DNA und RNA wurden die Ährchen ohne Körner unter flüssigem Stickstoff gründlich zu einem feinen Pulver zermörsert und die Isolation der Nukleinsäuren wie unter Punkt 2.2 beschrieben durchgeführt. Die PCR-Reaktion zum Nachweis der Infektion wurde mit den *Fusarium* spezifischen Pektat-Lyase Primern und DNA aus den infizierten und nicht infizierten Pflanzen als Template mit einer Annealing-Temperatur von 55 °C und 35 Zyklen von Denaturierung (94 °C, 30 sec.), Primer-Annealing (50 °C, 1 min.) und Zweitstrangsynthese (72 °C, 1 min.) durchgeführt. Der Nachweis der Expression der Pektat-Lyasen erfolgte für *pe1* mit den Primern *pe1cDNAuni* (ATGAAGTACGCCAC TATCCTCG) und *pe1cDNArev* (TTAGCAGGTCTTGGTCGCACC) und für *pe2* mit den Primern *pe2cDNAuni* (ATGCACGCTCCCAGCCTTATC) und *pe2cDNArev* (CTAGCACTTGCTGGCCTTGG) mit cDNA als Template bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und 40 Zyklen von Denaturierung (94 °C, 30 sec.), Primer-Annealing (50 °C, 1 min.) und Zweitstrangsynthese (72 °C, 1.5 min.). Als Kontrollen wurden jeweils PCR-Reaktionen unter den gleichen Bedingungen mit genomischer Pilz-DNA als Template durchgeführt.

### 3. ERGEBNISSE

Für die Stabilität und Integrität der pflanzlichen Zelle ist die Zellwand von entscheidender Bedeutung. Deshalb könnte der enzymatische Abbau der pflanzlichen Zellwand, neben anderen, ein kritischer Faktor für phytopathogene Mikroorganismen sein, in erster Linie für die Besiedlung des Wirtsorganismus, aber auch als Grundlage der eigenen Ernährung. Dabei stehen den Pathogenen in nahezu allen Fällen ganze Batterien verschiedener Enzyme zur Verfügung, die sie in die Lage versetzen, alle Strukturen der Zellwände in die kleinsten Einheiten zu zerlegen.

Bei der Quervernetzung der pflanzlichen Typ I-Zellwand spielt Pektin eine entscheidende Rolle, so dass der Abbau dieser Komponente ein wichtiger Faktor für die Pathogenität eines Mikroorganismus sein könnte. In der Typ II-Zellwand ist Pektin möglicherweise auf das absolut notwendige Minimum reduziert und spielt deshalb eine noch tragendere Rolle für die Stabilität.

Mit biochemischen Methoden konnte gezeigt werden [Conze, 2000], dass (i) *Fusarium graminearum* Pektin-abbauende Enzyme als eine Komponente im Arsenal seiner zellwanddegenerierenden Enzyme besitzt und (ii) diese Enzyme nicht konstitutiv im pilzlichen Stoffwechsel synthetisiert werden, sondern erst durch Induktion durch entsprechende Substrate, z.B. Pektin, Polygalakturonsäure oder pflanzliche Zellwand, nachweisbar synthetisiert werden. Eine eingehendere Charakterisierung der pektinolytischen Enzyme des Pilzes auf biochemischer, hier besonders die reine Darstellung und Beschreibung der einzelnen Enzyme (3.3), und molekularbiologischer Ebene stand jedoch noch aus und bildet einen Schwerpunkt dieser Dissertation. Im Mittelpunkt der molekularbiologischen Arbeiten standen dabei zunächst die Darstellung der codierenden Gene und deren Promotoren (3.1 und 3.2). Die bisher gewonnenen Erkenntnisse bezogen sich zudem nur auf die pilzliche Kultivierung *in vitro*, so dass ein weiterer Ansatz dieser Arbeit eine Infektion von Weizen mit *F. graminearum* und der Nachweis der Synthese der Enzyme während der Pathogen/Pflanze-Interaktion sein sollte. Die Regulation der Gene, insbesondere die Induktion durch verschiedene Substrate bzw. die Repression durch Glukose sollte durch Promotorfunktionsstudien untersucht werden (3.4).

#### 3.1 CHARAKTERISIERUNG DES PEKTAT-LYASE GENS PEL1, SOWIE SEINES PROMOTORS

Zunächst sollten die Untersuchungen meiner früheren Arbeiten mit dem schwachpathogenen *Fusarium*-Stamm aus Aachen, die zur Amplifizierung zweier unter-

### 3. ERGEBNISSE

---

schiedlicher Fragmente aus dem mittleren Bereich der Gene der beiden Lyasen des Pilzes geführt haben, mit dem pathogenen Stamm K59 wiederholt werden. Zu diesem Zweck sind PCR-Reaktionen mit genomischer DNA als Template und den Primerkombinationen *peIF1-1/peIR1* und *peIF1-2/peIR*, sowie die entsprechenden Kontrollen angesetzt worden (Primersequenzen siehe Anhang).

Mit beiden Primerkombinationen konnte auch aus dem Genom des Stammes K59 von *F. graminearum* ein 278 bp großes Fragment amplifiziert werden. Die neuerliche Sequenzierung beider Fragmente zeigte, dass es sich hier um zwei gleich große, in der Sequenz jedoch deutlich unterschiedliche Fragmente handelt.

```

pe11  TGGTGGGCCGATGTCTGTGAGGACGCCATTACCCTCAAGCAAACCAAGCGG
pe12  TGGTTCGAGGACGTTTGCAGGATGCCATTACTATCAAG---GGTAGTGG
cons.  ****-*-***-**-**-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*

```

```

pe11  CACATCCTTCATCAACGGTGGTGGTGCTTCAAGGCCTCTGACAAGATCG
pe12  AACCGCCAAACATCATCCGGTGGTGGTGCTTCAAGGCCGCCGACAAGGTCA
cons.  -**--**--*****-*****-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*-*--

```

```

pe11  TTCAGTTC AACCGGC CGTGGTACCGTCCAGATCAAGGATTTGTACGCTGAG
pe12  TTCAGCAC AACCGGCTGTGGTCA CGTCAACGTTGTCAACTTCTACGCCAAC
cons.  *****-*****-*****-*****-*--*--*--*--*--*--

```

```

pe11  GACTACGGCAAAGCTGGTCCG CAGCTGCGGC AACTGCAAGGACAACGGTG-
pe12  GCCTACGGCAAAGTCTACCGATCTTGCGGTAACTGCAAGGC CAACCCAA
cons.  *-*-*-*-*-*-*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--

```

```

pe11  GTCCTCGCAA--CGTCATCATCCAGGACTCTGTGCTGTCAACGGCGGTG
pe12  GTGCAAGCGATCCGTTACATGGAAGGTGTCACTGCTGTCAACGGCGGTG
cons.  **-*--**-*--***--**--*-*--*--*--*--*--*--*--*--*--

```

```

pe11  TCCTGTGCGGTATCAACACTAACTACGGCGA
pe12  AGCTCATTGGTATCAACACCAACTCGGCGA
cons.  --*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--*--

```

**ABBILDUNG 3.1:** Sequenz-Alignment der beiden mit den Primerkombinationen *peIF1-1/peIR1* (*pe11*) und *peIF1-2/peIR1* (*pe12*) mit genomischer DNA aus *F. graminearum* erhaltenen DNA Sequenzen. Die Homologie beider Sequenzen beträgt 68%.  
cons. ⇒ Konsensus-Sequenz, \* ⇒ identische Basen in beiden Sequenzen, - ⇒ Sequenzunterschiede in beiden Sequenzen

ABBILDUNG 3.1 zeigt den Sequenzvergleich der beiden aus den PCR Experimenten gewonnenen Fragmente. Die Sequenzen sind zu 68% identisch. Aufgrund ihrer Homologien zu den Pektat-Lyase aus *F. oxysporum* und *F. solani* können beide Fragmente als Pektat-Lyase identifiziert werden (nicht gezeigt). Mit diesen Genfragmenten und den Sequenzinformationen als Basis sollte im Weiteren versucht werden, die kompletten Sequenzen der Gene und der Promotoren zu erhalten.

Um die gesamte Sequenz der Pektat-Lyase 1 zu erhalten wurden zunächst Southern-Analysen des pilzlichen Genoms mit dem oben beschriebenen PCR-Fragment



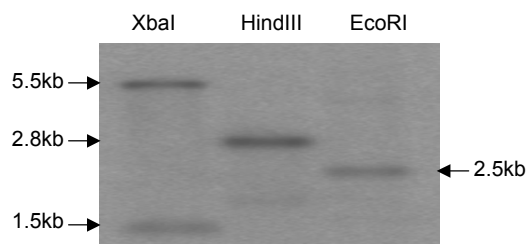
### 3. ERGEBNISSE

---

*pe1* als Sonde durchgeführt und subgenomische Banken angelegt. Diese Banken wurden wiederum mit der gleichen Sonde auf positive Klone untersucht. Die schrittweise Sequenzierung dieser Klone sollte zum gesamten Gen *pe1* führen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind unter den Punkten 3.1.1 bis 3.1.5 aufgeführt.

#### 3.1.1 SOUTHERN ANALYSEN UND KONSTRUKTION SUBGENOMISCHER BÄNKE

Die Southern Analysen des *Fusarium*-Genoms wurden mit Hilfe von radioaktiv markierten Sonden des Pektat-Lyase-Fragments *pe1* (3.1) durchgeführt. Die Restriktionen mit verschiedenen Enzymen (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Nco*I, *Nde*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Xho*I) wurden vor dem Blotten auf die Nylonmembran auf einem 1%igen Agarose Gel aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass durch die Inkubation mit den Enzymen Genomfragmente im Größenbereich von etwa 300 Basenpaaren bis hin zu Fragmenten einer Größe von mehr als 12 Kilobasenpaaren entstanden waren (nicht gezeigt). Die Nukleinsäuren wurden durch Vakuumbloit fast vollständig auf die Nylon Membranen überführt und mit UV-Licht an die Membran gebunden.



**ABBILDUNG 3.2:** Southern Hybridisierung von *F. graminearum* DNA restringiert mit verschiedenen Restriktionsenzymen. Das durch Einlagerung von  $\alpha$ -( $^{32}$ P)-dCTP radioaktiv markierte, homologe 300bp PCR-Fragment (*pe1*) wurde als Sonde eingesetzt. Bahn 1 zeigt die Restriktion der DNA mit *Xba*I, Bahn 2 zeigt die *Hind*III geschnittenen DNA Proben und Bahn 3 die *Eco*RI geschnittenen Proben. Die mit Pfeilen markierten Größenangaben sind in Kilobasenpaaren (kb) und wurden anhand der DNA-Leiter des Originalgels nachvollzogen. Die Ergebnisse der Hybridisierung mit der DNA aus den anderen Restriktionen wurden nicht dargestellt. Hier wurden Signale detektiert, die in Größenbereichen  $<0.5$  kb oder  $> 8$  kb lagen. Es wurden keine subgenomischen Banken aus diesen nicht gezeigten Proben angelegt.

---

Die Hybridisierung erfolgte mit Lösungen, die eigentlich bei Northern-Analysen zum Einsatz kommen, da hierbei im Vergleich mit den typischen Lösungen für Southern-Analysen die besseren Ergebnisse erzielt werden konnten. In ABBILDUNG 3.2 ist das Ergebnis des Southern Blots mit der *pe1*-Sonde dargestellt. Die Southern-Analysen wurden durch den Einsatz des *pe2*-Fragments als Sonde erweitert. Bei diesen Untersuchungen ergaben sich bei allen Restriktionen identische Signale wie mit der

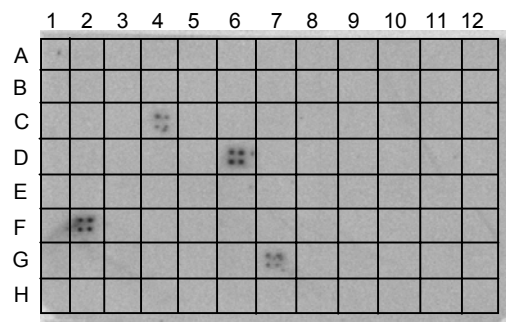
### 3. ERGEBNISSE

---

*pe1*-Sonde.

ABBILDUNG 3.2 zeigt einen Ausschnitt der Darstellung eines Southern Blots. Bei der mit dem Restriktionsenzym *Xba*I geschnittenen Probe zeigen sich zwei Banden mit den Größen 5.5 kb und 1.5 kb. Die *Hind*III-restringierte Probe ergab ein Signal bei 2.8 kb, ein weiteres Signal mit einer Größe im Bereich 300 bp war vorhanden, wurde in der Abbildung jedoch nicht gezeigt. Die *Eco*RI-geschnittene DNA zeigte ein Signal bei 2.5 kb, auch hier war ein weiteres schwaches Signal von sehr kleiner Größe zu sehen. Die Fragmente der *Xba*I-Restriktion, sowie die jeweils großen Fragmente der *Hind*III- und *Eco*RI-Restriktionen wurden kloniert und subgenomische Bänke angelegt. Die weiteren Restriktionen mit den Enzymen *Bam*HI, *Kpn*I, *Nco*I, *Nde*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I und *Xho*I lieferten in der Detektion ebenfalls jeweils zwei unterschiedliche Signale. Diese waren aber entweder größer als 8 kb oder kleiner als 0.5 kb, von einer Klonierung dieser Fragmente und dem Anlegen subgenomischer Bänke wurde aufgrund dieser Größenmerkmale abgesehen.

---



**ABBILDUNG 3.3:** Southern-Kolonie-Analysen der subgenomischen *Xba*I-Bank. Jede Kolonie wurde vier Mal gespottet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die DNA der Zellen durch alkalische Lyse freigesetzt, an die Membran gebunden und mit der radioaktiv markierten *pe1*-Sonde hybridisiert. Schwarze Punkte kennzeichnen positive Kolonien. Beispielhaft ist hier nur eine Membran gezeigt. Die Rasterschablone ermöglichte die Identifizierung der positiven Klone auf der Masterplatte.

---

Im Weiteren wurde die zweite Hälfte des Gesamtvolumens der Restriktionen (*Xba*I, *Hind*III, *Eco*RI) auf einem weiteren Agarose Gel aufgetrennt, die DNA-Bereiche der oben angegebenen Größen wurden ausgeschnitten und in pBluescriptII KS-Vektoren kloniert. Diese Ligationen wurden in *E. coli* DH10b-Zellen transformiert und vermehrt. Von jeder Vektortransformation wurde eine subgenomische Bank mit 10.000 Einzelkolonien in 96-Well-Platten angelegt. Die weiteren Untersuchungen wurden zunächst mit der 5.5 kb *Xba*I-Bank durchgeführt. Die Kolonien wurden auf Nylonmembranen geblottet und im Southern-Blot erneut analysiert. Als Sonde wurde wieder das radioaktiv markierte 300bp-*pe1*-Fragment eingesetzt. Durch dieses erste Vorscreening aller Kolonien konnten zwölf eindeutig positive Klone identifiziert

### 3. ERGEBNISSE

---

(Daten nicht gezeigt) werden. Zur weiteren Verifizierung dieser Klone wurden die Platten mit positiven Klonen erneut auf Membranen gespottet, dabei wurde jede Kolonie vierfach aufgetragen. Durch erneute Hybridisierung dieser Membranen mit der Sonde wurden die positiven Klone re-identifiziert, die Plasmide wurden präpariert und sequenziert.

ABBILDUNG 3.3 zeigt beispielhaft den Scan einer Membran mit positiven Signalen. Mit Hilfe einer Schablone konnten die positiven Klone auf der Masterplatte, in diesem Fall vier in den Planquadraten C4, D6, F2 und G7, identifiziert werden.

#### 3.1.2 SEQUENZANALYSEN

Durch die schrittweise Sequenzierung der isolierten Plasmide ist die gesamte Sequenzinformation des *pe1*-Gens erhalten worden inklusive 950 Basenpaare der Promotorsequenz. Zur Absicherung der Sequenzinformation wurden homologe Primer vom 5'- und vom 3'-Ende des Gens abgeleitet. Mit diesen Primern wurde eine weitere PCR-Reaktion durchgeführt, deren Produkte erneut sequenziert wurden. Die auf diese Weise gewonnenen Sequenzdaten bestätigten die ersten Sequenzierungsergebnisse.

---

**ATGAAGTACGCCACTATCCTCGCCCTTGCTGGCGTCTCCTCCGCCGCTGTCACCAAGACTCTTCCC**  
AAGTCTGCTGGTGTACATCTTTCCCTACTGCTGTTCCCGTCAAGGGCAGCTTTGATGGTGGCATG  
AAGCGATTGAGCGAAGCAGTAAGTCTAAATCCCACCTTTCTATAAGATTATAGACTTACACATTCC  
AGCCAACGTTTGCCAAGGTCAGACAGAGACTGGCGAGAAGGACGCCATGTTTCATTCTTGAAGCCGG  
TGCCACTCTTTCCAACGTCATTATCGGTGCTTCTCAAGCTGAGGGTGTTCCTGCAAGGGAACCTG  
GTAGGTCACTGAACCATTGTACAGTCTTTTCGACTCTACCTTGCCATTAGCACCTGAACAACGTC  
TGGTGGGCCGATGTCTGTGAGGACGCCATTACCCTCAAGCAAACCAGCGGCACATCCTTCATCAAC  
GGTGGTGGTGCCTTCAAGGCCTCTGACAAGATCGTTCAGTTC AACGGCCGTGGTACCGTCCAGATC  
AAGGATTTCTACGCTGAGGACTACGGCAAGCTGGTCCGCAGCTGCGGCAACTGCAAGGACAACGGT  
GGTCTCGCAACGTCATCATCCAGGACTCTGTGCTGTCAACGGCGGTGTCTGTGCGGTATCAAC  
ACTAACTACGGCGATACCTGCAAGATCACCAACAGTTGCCAGAACAGCGGCAAGTACTGCGATCGC  
TACCAGGGTAACTCGGATGGCTCTGAGCCTTCCAAGATTGGATCTGGCCCTGATGGAAAGTTCTGC  
ATCACTAGCGGTGCGACCAAGACCTGCTAA

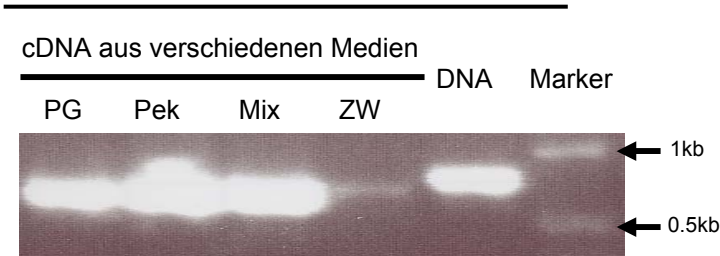
**ABBILDUNG 3.4:** genomische Sequenz der codierenden Region des *pe1*-Gens aus *F. graminearum*. Unterstrichen und grau hinterlegt dargestellt sind die vermuteten Intron-Sequenzen. Die Sequenz ist 822 bp lang, die codierende Sequenz 723 bp. Die Verifizierung der Intron-Sequenzen erfolgte mittels RT-PCR (ABBILDUNG 3.5 und 3.6)

---

### 3. ERGEBNISSE

---

ABBILDUNG 3.4 zeigt die ermittelte genomische Sequenz des *pe1*-Gens beginnend mit dem Startcodon und die aufgrund der Sequenzanalysen und –vergleiche in den Datenbanken angenommenen Intronstrukturen des Gens. Die genomische Sequenz ist 822 bp lang und enthält zwei mögliche Introns (unterstrichen). Ein Intron hat eine Größe von 49 bp, das andere ist 50 bp lang.



**ABBILDUNG 3.5:** Ergebnisse der RT-PCR-Analysen von *pe1*. Mit den Primern *pe/cDNA* uni und *pe/cDNA* rev wurde die PCR mit 40 Zyklen durchgeführt. Dargestellt ist in den Bahnen PG  $\Rightarrow$  cDNA aus Mycel geerntet aus Polygalakturonsäure-Medium; Pek  $\Rightarrow$  cDNA aus Mycel geerntet aus Pektin-Medium; Mix  $\Rightarrow$  cDNA aus Mycel geerntet aus Medium Polygalakturonsäure/Pektin-Gemisch; ZW  $\Rightarrow$  cDNA aus Mycel geerntet aus Zellwand-Medium; DNA  $\Rightarrow$  PCR mit genomischer DNA als Template. Deutlich zu erkennen ist der Größenunterschied zwischen cDNA- und DNA-Banden von etwa 100 bp. In der aus CM-Medium mit Glukose als alleiniger C-Quelle gewonnenen Probe konnte keine Transkription des *pe1*-Gens nachgewiesen werden.

---

Mit denselben homologen Primern wurde zur Bestätigung der Intron Strukturen eine RT-PCR durchgeführt. Die RNA für diese Ansätze wurde aus Mycel isoliert, das unter induzierenden und nichtinduzierenden Bedingungen gewachsen war. Es wurden nur Banden in den DNA-Proben aus induzierendem Mycel detektiert. ABBILDUNG 3.5 zeigt die Banden dieser RT-PCR. Die cDNA-Templates wurden aus Mycel hergestellt, das in den unterschiedlichen Medien mit Polygalakturonsäure (PG), Pektin (Pek), einem Mix aus beiden oder mit extrahierter Weizenzellwand (ZW) als induzierenden Substraten gewachsen war. Zur Kontrolle wurde zusätzlich eine PCR mit genomischer DNA als Template durchgeführt. Die amplifizierte Bande dieser Reaktion ist etwa 100bp größer als die Banden der RT-PCR-Reaktionen. Wird der Pilz in Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen, konnte keine Bande der *pe1* in der RT-PCR detektiert werden (nicht gezeigt).

### 3. ERGEBNISSE

---

Die Banden der RT-PCR wurden kloniert und sequenziert, um die cDNA-Sequenz zu ermitteln. Auf diese Weise konnten die vermuteten Intron-Strukturen verifiziert werden [ABBILDUNG 3.6 (1)]. Anhand des Triplettcodes konnte die Aminosäuresequenz des Gens abgeleitet werden [ABBILDUNG 3.6 (2)]. Die transkribierte Sequenz des Gens ist 720 bp lang, das entspricht einem translatierten Protein mit 240 Aminosäuren und einer Größe von etwa 25 kDa. Durch den Vergleich mit den Aminosäuresequenzen der aus den beiden anderen *Fusarien*-Arten bekannten Gene und der vorkommenden Aminosäuren konnte voraus gesagt werden, dass das Protein eine Signalsequenz enthält, die 15 Aminosäuren lang ist. Diese wahrscheinliche Signalsequenz ist in ABBILDUNG 3.6 (2) kursiv und grau dargestellt.

---

(1)

**ATGA**AAGTACGCCACTATCCTCGCCCTTGCTGGCGTCTCCTCCGCCGCTGTCACCAAGACTCTTCCC  
AAGTCTGCTGGTGTACATCTTTCCCTACTGCTGTTCCTCGTCAAGGGCAGCTTTGATGGTGGCATG  
AAGCGATTTCGAGCGAAGCACCAACGTTTGCCTAAGGTCAGACAGAGACTGGCGAGAAGGACGCCATG  
TTCATTCTTGAAGCCGGTGCCACTCTTTCCAACGTCATTATCGGTGCTTCTCAAGCTGAGGGTGT  
CACTGCAAGGGAACTTGCACCCTGAACAACGTCCTGGTGGGCGCATGCTGTGAGGACGCCATTACC  
CTCAAGCAAACCAGCGGCACATCCTTTCATCAACGGTGGTGGTGCCTTCAAGGCCCTGACAAGATC  
GTTTCAGTTCAACGGCCGTTGTTACCGTCCAGATCAAGGATTTCTACGCTGAGGACTACGGCAAGCTG  
GTCCCGCAGCTGCGGCAACTGCAAGGACAACGGTGGTCCCTCGCAACGTCATCATCCAGGACTCTGTC  
GCTGTCAACGGCGGTGTCTGTGCGGTATCAACACTAACTACGGCGATACCTGCAAGATCACCAAC  
AGTTGCCAGAACAGCGGCAAGTACTGCGATCGCTACCAGGGTAACTCGGATGGCTCTGAGCCTTCC  
AAGATTGGATCTGGCCCTGATGGAAAGTTCTGCATCACTAGCGGTGCGACCAAGACCTGCT**TAA**

(2)

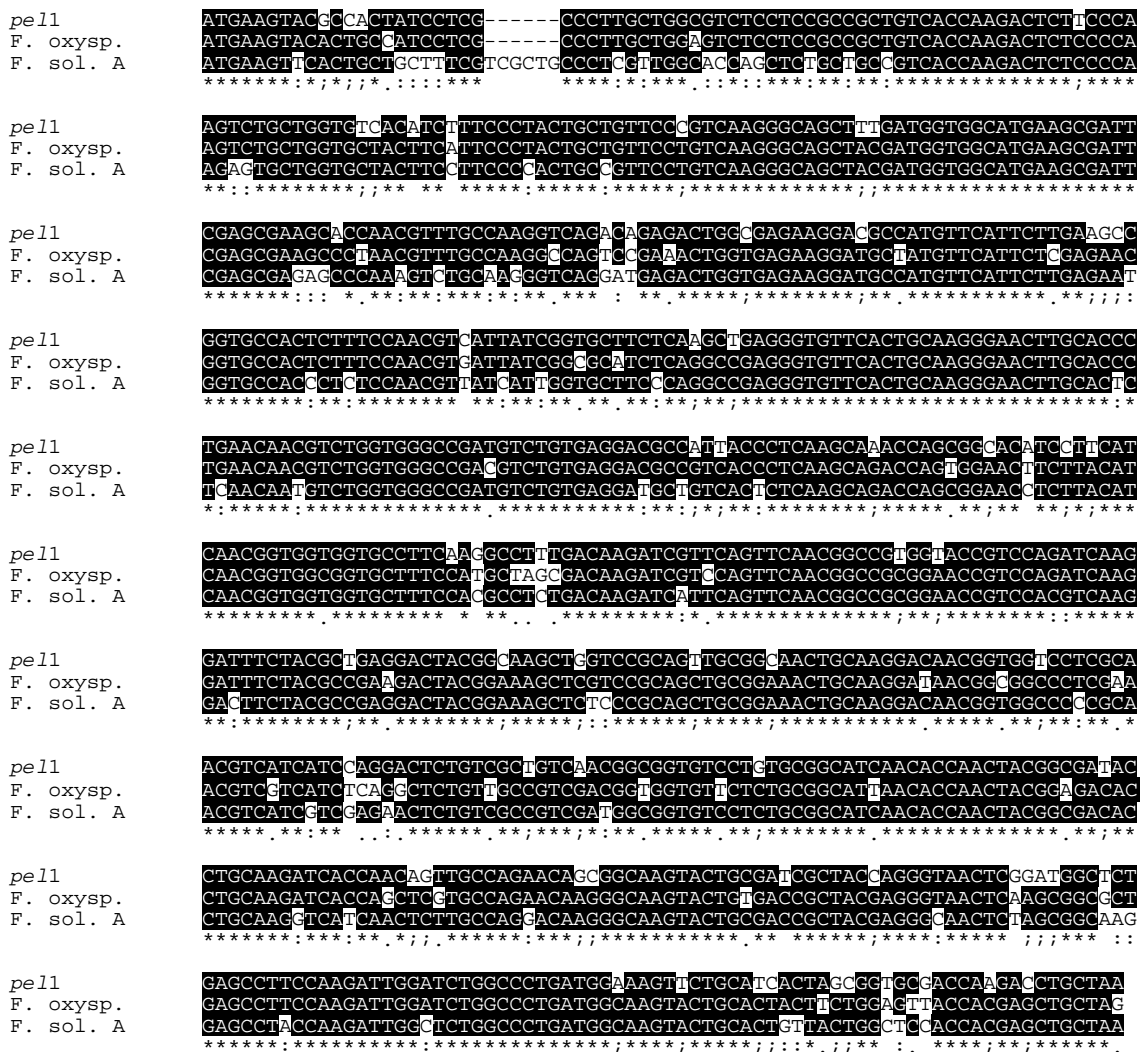
*MKYATILALAGVSSAAVTKTLPKSAGVTSFPTAVPVKGSFDGGMKRFERSTNVCQGQTETSEKDAM*  
*FILEAGATLSNVIIGASQAEGVHCKGTCTLNNVWADVCEDAITLKQTSFINGGGAFKASDKI*  
*VQFNRRGTQIKDFYAEDYGKLVRSNGNCKDNGGPRNVI IQDSVAVNGVLCGINNTNYGDTCKITN*  
*SCQNSGKYCDRYQGNSDGSEPSKIGSGPDGKFCITSGATKTC*

**ABBILDUNG 3.6:** cDNA Sequenz (1) und daraus abgeleitet die Proteinsequenz (2) des *pe1*-Gens aus *F. graminearum*. Die translatierte Sequenz ist 720 bp lang, das entspricht 240 Aminosäuren. Durch RT-PCR wurde das korrekte Spleißen der Intron-Sequenzen aus der genomischen Sequenz bestätigt. Die wahrscheinliche Signalpeptid-Sequenz ist kursiv und grau dargestellt. Das Protein hat eine Größe von ca. 25kDa.

Im weiteren wurde ein Sequenz-Alignment der kompletten cDNA- und Proteinsequenzen mit zwei weiteren Pektat-Lyase-Genen und ihren Produkten aus *F. oxysporum* und *F. solani*, die in ihren Sequenzen sehr ähnlich zu den *pe1*-Sequenzen sind, angelegt. Diese beiden Gensequenzen sind untereinander ebenfalls sehr ähnlich (88%). Wie ABBILDUNGEN 3.7 und 3.8 zeigen, ist *pe1* sowohl auf Nukleotidebene als auch auf Aminosäureebene ebenfalls sehr ähnlich zu den beiden Sequenzen aus den anderen *Fusarien*-Arten. Die Identität zur Pektat-Lyase aus *F. oxysporum* beträgt auf Nukleotidebene 86% (Abb. 3.7), auf Proteinebene 89% (Abb. 3.8). Nahezu ebenso hoch ist die Identität der Sequenzen zum Pektat-Lyase-Gen aus *F. solani*, diese beträgt auf Nukleotidebene 85% (Abb. 3.7) und auf Pro-

### 3. ERGEBNISSE

teinebene 83% (Abb. 3.8). Aus der Familie der pilzlichen Pektat-Lyasen sind drei weitere Gene aus dem Pilz *F. solani* bekannt (*pe1B*, *pe1C* und *pe1D*). Diese sind zu den beiden anderen bekannten Sequenzen aus *F. solani* und *F. oxysporum* vergleichsweise nicht sehr ähnlich (49% bis 64%), bilden jedoch untereinander eine „Sequenz-Unterfamilie“ mit relativ hoher Sequenzidentität. Auch die Homologie zu *pe1* aus *F. graminearum* beträgt nur zwischen 48% und 63% (Alignments nicht gezeigt).



**ABBILDUNG 3.7:** Multiple Sequence Alignment der cDNA-Nukleotidsequenzen von *pe1* aus *F. graminearum* mit den Sequenzen der Pektat-Lyasen aus *F. oxysporum* und *F. solani* (PL A). Die Homologie von *pe1* zur *F. oxysporum* Sequenz beträgt 86%, zur *F. solani* Sequenz 85%.

*pe1* ⇒ Pektat-Lyase 1 aus *F. graminearum*; *F. oxysp.* ⇒ Pektat-Lyase aus *F. oxysporum*; *F. sol.* A ⇒ Pektat-Lyase A aus *F. solani*; \* ⇒ identische Nukleotide in allen Sequenzen; : ⇒ gleiche Basen in *pe1* und *F. oxysp.*; . ⇒ gleiche Nukleotide in *pe1* und PL A; ; ⇒ gleiche Sequenzen in PL A und *F. oxysp.*; unterschiedliche Nukleotide in allen drei Sequenzen sind durch ein Leerzeichen gekennzeichnet.

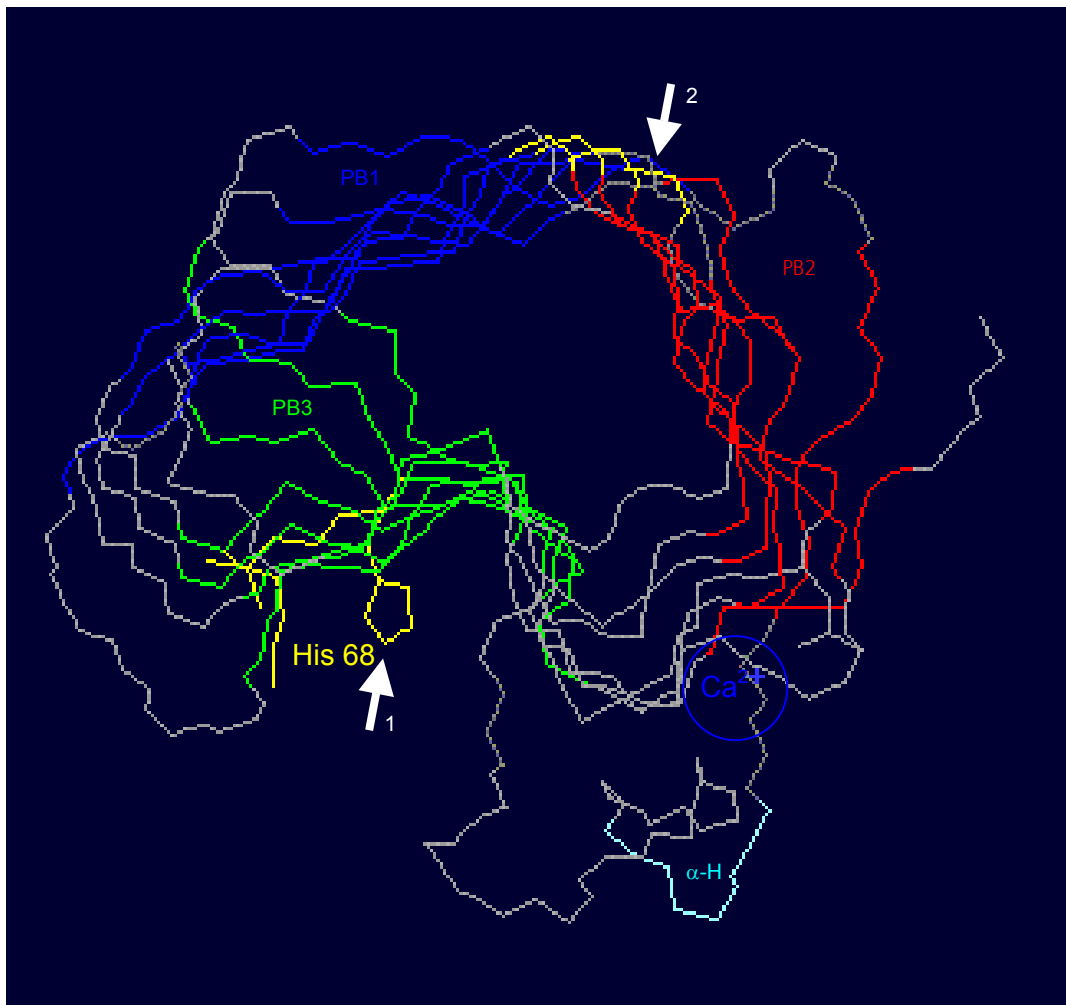


### 3. ERGEBNISSE

---

Proteins.

---



**ABBILDUNG 3.9:** Computer-Modell der dreidimensionalen Struktur der Pektat-Lyase 1 von *F. graminearum*. Das Modell wurde mit dem Programm Swiss-Model berechnet (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>).

Gekennzeichnet mit Pfeil 1 ist das invariante Histidin im vermuteten aktiven Zentrum des Proteins, Pfeil 2 zeigt auf die charakteristische Asn-Leiter (gelb) der Pektat-Lyasen dieser Klasse. Die für die Substratbindung essentielle  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindedomäne ist blau gezeichnet. Die charakteristische Struktur aus parallelen  $\beta$ -Faltblättern (PB1, PB2 und PB3) ist in blau, rot und grün wiedergegeben, diese werden durch die Turn-Regionen unterbrochen. Die ebenfalls charakteristische  $\alpha$ -Helix Struktur ( $\alpha$ -H) am C-terminalen Ende des Proteins ist in hellblau gekennzeichnet.

---

#### 3.1.4 INDUKTION IM ZEITLICHEN VERLAUF

Da es sich bei der Pektat-Lyase 1 um ein induzierbares Enzym handelt, wurden Untersuchungen bezüglich der Transkription im zeitlichen Verlauf durchgeführt. Dazu wurde der Pilz nach 18stündiger Vorinkubation in CM-Medium in die verschiedenen Induktionsmedien übertragen und das Mycel zur Isolation von RNA zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktionsbeginn geerntet. In ABBILDUNG 3.10 ist das

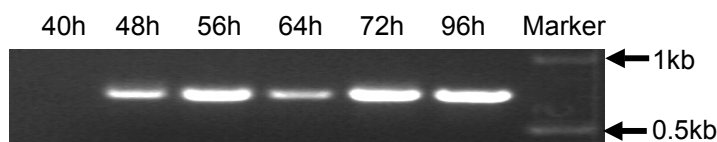
---



### 3. ERGEBNISSE

---

Ergebnis für den Ansatz mit Weizenzellwand als Induktor wiedergegeben. Zu erkennen ist, dass unter den gewählten Bedingungen 40 Stunden nach Induktionsbeginn noch kein Transkript von *pe1* nachweisbar ist. Wird der Pilz 48 Stunden lang im Induktionsmedium inkubiert, kann ein Transkript nachgewiesen werden. Genau so konnte die Bande zu den weiteren Zeitpunkten bis 96 Stunden nach Induktionsbeginn nachgewiesen werden. Zu späteren Zeitpunkten der Inkubation sind keine Proben entnommen worden. Aufgetragen sind in den einzelnen Spuren gleiche Volumina der PCR-Reaktion, so dass es sich nicht um einen quantitativen Nachweis der Transkription handelt. Der zeitliche Verlauf der Induktion ist bei den weiteren Induktionsmedien mit Pektin und Polygalakturonsäure unter diesen Versuchsbedingungen identisch, d.h. auch hier konnte das erste Transkript in der Probe 48 Stunden nach Induktionsbeginn nachgewiesen werden.



**ABBILDUNG 3.10:** zeitlicher Verlauf der Induktion der Transkription des *pe1*-Gens von *F. graminearum* in Zellwand-Medium. Das Mycel wurde nach 40, 48, 56, 64, 72 und 96 Stunden geerntet und cDNA präpariert. Während in der 40 Stunden Probe noch kein nachweisbares Transkriptionsprodukt vorhanden ist, ist eine Bande in der Größe der cDNA Bande des *pe1*-Gens in allen anderen Proben zu sehen.

---

#### 3.1.5 IN PLANTA-UNTERSUCHUNGEN

Nachdem die *in vitro*-Experimente gezeigt haben, dass die Pektat-Lyase 1 unter Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle reprimiert, durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle zu Substraten des Enzyms jedoch induzierbar ist, sollte nun in weiteren Beobachtungen die Situation in der Infektion des Wirtes Weizen untersucht werden. Dazu wurden die Blüten der Weizenpflanzen der Sorte Bobby White mit einer Sporensuspension des Pilzes inokuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten infizierte und gesunde Kontroll-Ähren geerntet. Mittels PCR und RT-PCR Experimenten wurde der Nachweis der Transkription der *pe1*-Gene in der Pflanze geführt. ABBILDUNG 3.11 zeigt den Vergleich einer infizierten Ähre 28 Tage nach Inokulation mit den Pilzsporen und der gesunden Ähre einer gleich alten, nicht-infizierten Kontrollpflanze. Während die Ähre der Kontrollpflanze weiterhin im normalen Wachstum ist, ist bei der infizierten Ähre das deutliche Ausbleichen der Ährchen und die „strubbelige“ Erscheinung der Grannen zu erkennen.

### 3. ERGEBNISSE

---



**ABBILDUNG 3.11:** Vergleich einer infizierten - (links) und einer Kontrollähre (rechts) gleichen Alters 28 Tage nach Inokulation mit einer Sporensuspension von *F. graminearum* bzw. Wasser. Zu erkennen ist das Ausbleichen der infizierten Ährchen und die „strubbelige“ Anordnung der Grannen im Vergleich zur Kontrolle.

---

Aus infizierten und nicht-infizierten Pflanzen wurde RNA präpariert und eine RT-PCR mit daraus gewonnener cDNA als Template, sowie als Kontrollen mit genomischer *F. graminearum* DNA als Template bzw. mit DNA aus infiziertem und nicht infiziertem Pflanzenmaterial, durchgeführt. In keinem Fall ist es bisher gelungen, ein Transkript des *pel1*-Gens in den infizierten Pflanzen nachzuweisen. Die Kontrollen mit genomischer DNA oder mit den aus den *in vitro*-Versuchen gewonnenen RNAs lieferten immer eindeutig positive Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Durch die PCR-Reaktionen mit genomischer DNA aus den infizierten Weizenähren konnte der Nachweis geführt werden, dass der Pilz auf der Ähre gewachsen ist, hier konnte eine PCR-Bande erhalten werden, die nach Auswertung der Sequenzinformation als genomische Sequenz des *pel1*-Gens identifiziert wurde.

#### 3.1.6 HETEROLOGE PROTEINEXPRESSION UND ENZYMCHARAKTERISIERUNG

Zur Charakterisierung des Enzyms auf biochemischer Ebene sollte das Protein heterolog überexprimiert werden. Zunächst wurde dazu das System *E. coli* mit dem Expressionsvektor pQE 80 gewählt. Eine Expression des Proteins in *E. coli* war jedoch unter den gewählten Bedingungen nicht möglich. In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, dass eine heterologe Expression pilzlicher Lyasen in Bakterien nicht funktioniert.

Deshalb wurde für die weiteren Untersuchungen das pilzliche System *Aspergillus niger* ausgewählt. Mit dem kodierenden Gen *pel1* wurde der Expressionsvektor pHex1 konstruiert (2.6.3). Unter der Regulation des Pyruvat-Kinase Promotors aus *A. niger* sollte das Enzym in diesem Pilz heterolog exprimiert werden. Die Transfor-

### 3. ERGEBNISSE

---

mation, heterologe Expression in *A. niger* und die Aufreinigung sind von Dr. J. A. E. Benen in Wageningen durchgeführt worden. Mittlerweile sind die Techniken zur Transformation von *A. niger* auch in unseren Labors etabliert worden. Die biochemische Charakterisierung ist von J. Moldenhauer im Rahmen ihrer Diplomarbeit in den Laboren von Dr. Benen in Wageningen und Prof. Moerschbacher in Münster durchgeführt worden und kann eingehend in dieser Arbeit nachgelesen werden [Moldenhauer, 2003]. Hier soll nur kurz auf einige erste Ergebnisse dieser Charakterisierungen eingegangen werden. Zunächst wurden die Reaktionsparameter hinsichtlich des optimalen pH-Wertes für die Untersuchungen, sowie der optimalen Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und  $\text{Na}^{+}$ -Ionen bestimmt. Das pH-Optimum liegt bei pH 9.5, die optimale Kalzium-Konzentration bei 0.75 mM und die optimale Natrium-Konzentration bei 10 mM. Durch den Abbau von verschiedenen Pektin-Substraten hat Moldenhauer zudem festgestellt, dass das Enzym einen Endo-Spaltmechanismus hat, da über einen Versuchszeitraum von 240 Minuten zunächst verstärkt Oligogalakturonide mit höherer Kettenlänge entstehen. Weiterhin wurden Pektine mit verschiedenen durchschnittlichen Methylierungsgraden als Substrate für das aufgereinigte Protein in die Reaktion eingesetzt. Mit Hilfe spektrophotometrischer Messungen konnte gezeigt werden, dass die Pektat-Lyase 1 aus *F. graminearum* in der Lage ist, Pektine mit wenig Methylveresterungen ebenso als Substrate zu verwenden wie Pektin, das hoch-methylverestert ist. Unter den zuvor beschriebenen Bedingungen konnte Pektin, das einen mittleren Veresterungsgrad von durchschnittlich 45% besitzt, am besten abgebaut werden.

Mit dem aufgereinigten Protein wurden dann unter den vorgenannten Bedingungen mit Oligogalakturoniden von definierter Länge als Substraten die Reaktionsraten und die relativen Schnittfrequenzen innerhalb dieser Oligosaccharide bestimmt. TABELLE 3.1 zeigt die relativen Schnittfrequenzen des Enzyms aus *F. graminearum* bei verschiedenen  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen und den Vergleich zur Pektat-Lyase A aus *A. niger*. Für das Enzym aus *F. graminearum* wurden zusätzlich zur optimalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen von 0.75mM Konzentrationen von 0.075mM und 7.5mM eingesetzt. Es zeigt sich erneut, dass das Enzym bei der Konzentration von 0.75mM  $\text{Ca}^{2+}$  optimal arbeitet. Dies wird unter den gewählten Testbedingungen mit dem Penta- und dem Hexamer als Substrat am deutlichsten. Auffällig ist aber auch, dass sich bei höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen das Muster der Spaltung des Substrates in Richtung des reduzierenden Endes des Substrats verschiebt.

Im Gegensatz dazu benötigt das Enzym aus *Aspergillus* viel höhere  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentrationen, um seine optimale Reaktionsrate zu erreichen. Eingesetzt wurden in die Tests Konzentrationen von 0.1 mM, 1 mM und 10 mM, die weitaus höchsten Reaktionsraten konnten mit 10mM  $\text{CaCl}_2$  erzielt werden (bis zu 332  $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

### 3. ERGEBNISSE

---

tionsraten konnten mit 10mM CaCl<sub>2</sub> erzielt werden (bis zu 332 U\*ml<sup>-1</sup>). Höhere Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen können in den Test nicht eingesetzt werden, da es dann zu einer Präzipitation der Oligogalakturonid-Substrate kommt. In die Untersuchungen sind Oligogalakturonide mit Kettenlängen zwischen drei und sieben Galakturonsäure-Monomeren eingesetzt worden. Für beide Enzyme konnte festgestellt werden, dass bevorzugt Oligogalakturonide mit längerer Kettenlänge gespalten wurden, da die Reaktionsraten mit steigender Kettenlänge ebenfalls ansteigen. Während das *Fusarium* Enzym in der Lage ist, das Trimer der Galakturonsäure als kleinstes Substrat zu verwenden und als kleinstes nicht-reduzierendes Produkt der Spaltung ein Dimer zu produzieren, ist das kleinste spaltbare Oligomer für das *Aspergillus* Enzym das Tetramer, als kleinstes nicht-reduzierendes Spaltprodukt entsteht in diesem Fall ein Trimer, das nicht weiter gespalten wird. Das Galakturonsäure-Dimer konnte von keinem der beiden Enzyme unter den gewählten Reaktionsbedingungen weiter gespalten werden. Mit steigender Kettenlänge verschiebt sich das Muster bei beiden Enzymen hin zu größeren nicht-reduzierenden Spaltprodukten, wobei das Endprodukt der Spaltung des *Fusarium* Enzyms weiterhin das Galakturonsäure-Dimer ist. Das Fenster der Produkte bei der Pektat-Lyase aus *A. niger* reicht anscheinend nur vom Trimer bis zum Pentamer. Das Enzym aus *F. graminearum* spaltet von dem Heptamer noch bevorzugt (49%) zunächst ein nicht-reduzierendes Hexamer ab, während das Pentamer nur zu 35%, das Tetramer zu 10% und die noch kleineren Fragmente zu unter 5% entstehen. Ein Hexamer als Spaltprodukt des *Aspergillus* Enzyms konnte unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht detektiert werden. Ebenfalls genauer charakterisiert werden sollte der lytische Abbau von Weizenzellwand-Pektinen mit dem gereinigten Enzym aus *F. graminearum*. Eingesetzt wurden Zellwände bzw. aufgereinigte Pektine aus einer rost-anfälligen (sr5) und einer rost-resistenten (Sr5) Weizensorte (Resistenz gegen *P. graminis*). Die Ergebnisse dieser Arbeiten finden sich bei Moldenhauer [2003].

### 3. ERGEBNISSE

**TABELLE 3.1:** relative Schnittfrequenzraten und Reaktionsraten der *A. niger* und *F. graminearum* Pektat-Lyasen bei der Spaltung von Oligogalakturoniden von definierter Länge

DP	CaCl <sub>2</sub> mM									Rate U*ml <sup>-1</sup>
3										
An	1									0
Fg	0.75									7
4										
An	0.1									0
An	1									1
An	10									9
Fg	0.075									2
Fg	0.75									43
Fg	7.5									46
5										
An	0.1									1
An	1									17
An	10									106
Fg	0.075									17
Fg	0.75									106
Fg	7.5									42
6										
An	0.1									6
An	1									95
An	10									332
Fg	0.075									41
Fg	0.75									131
Fg	7.5									66
7										
An	1									164
Fg	0.75									192

Die relativen Schnittfrequenzen sind in Prozent angegeben. Das reduzierende Ende der Oligogalakturonide ist in fetten Buchstaben (G) gedruckt. DP: Polymerisationsgrad der Oligogalakturonide; U\*ml<sup>-1</sup>: Units pro Milliliter; An: *A. niger*; Fg: *F. graminearum*, Versuche durchgeführt von J. Moldenhauer [2003].

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1.7 PROMOTORSTUDIEN

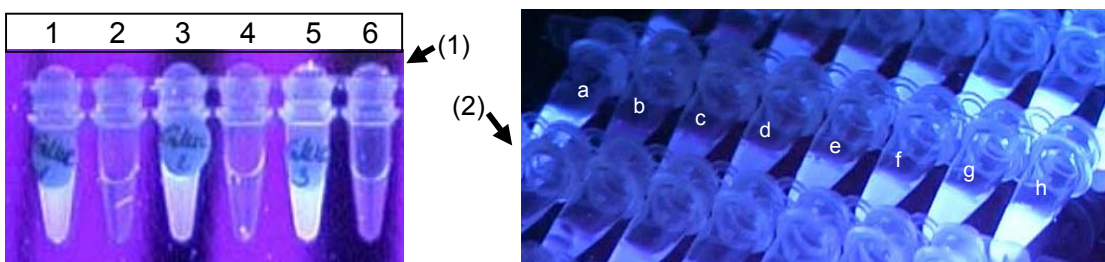
Da es sich bei der Pektat-Lyase 1 aus *F. graminearum* um ein induzierbares Gen handelt, sollte die Rolle des Promotors für die Induktion dieses Gens analysiert werden. Fernziel der Studien sollte sein, Bindedomänen im Promotor von *pel1* zu finden, die die Induktion der Transkription steuern. Die Ergebnisse der während dieser Arbeit durchgeführten, initialen Studien sind im Folgenden dargestellt. Die Versuche wurden zunächst wieder in *E. coli* durchgeführt, als zusätzliches eukaryontisches System wurde *A. niger* verwendet.

##### 3.1.7.1 KONSTRUKTION DER VEKTOREN pPROMO1 UND pPROMO2

Zwei verschieden lange Fragmente des Promotors wurden in Verbindung mit dem  $\beta$ -Glukuronidase-Gen (GUS) in den Vektor pCB1003 kloniert, es entstanden die Vektoren pPromo1 und pPromo2 (2.6.2). Das Promotorfragment in pPromo1 ist 756 bp lang, in pPromo2 ist ein Promotorfragment von 358 bp Länge inkloniert worden.

##### 3.1.7.2 VERSUCHE IN *E. COLI*

Erste Versuche zur Aktivität des Promotors wurden in *E. coli* mit dem Plasmid pPromo1 durchgeführt. In ABBILDUNG 3.12 dargestellt ist ein Test auf  $\beta$ -Glukuronidase Aktivität in *E. coli*-Zellen. In ABBILDUNG 3.12 (1) sind die Vorversuche



**ABBILDUNG 3.12:** Promotoraktivität in *E. coli*; (1) Vergleich zwischen CM-Medium und Induktionsmedium; (2) in den Induktionsmedien mit verschiedenen Konzentrationen an Induktor.

(1) Vergleich zwischen Wachstum der *E. coli*-Zellen in Polygalakturonsäure-Medium ohne Glukose (0.5% PG; 1; 3; 5) und mit Glukose (0.5%; 2; 4; 6). In den Proben mit PG ist eine  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität nachweisbar (helles Leuchten unter UV), die Zellen die in Medium mit Glukose gewachsen sind haben keine Enzymaktivität (kein Leuchten).

(2) Wachstum der *E. coli*-Zellen in Pektin- oder Polygalakturonsäure-Medium ohne Glukose; jeweils ganz links (a) Konzentration an Induktor 0.2%, dann aufsteigend (b-h) 0.001%; 0.0025%; 0.005%; 0.01%; 0.025%; 0.05% und 0.1% Induktor im Medium.

Je intensiver die Proben leuchten, desto höher ist die Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase.

### 3. ERGEBNISSE

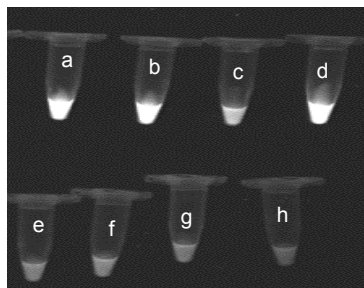
---

wiedergegeben, bei denen die Zellen in Polygalakturonsäure-Medium (PG) und in CM-Medium mit Glukose als C-Quelle (jeweils 0.5%) inkubiert wurden. Anzumerken ist, dass die *E. coli*-Zellen in den Induktionsmedien sehr schlecht wuchsen und die Biomasse im Vergleich zu dem Glukose Medium deutlich geringer ausfiel. Eine Messung des Proteingehalts war mit den herkömmlichen Methoden in diesen Proben nicht möglich, so dass bei den Tests gleiche Volumina des Überstandes eingesetzt wurden und nicht gleiche Proteinmengen. In den Reaktionsgefäßen eins, drei und fünf wurden drei voneinander unabhängige Transformanten in Medium mit PG inkubiert. Hier ist in allen Fällen eine deutliche Fluoreszenz zu erkennen. Gleiche Ergebnisse ergaben sich, wenn die Bakterien in den verschiedenen anderen Induktionsmedien angezogen wurden. In den Proben zwei, vier und sechs wurden die Überstände der gleichen Transformanten, die im Unterschied jedoch in Medien mit Glukose angezogen worden waren, eingesetzt. Diese Proben fluoreszieren nicht.

ABBILDUNG 3.12 (2) zeigt das Ergebnis der Induktionsreihen. Jeweils ganz links (a) wurde die Probe eingesetzt, die in Medium mit der höchsten Konzentration an Induktor (0.2%) inkubiert worden war. Die anschließenden Reaktionsgefäße enthalten Überstände der Proben, die in Medien mit ansteigender Konzentration an Induktor angezogen worden sind [(b) 0.001%; (c) 0.0025%; (d) 0.005%; (e) 0.01%; (f) 0.025%; (g) 0.05% und (h) 0.1% Induktor]. Mit ansteigender Konzentration an Induktor im Medium steigt auch die Intensität der Fluoreszenz im Test, d.h. die Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase. Anzumerken ist, dass die Bakterien in den Medien mit den sehr geringen Konzentrationen an Induktor fast gar nicht gewachsen waren und möglicherweise dadurch eine zu geringe Biomasse produziert wurde, um in den Tests positive Ergebnisse zu liefern.

Im weiteren sollte untersucht werden, ob die Konzentration an Glukose im Medium

---



**ABBILDUNG 3.13:** Promotoraktivität in *E. coli*; Test mit verschiedenen Konzentrationen an Glukose beim Wachstum im CM-Medium. Glukose-Konzentrationen: (a) 0.1mM; (b) 0.5mM; (c) 1mM; (d) 2.5mM; (e) 5mM; (f) 10mM; (g) 50mM und (h) 100mM. Während in den Proben (a) bis (d) deutliche Fluoreszenz und damit  $\beta$ -Glukuronidase Aktivität zu messen war, war in den Proben (e) bis (h) keine Aktivität nachweisbar.

### 3. ERGEBNISSE

---

einen Einfluß auf die Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase hat. Dazu wurden die transformierten *E. coli* in Medien inkubiert, die verschiedene Konzentrationen an Glukose ohne Induktor enthielten. Nach 24stündigem Wachstum in diesen Medien wurden die Zellen geerntet und erneut ein Test auf Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase durchgeführt. ABBILDUNG 3.13 zeigt eine deutliche Fluoreszenz in den Proben, die aus den Medien mit vergleichsweise geringer Glukose-Konzentration gewonnen wurden (a-d; 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM). Bis zu einer Konzentration von 2.5 mM Glukose konnte eine Aktivität des Enzyms nachgewiesen werden. In den Proben, die aus den Medien mit 5 mM Glukose und mehr gewonnen wurden, war dagegen eine Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase nicht mehr nachweisbar (e-h).

Die in den Vorversuchen eingesetzte Konzentration an Glukose [Abbildung 3.12 (1)] liegt bei 0.5%, das entspricht etwa 28 mM. Der Promotor der *peI1* ist also auch unter Glukose-Bedingungen in *E. coli* aktiv, die Aktivität des Promotors in den Bakterien ist scheinbar konstitutiv vorhanden. Eine hohe Konzentration an Glukose hemmt die  $\beta$ -Glukuronidase Aktivität direkt.

Aus diesem Grund wurden die weiteren Experimente in dem pilzlichen System *A. niger* durchgeführt.

#### 3.1.7.3 VERSUCHE IN *A. NIGER*

Als Alternative zu den Untersuchungen in *E. coli* wurden die Promotorstudien in dem pilzlichen System *Aspergillus niger* durchgeführt. Protoplasten dieses Pilzes wurden mit den unter 2.6.2.2 beschriebenen Vektoren transformiert (2.7.2). In der nachfolgenden TABELLE 3.2 sind die Transformationsraten für die einzelnen Konstrukte dargestellt:

---

**TABELLE 3.2:** Transformationseffizienz in *A. niger*. In der rechten Spalte sind die Bezeichnungen der transformierenden Konstrukte aufgeführt, in der linken Spalte die erzielten Transformanten pro ca.  $2 \times 10^5$  Protoplasten. Die angegebenen Werte sind Ergebnisse aus zwei unabhängigen Transformationsansätzen.

Konstrukt	Transformanten pro $2 \times 10^5$ Protoplasten
pCB1003	61 // 41
pPromo1	28 // 13
pPromo2	0 // 1

---

Es wurden zwei voneinander unabhängige Transformationsansätze durchgeführt.

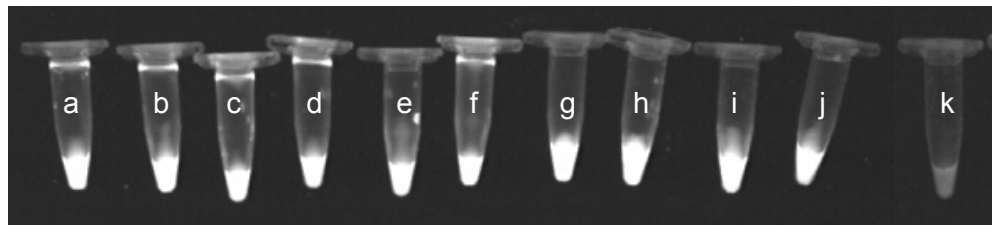
---



### 3. ERGEBNISSE

---

Die angegebenen Werte geben die Anzahl der Kolonien wieder, die auf den ursprünglichen MMS-Platten gewachsen sind und anschließend auf CM-Platten überführt wurden. Die höchste Transformationseffizienz konnte mit dem Kontrollvektor pCB1003 erreicht werden, mit dem im ersten Versuch 61 potentielle Transformanten erhalten wurden. Im zweiten Versuch sind 41 einzelne Kolonien gewachsen. Jeweils vier Kolonien dieser Kontrollansätze wurden auf CM-Hygro-Platten überführt.



**ABBILDUNG 3.14:** GUS-Test mit den Promotor-Transformanten in *A. niger*. a bis j: zehn unabhängige Transformanten jeweils mit dem 756 bp Promotorfragment. Der Pilz wurde in einem Medium angezogen, das 0.1% Pektin und 0.1% Polygalakturonsäure als Kohlenstoffquelle enthält. k: Negativ Kontrolle des Transformanten a, Anzucht in CM-Medium mit Glukose (2.5 mM) als Kohlenstoffquelle.

---

Eine befriedigende Effizienz wurde mit dem Konstrukt pPromo1 erreicht, mit dem im ersten Versuch 28, im zweiten Versuch 13 Transformanten erzielt werden konnten. Mit der Vektortransformation pPromo2 war im ersten Versuch kein-, im zweiten Versuch nur ein potentieller Transformant gewachsen. Die Transformanten wurden auf frische CM-Platten überführt und weitere zwei Tage inkubiert, alle Kulturen sind auf diesen Platten angewachsen. Zur Kontrolle der Promotoraktivität wurden anschließend Flüssigkulturen in CM-Medium angesetzt. Auch in diesen Kulturen ist der Pilz in Standkultur angewachsen. Die Promotoraktivität konnte erneut mit Hilfe des GUS-Tests nachgewiesen werden. In ABBILDUNG 3.14 sind die Ergebnisse dieses GUS-Tests dargestellt. Zehn unabhängige Transformanten mit dem Konstrukt pPromo1 wurden jeweils in CM-Medium mit Glukose (2.5 mM) als Kohlenstoffquelle und in einem zweiten Ansatz mit einem Mix aus Polygalakturonsäure (0.1%) und Pektin (0.1%) als Kohlenstoffquelle angezogen.

Die Proben a bis j zeigen die Ergebnisse des GUS-Tests mit den in Induktionsmedium gewachsenen Kulturen. Die helle Fluoreszenz der Proben deutet auf Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase hin. In der Probe k wurde der gleiche Transformant wie in Ansatz a in den Test eingesetzt, jedoch in CM-Medium mit 2.5 mM Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. In dieser Probe ist keine Fluoreszenz zu erkennen. Der einzige potentielle Transformant mit dem Konstrukt pPromo2 wurde ebenfalls

### 3. ERGEBNISSE

---

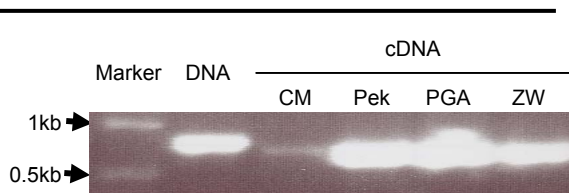
auf Aktivität der  $\beta$ -Glukuronidase getestet, das Ergebnis dieses Tests war negativ.

#### 3.2 PEKTAT LYASE 2

Aus den Vorversuchen war ersichtlich, dass *F. graminearum* mindestens noch ein zweites Pektat-Lyase Gen besitzt (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). Auch die Sequenz und Struktur dieses zweiten Gens sollten bestimmt werden. Hierzu konnten erneut die angelegten subgenomischen Banken gescreent werden. Da dieses Vorgehen jedoch sehr kompliziert ist, wurden alternative Ansätze für die Identifikation des *pel2*-Gens gewählt. Im folgenden (3.2.1 bis 3.2.4) sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

##### 3.2.1 SEQUENZANALYSEN

Mit degenerierten Primern, abgeleitet von den *pelC* und *pelD* Sequenzen aus *F. solani*, wurde versucht, das 5'-Ende des Gens zu amplifizieren. Diese Sequenzen wurden gewählt, da ihre Ähnlichkeit zu dem bisher bekannten Fragment der *pel2* am größten war. Ausgehend von dem bekannten 300bp-Fragment wurde mit der Inversen PCR-Technik das 3'-Ende des Gens amplifiziert. Mit diesen Versuchen und der anschließenden Klonierung und Sequenzierung der erhaltenen Amplikons konnte die gesamte Sequenzinformation des *pel2*-Gens aus *F. graminearum* erhalten werden. Zur Bestätigung der Informationen wurden mit homologen Primern erneut PCR- und RT-PCR-Reaktionen und eine erneute Sequenzierung der erhaltenen Amplikons durchgeführt.



**ABBILDUNG 3.15:** PCR-Banden der Pektat-Lyase 2. Ganz Links aufgetragen ist die 1kb DNA Leiter, die obere Bande entspricht 1 kb, die untere 0.5 kb. In Spur 2 ist die Bande aus genomischer DNA als Template dargestellt, die 863 bp groß ist. In den Spuren drei, vier, fünf und sechs sind cDNA Banden dargestellt, die cDNA wurde aus Mycel isoliert, das in CM-Medium (CM), Pektin-Medium (Pek), Polygalakturonsäure-Medium (PGA) oder Zellwand-Medium (ZW) angezogen wurde. Die cDNA Banden haben eine Größe von 699 bp.

---

### 3. ERGEBNISSE

ABBILDUNG 3.15 zeigt die PCR-Banden, die mit genomischer DNA und cDNA als Template gewonnen wurden. In der ersten Spur ist der 1 kb-Marker aufgetragen. In Spur 1 ist die Bande wiedergegeben, die mit genomischer DNA als Template in der PCR gewonnen werden konnte, mit einer Größe von 863 bp. Die Spuren drei bis sechs zeigen die Banden mit cDNA als Template in der PCR Reaktion. Diese haben eine Größe von 699 bp. Die cDNA wurde aus Mycel gewonnen, das in CM-Medium (CM), Pektin-Medium (Pek), Polygalakturonsäure-Medium (PGA) oder Zellwand-Medium (ZW) angezogen worden war. Mit cDNA aus Mycel, das in CM-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle gewachsen ist, ergab sich für *pel2* ebenfalls eine Bande, die jedoch im Vergleich zu den Induktionsmedien deutlich schwächer war.

(1)

```
ATGCACGCTCCCAGCCTTATCGCCGTTCTTTCTACCCTTCTGCTGCCATGGCATGCCTTGGCTACCCGGGCGGTGTCCCAA
AGCCACTGGCACCAGTCCCTCAGCGCGCCCGGATACCTCAAGAAGGGAGAGGTTTTTCGATGCTAAGTGGGTTTCGCTATGACC
GCGGTGTCAAGTGCAGTGGTCAGAGCGAGGGTGGTAGGATTCCTAGAACTCTATTTTTTCGTTTTATGAGATGACACAGAAC
AGGTGAGAAGGATGCAGTCTTTGTCTCGAAGACGGCGCAACTCTTCGCAACGTCGTCATCGGTGCCAACAAAAGGAGGGCG
TCCATTTGTCTCGGCGCTGCACCCTAGAGTTTGTCTGGTTCGAGGACGTTTTCGCGAGGATGCCATTACTATCAAGGGTAGTGGA
ACCGCCAACATCATCGGTGGTGGTCTTACAAGGCCGCGACAAGGTCATTACGACACAACGCTGTGGTCAAGTCAACGTTTGT
CAACTTCTGTACGTTTCCAGTTATATCTGATCTTTTTCTTTGCTAACTTGTGTAGACGCCAACGCTACGGCAAAGTCTACCG
ATCTTGGCGTAAGTCAAGGGCAACTCCAAGTGAAGCGATCCGTTTACATGGAAGGTGTCACTGTGTCAACGGCGGTGAGC
TCATGGTATCAACCAACCTCGTGGCAAGGTGAGTTGGTCTTTTACTAGATTGATGAGGGTACTAATTGTTGTATG
CAGCGGATAAGGCTACATACAGCAACAACCTGCTTCCCAAGACCCAGTGCAGGGCTTCAAGGGATGCGACAAGGCTAACGGC
GAGTGGATCCTTCCAAGGCCAGGGAGTGTCTAG
```

(2)

```
ATGCACGCTCCCAGCCTTATCGCCGTTCTTTCTACCCTTCTGCTGCCATGGCATGCCTTGGCTACCCGGGCGGTGTCCCAA
AGCCACTGGCACCAGTCCCTCAGCGCGCCCGGATACCTCAAGAAGGGAGAGGTTTTTCGATGCTAAGTGGGTTTCGCTATGACC
GCGGTGTCAAGTGCAGTGGTCAGAGCGAGGGTGGTGAGAAGGATGCAGTCTTTGTCTCGAAGACGGCGCAACTCTTCGCAAC
GTCGTCATCGGTGCCAACAAAAGGAGGGCGTCCATTGTCTCGGCGCCTGCACCCTAGAGTTTGTCTGGTTCGAGGACGTTTGT
CGAGGATGCCATTACTATCAAGGGTAGTGGAACCGCCAACATCATCGGTGGTGGTCTTACAAGGCCGCGACAAGGTCATTC
AGCAACAGGCTGTGGTCAAGTCAAGCTTGTCAACTTCTACGCCAACGCTACGGCAAAGTCTACCGATCTTTCGGTAACTGC
AAGGGCAACTCCAAGTGAAGCGATCCGTTTACATGGAAGGTGTCACTGTGTCAACGGCGGTGAGTCTATGGTATCAACAC
CAACCTCGGCGATAAGGCTACATACAGCAACAACCTGCTTCCCAAGACCCAGTGCAGGGCTTCAAGGGATGCGACAAGGCTA
ACGGCAGTGGATCCTTCCAAGGCCAGGGAGTGTCTAG
```

(3)

```
MHAPSLIAVLSTLPAAMACLGYPGGVPKATGKLSLAPRYLKKGEVFDKAWVRYDRGVKCTGQSEGGEKDAVFVLEDGATLNR
VVIGANQKEGVHCLGACTLEFVWFEDVCEDAITIKSGTANIIGGAYKAADKVIQHNGCGHVNVNFYANAYGKVYRSCGNC
KGNKCKRSVHMEGVTAVNGGELIGINTNLGDKATYSNNCFPKTQCQGFKGCDKANGCEDPSKAREC
```

**ABBILDUNG 3.16:** Pektat-Lyase 2; genomische- (1), cDNA Sequenz (2) und daraus abgeleitet die zweidimensionale Proteinsequenz (3) des *pel1*-Gens aus *F. graminearum*. Die translatierte Sequenz ist 699bp lang, das entspricht 233 Aminosäuren. Die Introns in der genomischen Sequenz sind grau hinterlegt und kursiv dargestellt, durch RT-PCR wurde das korrekte Splicen der Intron-Sequenzen aus der genomischen Sequenz bestätigt. Die wahrscheinliche Signalpeptid-Sequenz des Proteins ist grau und kursiv dargestellt.

In ABBILDUNG 3.16 ist die genomische-, die cDNA- und die abgeleitete Proteinsequenz der Pektat-Lyase 2 wiedergegeben. Die genomische Sequenz enthält drei mögliche Intronstrukturen, deren Existenz und das korrekte Spleißen durch Analyse der cDNA bestätigt werden konnten. Die Introns sind zusammen 161 bp lang [52 bp, 47 bp und 62 bp, in der ABBILDUNG 3.16 (1) grau und kursiv dargestellt], womit sich eine Gesamtlänge der genomischen Sequenz von 863 bp ergibt. Die cDNA-Sequenz ist abzüglich des Stopp-Codons 699 bp lang [ABBILDUNG 3.16 (2)], was ei-



### 3. ERGEBNISSE

---

#### 3.2.2 VERGLEICH DER SEQUENZ-ALIGNMENTS

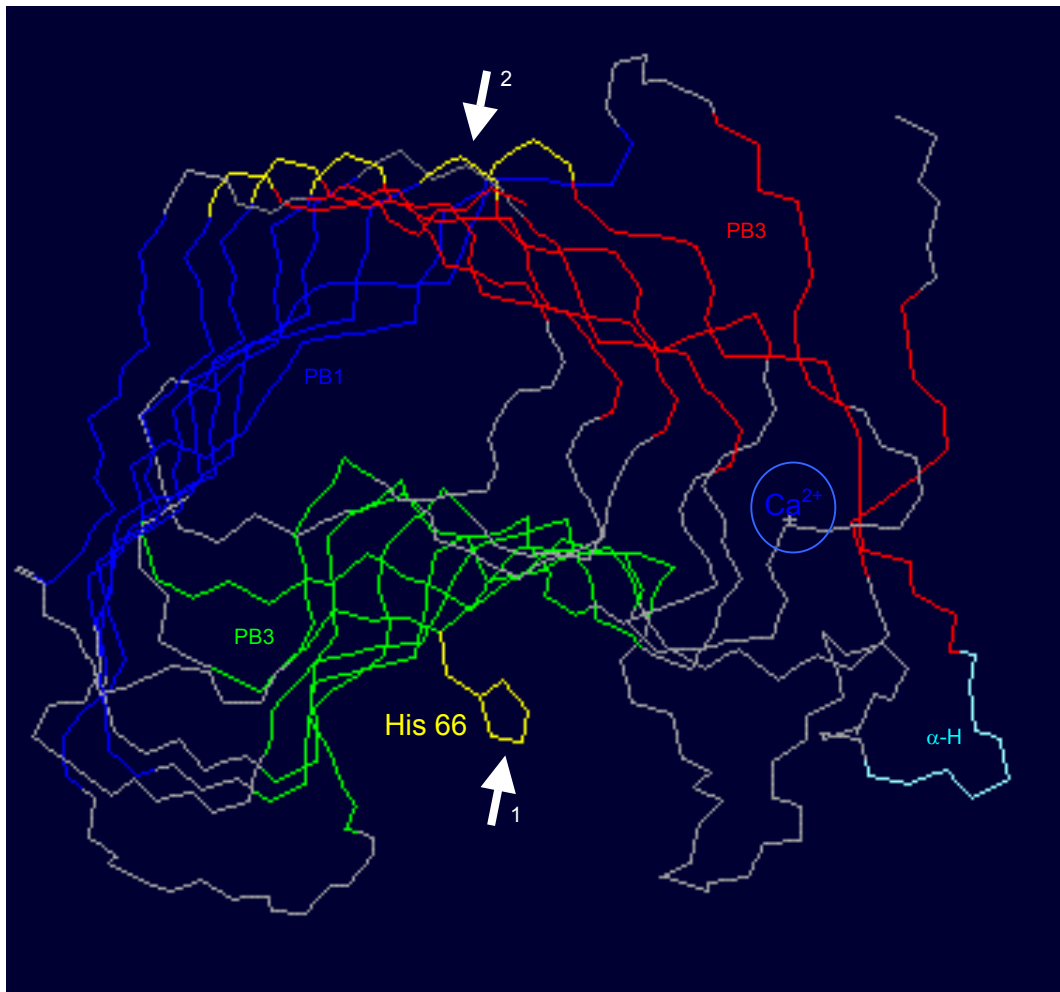
In Tabelle 3.3 soll abschließend ein Vergleich der Homologien der einzelnen Sequenzen der pektinolytischen Enzyme aus den drei *Fusarium*-Arten erfolgen:

**TABELLE 3.3:** Vergleich der Nukleotidsequenz-Homologien (fett) und Aminosäuresequenz-Homologien (normal) der bisher bekannten pektinolytischen Enzyme der *Fusarium*-Arten. Angaben in Prozent

	pel1	pel2	F. solani A	F. solani B	F. solani C	F. solani D	F. oxysporum
pel1	---	<b>58</b>	<b>85</b>	<b>48</b>	<b>53</b>	<b>53</b>	<b>86</b>
pel2	44	---	<b>41</b>	<b>49</b>	<b>62</b>	<b>78</b>	<b>42</b>
F. solani A	82	45	---	<b>58</b>	<b>35</b>	<b>47</b>	<b>88</b>
F. solani B	51	53	63	---	<b>45</b>	<b>37</b>	<b>43</b>
F. solani C	47	62	49	46	---	<b>65</b>	<b>42</b>
F. solani D	45	82	45	39	64	---	<b>61</b>
F. oxysporum	89	44	87	54	49	54	---

#### 3.2.3 STRUKTURANALYSE

Wiederum wurde mit Hilfe des Programms Swiss Model anhand der Aminosäuresequenz von Pel2 die dreidimensionale Struktur vorhergesagt. ABBILDUNG 3.18 zeigt diese vorausgesagte Tertiärstruktur der Pektat-Lyase 2 aus *F. graminearum*. Wie die Pektat-Lyase 1 ist auch die zweite Pektat-Lyase des Pilzes in Form von regelmäßig angeordneten, parallelen  $\beta$ -Faltblättern (parallel  $\beta$ -sheets; PB), die durch lineare Turns verbunden sind, aufgebaut. Des weiteren befindet sich im wahrscheinlichen aktiven Zentrum ein konserviertes Histidin (His 66; gelb), das zusätzlich mit einem Pfeil (1) markiert ist. Eine Bindestelle für  $\text{Ca}^{2+}$  ist ebenfalls vorhanden, im dargestellten Modell blau dargestellt. Auch die charakteristische Asn-Leiter [Pfeil (2), gelb] zwischen den Regionen PB1 und PB2 konnte identifiziert werden. Wieder liegt das wahrscheinliche aktive Zentrum des Enzyms in einer Rinne, in die sich das Substrat einlagern kann.



**ABBILDUNG 3.18:** Computer-Modell der dreidimensionalen Struktur der Pektat-Lyase 2 von *F. graminearum*. Das Modell wurde mit dem Programm Swiss-Model berechnet (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>).

Gekennzeichnet mit dem Pfeil 1 ist das invariante Histidin (His-66) im aktiven Zentrum des Proteins, Pfeil 2 zeigt auf die charakteristische Asn-Leiter (gelb) der Pektat-Lyasen dieser Klasse. Das für die Substratbindung essentielle  $\text{Ca}^{2+}$  ist in der Abbildung in einem blauen Kreis dargestellt. Die charakteristische Struktur aus parallelen  $\beta$ -Faltblättern (PB1, PB2 und PB3) ist in blau, rot und grün wiedergegeben, die ebenfalls charakteristische  $\alpha$ -Helix Struktur am C-terminalen Ende des Proteins ist in hellblau eingefärbt.

#### 3.2.4 IN PLANTA-UNTERSUCHUNGEN

Auch für die Pektat-Lyase 2 sollten die Untersuchungen zur Expression auf der Wirtspflanze durchgeführt werden. Anders als für das *pe1* Gen konnte unter Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle eine Basistranskription des *pe2*-Gens nachgewiesen werden, durch den Wechsel der Kohlenstoffquelle zu Substraten des Enzyms war jedoch auch hier eine Induktion messbar. Mittels PCR und RT-PCR Experimenten sollte der Nachweis der Transkription des *pe2*-Gens in der Pflanze

### 3. ERGEBNISSE

geführt werden. Wie schon im Fall der Pektat-Lyase 1 ist auch dieser Nachweis auf den zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation geernteten Weizenähren bisher nicht gelungen.

### 3. ERGEBNISSE

---



### 4. DISKUSSION

Der Infektionsprozeß eines pilzlichen Pathogens auf seiner Wirtspflanze spielt sich wesentlich auf molekularer Ebene ab. Verschiedene Stadien der Interaktion sind dabei zu unterscheiden. Das Zusammentreffen von Erreger und Wirt auf der Pflanzenoberfläche und die Etablierung einer kompatiblen Interaktion sind die ersten Prozesse der Infektion, die mit dem Eindringen in das System Pflanze und in die einzelne Pflanzenzelle weitergeführt werden. Die Reproduktion des Pathogens schließt einen erfolgreichen Infektionszyklus ab. Das Wachstum und die Ausbreitung des Phytopathogens auf der Wirtspflanze enden nicht selten mit dem Tod der gesamten Pflanze.

Betrachtet man diese sehr komplexen Interaktionsstadien einzeln, ist es möglich, verschiedene Hypothesen zu entwickeln, die die Grundlagen für Untersuchungen der Interaktion eines Phytopathogens mit seiner Wirtspflanze bilden. Auf dieser Basis ist es dann vielleicht weiterhin möglich, Strategien zu entwickeln, den Erreger zu stoppen und eine erfolgreiche Ausbreitung der Infektion zu verhindern.

Bei vielen Phytopathogen-Pflanze-Interaktionen ist die Bedeutung von Zellwandabbauenden Enzymen für die direkte Penetration der Pflanze bzw. der pflanzlichen Zelle beschrieben. Gut untersucht sind in vielen Systemen Pektin-abbauende Enzyme, die schon frühzeitig als möglicherweise sehr wichtige Faktoren hinsichtlich Pathogenität oder Virulenz in den Interaktionen betrachtet wurden, da besonders in dikotylen Pflanzen Pektin als wichtige Substanz für die Quervernetzung der pflanzlichen Zellwand angesehen wird [Bateman und Millar, 1966; Collmer und Keen, 1986; Carpita, 1996].

Das am besten untersuchte System in dieser Hinsicht ist die Interaktion des phytopathogenen Bakteriums *Erwinia chrysanthemi* mit seinen Wirten. Mehrere verschiedene lytische und hydrolytische Enzyme für den Abbau von Pektin in der pflanzlichen Zellwand sind für dieses Bakterium beschrieben und detailliert untersucht worden [Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 1996; Herron *et al.*, 2000].

Bei pilzlichen Pathogenen ist in den letzten zehn Jahren eine intensive Untersuchung von Proteinen als möglichen Pathogenitätsfaktoren durchgeführt worden. Irdnum und Howlett [2001] haben in einem Übersichtsartikel 79 bis dahin bekannte pilzliche Gene aufgelistet, deren Genprodukten eine direkte Verbindung zur Virulenz oder Pathogenität des jeweiligen Pilzes zugeordnet werden kann. Die Liste enthält Gene, die für die Synthese von Toxinen kodieren, daneben weitere, die für die Ausbildung der Infektionsstrukturen auf der Pflanze benötigt werden, sowie solche, die

## 4. DISKUSSION

---

für Komponenten von Signal-Transduktions-Kaskaden kodieren. Weiterhin sind eine Reihe von Proteinen bekannt, die pflanzliche Abwehrmechanismen überwinden können. Wichtig ist die Tatsache, dass auch einige pilzliche Gene, die für Zellwand-abbauende Enzyme kodieren, nachgewiesenermaßen als Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren betrachtet werden können. Der lytische- und hydrolytische Abbau von Pektinen scheint dabei in einigen Interaktionen eine große Rolle zu spielen, aus den phytopathogenen Pilzen *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus flavus*, *Botrytis cinerea* und *Aspergillus citri* [Irdnum und Howlett, 2001] und bei *Claviceps purpurea*, dem Erreger der Mutterkornkrankheit auf Roggen [Tenberge *et al.*, 1996; Oeser *et al.*, 2001], sind eine Reihe dieser Enzyme beschrieben, die in direktem Zusammenhang mit der Pathogenität bzw. der Virulenz des jeweiligen Organismus stehen.

Für *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* sind mehrere Pektin-abbauende Enzyme nachgewiesen worden, mit deren Synthese der Wechsel von der biotrophen zur nekrotrophen Lebensweise des Pilzes auf seinen Wirten anscheinend eingeleitet wird. Eine direkte Beteiligung dieser Enzyme an der Pathogenität des Mikroorganismus ist daher als wahrscheinlich angenommen worden [Shih *et al.*, 2000]. Durch Disruption eines Gens, das für eine Pektat-Lyase kodiert, ist nachgewiesen worden, dass diese Pektat-Lyase tatsächlich einen entscheidenden Beitrag zur Virulenz dieses Pilzes auf dem Wirt Avocado liefert [Yakobi *et al.*, 2001].

Bei *Claviceps purpurea* sind zwei Gene, die für Polygalakturonasen kodieren, gefunden worden. Werden beide Gene ausgeschaltet, kann der Pilz *in vitro* zwar wachsen, ist aber nicht mehr in der Lage, die Wirtspflanze Roggen zu infizieren [Tenberge *et al.*, 1996; Oeser *et al.*, 2001]. Hier liegt eines der wenigen Interaktionssysteme mit einer monokotylen Pflanze vor, in dem ein direkter Zusammenhang von Pektin-Abbau und Pathogenität des Mikroorganismus festgestellt werden konnte.

Die Tatsache, dass die Zellwand der monokotylen Pflanzen nur einen geringen Anteil an strukturellen Pektinen besitzt und die oben beschriebenen Ergebnisse, unterstützen die Theorie, dass diese für die Stabilität und Integrität der Zelle eine große Bedeutung besitzen, und dass deshalb der Abbau dieser Komponente in der Virulenz von pflanzlichen Pathogenen eine entscheidende Rolle spielen könnte.

*Ustilago maydis*, ein biotrophes Pathogen auf Mais, produziert, wenn es *in vitro* mit pflanzlichem Gewebe als Kohlenstoff-Quelle wächst, Pektat-Lyase-, Polygalakturonase-, Zellulase- und Xylanase-Aktivität, abhängig von der Art des Gewebes, das eingesetzt wird [Cano-Canchola *et al.*, 2000]. *In planta* kann eine Induktion dieser Enzyme in der Reihenfolge Pektat-Lyasen, Polygalakturonasen, Zellulasen und ab-

## 4. DISKUSSION

---

schließlich während der Reproduktion von Xylanasen beobachtet werden. Die Rolle dieser Enzyme als Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren ist jedoch noch unklar [Cano-Canchola *et al.*, 2000].

Am weitaus besten charakterisiert sind jedoch die Pektin-abbauenden Enzyme eines nicht-pathogenen Pilzes, die industriell genutzt werden können. *Aspergillus niger* produziert ein Set an Zellwand-abbauenden Enzymen [deVries, 2003], das u.a. aus Pektin-Methylesterasen [Kester *et al.*, 2000], mindestens fünf Pektin-Lyasen [Harmsen *et al.*, 1990; Kusters-van-Someren *et al.*, 1991; Jenkins *et al.*, 1996; Vitali *et al.*, 1998] und einer Pektat-Lyase [Dean *et al.*, 1989; Benen *et al.*, 2000], sowie Endopolygalakturonasen [Parenicova *et al.*, 1998; Benen *et al.*, 1999; van Santen *et al.*, 1999; Parenicova *et al.*, 2000a,b] und Exo-Polygalakturonasen [deVries und Visser, 2001] besteht.

### 4.1 EINORDNUNG DER PEKTINOLYTISCHEN ENZYME VON *F. GRAMINEARUM*

#### 4.1.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE PARAMETER

Mit der vorliegenden Arbeit sollten Grundlagen geschaffen werden, die es ermöglichen, ein Stadium der Interaktion des Pilzes *Fusarium graminearum* mit einer bedeutenden Wirtspflanze, dem Weizen (*Triticum aestivum*), besser zu verstehen.

Der Pilz dringt nach erfolgreicher Anheftung an die Blütenblätter der Wirtspflanze über die geöffneten Stomata in das Innere des pflanzlichen Gewebes vor. Ausgehend vom Interzellularraum werden dann einzelne Zellen durch direkte Penetration befallen [Pritsch *et al.*, 2000]. Dieses direkte Vordringen in die Pflanzenzellen und die dabei möglicherweise ausgeschütteten Zellwand-Komponenten-abbauenden Enzyme werden intensiv untersucht. Ziel ist es, die Mechanismen dieser Reaktionen besser zu verstehen und auf dieser Grundlage neue Ansatzpunkte für die erfolgreiche Überwindung von pilzlichen Pathogenen zu erhalten.

Im folgenden sollen nun noch einmal ein paar Sätze zur Einordnung der pektinolytischen Enzyme folgen. Diese erfolgte zunächst aufgrund von Sequenzvergleichen mit den Nukleotid- und Aminosäuresequenzen aus diesem Bakterium. Es wurden zunächst drei verschiedene Unterfamilien unterschieden. In eine vierte Unterfamilie wurden aufgrund der vollkommenen Diversität der Sequenzen der Enzyme zu den Sequenzen der drei erstgenannten Familien, pilzliche Pektin- und Pektat-Lyasen, vornehmlich der Gattung *Fusarium*, eingeordnet [Heffron *et al.*, 1995; Henrissat *et al.*, 1995].

## 4. DISKUSSION

---

Zusätzlich wurden intensive Studien hinsichtlich der dreidimensionalen Strukturen von pektinolytischen Enzymen aus den verschiedenen Unterfamilien betrieben. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Proteine, obwohl in ihren Sequenzen grundsätzlich verschieden, in ihren dreidimensionalen Strukturen sehr ähnlich sind. Auf den Grundlagen der Strukturuntersuchungen konnten weiterhin eindeutige Aussagen bezüglich der Bindeeigenschaften der pektinolytischen Enzyme mit verschiedenen Pektin-Substraten gemacht werden [Henrissat *et al.*, 1995; Herron *et al.*, 2000]. Außerdem ließen sich noch Proteine, die völlig andere Reaktionen katalysieren, mit in diese „Strukturfamilie“ einordnen. Unter dem Dach dieser Oberfamilie von Proteinen konnten alle bisher auf ihre Struktur untersuchten, pektinolytischen Enzyme eingeordnet werden. Aufgrund ihrer Sequenzunterschiede wurde die Eingruppierung in die verschiedenen Unterfamilien beibehalten.

Mittlerweile ist es möglich, auf der Basis der bisher gewonnenen Strukturergebnisse, mit Hilfe der Aminosäuresequenzen einzelner pektinolytischer Enzyme, mittels Datenbankvergleichen Voraussagen über die wahrscheinliche dreidimensionale Struktur der Proteine zu treffen. Aufgebaut sind diese Proteine aus parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, die von linearen Schleifen unterbrochen werden. Charakteristisch ist weiterhin eine hoch-konservierte Leiter aus parallel angeordneten Asparaginen zwischen den Faltblättern 2 und 3, die sich fast durch das gesamte Protein zieht und die aufgrund der Ausbildung von Wasserstoffbrücken in großem Maße zur Stabilität der Proteine beiträgt [Henrissat *et al.*, 1995]. In den aktiven Zentren der Enzyme befinden sich vier invariante Aminosäuren, die für die Katalyse unerlässlich sind: ein Histidin und ein Asparagin, deren Rollen in der Reaktion bisher nicht bekannt sind, sowie ein in der weniger üblichen *cis*-Konformation angeordnetes Prolin, welches ein Arginin für die Bereitstellung einer positiven Ladung optimal ausrichtet. Die positive Ladung wird für die Neutralisation des negativ geladenen Intermediats, das durch die initiale Abspaltung eines Protons vom Substrat bei der  $\beta$ -Elimination entsteht, benötigt [Henrissat *et al.*, 1995; Vitali *et al.*, 1998]. Die ersten Proteine mit dieser Struktur, die röntgenkristallographisch dargestellt worden sind, waren bakterielle Pektat-Lyasen [Yoder *et al.*, 1993; Lietzke *et al.*, 1994; Piekersgrill *et al.*, 1994]. Mittlerweile sind in diese Strukturfamilie noch viele weitere Proteine mit anderen Funktionen, wie z.B. pflanzliche Pollenproteine, alkaline Proteasen oder ein Fragment des Tailspike-Proteins (TSP) des Phagen P22 [Jenkins *et al.*, 1998], eingruppiert worden. Obwohl in ihrer grundsätzlichen Struktur gleich, sind wesentliche Unterschiede in der Anordnung der Aminosäuren in einzelnen Regionen der Proteine gefunden worden, mit deren Hilfe sich unter anderem

## 4. DISKUSSION

---

die verschiedenen Reaktionsmechanismen, wie z.B. die absolute Abhängigkeit der Pektat-Lyasen von Kalzium, bzw. die Unabhängigkeit der Pektin-Lyasen von diesen zweiwertigen Ionen (s. 4.1.2), beschreiben lassen [Vitali *et al.*, 1998]. Die Reaktionsmechanismen der durch diese Enzyme katalysierten Reaktionen sind aber grundsätzlich ähnlich, obwohl deutliche Unterschiede aufgrund der jeweiligen Funktionen der Proteine zu erwarten wären. Als Schlussfolgerung der gewonnenen Daten kommen Jenkins *et al.* [1998] zu dem Ergebnis, dass, obwohl sich die Sequenzen dieser Proteine im Verlaufe der Evolution sehr verändert haben, die strukturelle Homologie der Proteine dennoch eher auf eine divergente Entwicklung, ausgehend von einem oder wenigen ursprünglichen gemeinsamen Vorfahren, schließen lässt, als auf eine konvergente Entwicklung vieler Proteine zu einer ähnlichen Struktur.

Für die Einordnung der Enzyme aus *F. graminearum* ist es neben den Kenntnissen der Nukleotidsequenz-Analysen und der Protein-Analysen an dieser Stelle abschließend notwendig, eine Betrachtung der bisher untersuchten pektinolytischen Enzyme der Pilze der Gattung *Fusarium* durchzuführen. Diese Gattung umfasst sowohl Pathogene von Dikotylen, als auch von monokotylen Pflanzen.

Eine induzierbare Pektat-Lyase (PeIA) aus dem phytopathogenen Pilz *Fusarium solani* ist schon sehr früh als wichtiges Instrument in der Interaktion mit der Wirtspflanze Erbse (*Pisum sativum*) nachgewiesen worden [Crawford *et al.*, 1987; Gonzales-Candelas *et al.*, 1992]. Im weiteren sind in diesem Pilz drei weitere Gene (*peIB*, *peIC* und *peID*), die für die Synthese von Pektat-Lyasen kodieren, und die während der Infektion der Wirtspflanze exprimiert werden, gefunden worden [Guo *et al.*, 1995a,b; 1996]. Hierbei zeigte sich, dass insgesamt drei dieser Gene (*peIA*, *peIC* und *peID*) erst durch Substrate der Enzyme induziert werden, während sie durch Glukose reprimiert werden. Dagegen ist die Pektat-Lyase B dieses Pilzes konstitutiv exprimiert, könnte also als „Scouting-Enzym“ wirken und die Induktoren für die Synthese der weiteren Pektat-Lyasen während der Interaktion mit der Pflanze freisetzen.

Da es sich bei dem Wirt dieses Pathogens um eine dikotyle Pflanze handelt, deren Zellen Zellwände mit einer großen Menge an Pektin enthalten, wurde die Vermutung, das es sich bei den pektinolytischen Enzymen um wichtige Virulenzfaktoren handeln könnte, weiter unterstützt. Durch gleichzeitiges Ausschalten von zweien dieser Gene (*peIA* und *peID*) ist gezeigt worden, dass diese für die Virulenz des Pathogens eine sehr wichtige Rolle spielen [Rogers *et al.*, 2000].

Für einen weiteren Pilz aus dieser Gattung, *F. oxysporum*, ist ebenfalls eine in der Wirtspflanze Tomate exprimierte Pektat-Lyase nachgewiesen worden. Die Rolle

## 4. DISKUSSION

---

dieses ebenfalls durch bestimmte Substrate wie Polygalakturonsäure induzierbaren Enzyms hinsichtlich der Virulenz des Pathogens, ist aber noch nicht geklärt [DiPietro und Roncero, 1996; Huertas-Gonzales *et al.*, 1999]. Auffällig ist, dass dieses Enzym anscheinend nicht durch hochmethylverestertes Pektin induzierbar ist. Nicht untersucht worden ist bisher, ob in diesem Pilz noch weitere pektinolytische Enzyme vorhanden sind.

Aufgrund ihrer Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen sind die pektinolytischen Enzyme aus diesen beiden *Fusarium*-Arten in die Familie 4 (s.o.) eingeordnet worden. Sie bilden zusammen mit einigen weiteren Enzymen aus Pilzen und mittlerweile auch einer ungewöhnlichen Pektat-Lyase aus *Bacillus subtilis*, eine Familie von pektinolytischen Enzyme, deren relativ geringes Molekulargewicht von ungefähr 25 kDa ein weiteres signifikantes Merkmal ist [Gonzalles-Candelas und Kollattukudy, 1992; Henrissat *et al.*, 1995; Heffron *et al.*, 1995; Soriano *et al.*, 2000].

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, mit unterschiedlichen Methoden aus dem phytopathogenen Pilz *F. graminearum* zwei Gene zu isolieren, die für pektinolytische Enzyme kodieren (3.1 und 3.2). Die resultierenden Proteine haben eine Größe von etwa 26kDa (Pel1) bzw. etwa 25kDa (Pel2). *In vitro*-biochemische Untersuchungen, die im Arbeitskreis Moerschbacher in den letzten Jahren durchgeführt wurden, haben das Vorhandensein dieser beiden Enzyme bereits bestätigt. Zusätzlich konnte eine Polygalakturonase eindeutig identifiziert werden [Conze, 2000; Klein, 2001], eine molekulargenetische Untersuchung dieses Enzyms steht jedoch noch aus.

Die beiden Gene, die für die Lyasen kodieren, sind aufgrund ihrer Sequenzhomologie untereinander (Abb. 3.18) und der Homologie zu anderen pilzlichen pektinolytischen Enzymen vornehmlich aus der Gattung *Fusarium* (Abb. 3.7, 3.8 und 3.17; Tab. 3.3) nach Henrissat *et al.* [1995] ebenfalls in die Familie 4 der pektinolytischen Enzyme einzuordnen (3.1.2 und 3.2.1).

Für beide Proteine konnte eine charakteristische Signalsequenz am N-terminalen Ende [Heijne, 1985; Heijne, 1986; Nielsen *et al.*, 1997] nachgewiesen werden, aufgrund derer die Enzyme aus der Zelle heraus geschleust werden sollten. Dieses Signalpeptid ist bei Pel1 15 Aminosäuren lang (Abb. 3.6) und bei Pel2 18 Aminosäuren (Abb. 3.16). Die charakteristische Länge von pilzlichen N-terminalen Signalpeptiden beträgt zwölf bis 24 Aminosäuren [Heijne, 1985; Heijne, 1986; Nielsen *et al.*, 1997].

Bei beiden Enzymen können 2 (*pel1*) bzw. 3 (*pel2*) relativ kurze Intronsequenzen von jeweils etwa 50 bp Länge in der genomischen Sequenz nachgewiesen werden. Diese Beobachtung der Längen und der Anzahl der Intronstrukturen deckt sich mit

## 4. DISKUSSION

---

den Analysen der weiteren pilzlichen Gene, die in diese Unterfamilie eingeordnet worden sind. Alle bekannten pektinolytischen Enzyme aus der Gattung *Fusarium* besitzen jeweils zwei bis drei Intronsequenzen dieser Länge [Crawford *et al.*, 1987; Gonzales-Candelas *et al.*, 1992; Guo *et al.*, 1995 a,b; 1996; DiPietro und Roncero, 1996; Huertas-Gonzales *et al.*, 1999], so dass auch im Fall der Intronstrukturen von einer Charakteristik für diese Gruppe von Enzymen gesprochen werden kann.

Die dreidimensionalen Strukturen der beiden Pektat-Lyasen aus *F. graminearum* sind mit Hilfe des Programms Swiss-Prot vorhergesagt worden (3.1.3, Abb. 3.9 und 3.2.2, Abb. 3.18). Eine abschließende und genaue Aussage kann zwar erst nach einer röntgenkristallographischen Untersuchung der Proteine erfolgen, aufgrund des Umfangs, den die Datenbanken bereits besitzen, ist jedoch davon auszugehen, dass die erhaltenen Ergebnisse genau genug sind, um eine Einordnung der Enzyme vorzunehmen. Beide Proteine besitzen sowohl eine parallele  $\beta$ -Faltblatt-Struktur, als auch die charakteristische Asparagin-Leiter in der Schleife 2 zwischen den parallelen  $\beta$ -Faltblättern 2 und 3 und können damit in die Oberfamilie der Proteine mit paralleler  $\beta$ -Faltblatt-Struktur eingeordnet werden. Der Nachweis von invarianten Aminosäuren im aktiven Zentrum der Enzyme kann auf diese Weise nicht erbracht werden, sicher kann nur das invariante Histidin in beiden aktiven Zentren identifiziert werden. Die drei anderen absolut invarianten Aminosäuren sind mehrfach vorhanden, eine genaue Zuordnung kann nur mit Hilfe des Swiss-Prot-Programms nicht erfolgen.

### 4.1.2 BIOCHEMISCHE PARAMETER

Auf biochemischer Ebene wird zwischen Pektin- und Pektat-Lyasen unterschieden. Verschiedene Kriterien wurden und werden dazu zu Grunde gelegt. In einigen Arbeiten erfolgt eine Einordnung auch aufgrund des bevorzugten Substrates: hochmethylverestertes Pektin gegenüber Polygalakturonsäure [Linhardt *et al.*, 1986], gleichwohl wurde bald festgestellt, dass eine scharfe Trennung aufgrund der bevorzugten Substrate nicht durchgehalten werden kann, da fast alle als Pektat-Lyasen eingeordneten Enzyme auch ein breites Spektrum an verschiedenen Methylveresterten Substraten abbauen können [Bartling *et al.*, 1995].

Die Klassifizierung erfolgt im Weiteren dann aufgrund der Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen für die Katalyse. Für Lyasen, die eher wenig Methylveresterte Pektine bzw. Polygalakturonsäure als Substrate bevorzugen, ist festgestellt worden, dass diese in ihrer Reaktion streng abhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  sind, während Lyasen, die eher hoch-

## 4. DISKUSSION

---

Methyl-veresterte Substrate bevorzugen, in ihrer Reaktion unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$  sind. Mit dieser Einordnung gelingt zwar eine strikte Trennung in zwei mögliche unterschiedliche Katalyse-Mechanismen, im Zusammenhang mit der Substratspezifität kann aber immer noch keine befriedigende Unterscheidung zwischen Pektin- und Pektat-Lyasen erfolgen. Röntgenstrukturanalysen bestätigen das Vorkommen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit und -Unabhängigkeit bei verschiedenen Lyasen, so dass derzeit definitionsgemäß  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzyme als Pektat-Lyasen und  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Enzyme als Pektin-Lyasen eingeordnet werden [Yoder und Jurnak, 1995; Mayans *et al.*, 1997; Vitali *et al.*, 1998; Scavetta *et al.*, 1999].

Aufgrund der strikten Abhängigkeit von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Katalyse handelt es sich bei den Enzymen von *F. graminearum* definitionsgemäß um Pektat-Lyasen (3.1.3 und 3.2.2) [Yoder und Jurnak, 1995; Mayans *et al.*, 1997; Vitali *et al.*, 1998; Scavetta *et al.*, 1999].

Die optimalen Reaktionsbedingungen hinsichtlich der Parameter Temperatur, pH-Wert,  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ -Konzentration und der bevorzugten Substrate, sowie die Spaltungsmechanismen der Pektat-Lyase 1 sind mit dem in *A. niger* heterolog exprimierten und aufgereinigten Enzym detaillierter bestimmt worden (3.1.5). Bezüglich des Temperaturoptimums von 40 °C, das auch schon für das Enzymgemisch bestimmt worden war [Conze, 2000], kann festgestellt werden, dass das Enzym unter physiologischen Bedingungen in der Interaktion mit der Pflanze wahrscheinlich sehr stabil ist und gegen Temperaturschwankungen gut geschützt ist. Der optimale pH-Wert im Basischen von 9.5 ist im Rahmen der Optima, die für andere pektinolytische Enzyme bestimmt worden sind [Linhardt *et al.*, 1986; Crawford *et al.*, 1987; Guevara *et al.*, 1997] und kann als ideale Bedingung für den Reaktionsmechanismus der  $\beta$ -Eliminierung betrachtet werden [Linhardt *et al.*, 1986; Hansen *et al.*, 2001]. Die strikte Abhängigkeit des Enzyms von  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch diese Versuche noch einmal bestätigt. Die im Vergleich zur Pektat-Lyase A aus *A. niger* deutlich geringere optimale Konzentration von 0.75 mM, was dem physiologischen Wert der *in planta* Situation an extrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen nahezu entspricht [Buchanan *et al.*, 2002], kann als optimale Anpassung des Enzyms an die in der Pflanze herrschenden Bedingungen gedeutet werden. Aufgrund der Spaltprodukte polymerer Substrate, die sich unter den für das Protein optimalen Bedingungen ergeben, kann dieses Enzym als Endo-Pektat-Lyase definiert werden, da zu Beginn der Reaktion zunächst Oligomere mit höherem Polymerisationsgrad ( $\text{DP} \geq 6$ ) entstehen, während ein exo-spaltendes Enzym Dimere oder Trimere freisetzen würde. Anscheinend ist es möglich, mit Hilfe einer Änderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration das Spaltungsmuster



## 4. DISKUSSION

---

der Substrate hin zu veränderten Produkten zu verschieben, eine Beobachtung die bei den Enzymen von *Aspergillus* bisher nicht gemacht werden konnte. Da höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen in die Tests nicht eingesetzt werden können, macht dies das *Fusarium*-Enzym möglicherweise interessant für weitere praktische Anwendungen. Die heterologe Expression des zweiten Enzyms und damit die genauere Charakterisierung seines Spaltmechanismus steht noch aus.

### 4.2 IN PLANTA-STUDIEN

Zu wissen, wie die genetische Kontrolle der Pektat-Lyase Gene aus *F. graminearum* funktioniert, ist aus zwei verschiedenen Gründen interessant. Um einen ersten Überblick zu bekommen, in welcher Form die Enzyme möglicherweise eine Rolle im pathogenen Lebenszyklus des Pilzes spielen, wurde untersucht, unter welchen Bedingungen eine Expression dieser Gene in der Pflanze stattfindet. Die Genexpression war *in vitro* induzierbar bzw. reprimierbar, die Regulation dieser Prozesse wird von den Promotoren der Gene gesteuert. Im nächsten Abschnitt soll die mögliche Funktion und Anwendbarkeit der Promotoren der *pel*-Gene diskutiert werden (4.3). Dieser Abschnitt 4.2 befasst sich zunächst mit den Bedingungen, unter denen die *pel*-Gene nachweisbar sind, und mit der *in planta*-Situation. Aus den biochemischen Untersuchungen war bereits bekannt, dass die Enzyme, wenn der Pilz in Medium mit Glukose als alleiniger Kohlenstoffquelle gewachsen war, nicht nachweisbar sind. Erst wenn der Pilz in Medien gezogen wurde, die ein Substrat für die pektinolytischen Enzyme als alleinige Kohlenstoffquelle enthalten, können die Proteine und damit auch Enzymaktivität nachgewiesen werden [Conze, 2000]. Diese Ergebnisse sind auf die molekulargenetischen Beobachtungen der Gene ausgedehnt worden. Hier konnte gezeigt werden, dass die Pektat-Lyase 1 von *F. graminearum* in Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle tatsächlich nicht transkribiert wird (Abb. 3.5). Erst durch Wachstum des Pilzes in Medien, die einen Induktor (Pektin, Polygalakturonsäure oder Weizenzellwand-Extrakt) enthalten, ist die mRNA des *pel1*-Gens nachweisbar. Dagegen ist eine Basismenge an Transkript für die *pel2* auch in Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle nachweisbar (Abb. 3.15), die Transkription ist aber auch im Fall der *pel2* induzierbar, d.h. in den induzierenden Medien ist die Summe an Produkt in der RT-PCR-Reaktion deutlich höher als in der mRNA, die aus dem Pilz gewonnen worden ist, wenn dieser in Glukose-haltigem Medium gewachsen ist (Abb. 3.15).

Die Basisaktivität der *pel2* sorgt unter reprimierenden Bedingungen für eine sehr geringe Menge an Enzym, das durch Substrat-Abbau die zur Induktion der

#### 4. DISKUSSION

---

Transkription möglicherweise nötigen Oligogalakturonide bereit stellen könnte. Erst wenn diese durch das „Scouting“-Enzym Pel2 produziert wurden, d.h. die Bedingungen herrschen, bei denen sich eine aufwendige Synthese großer Mengen an Pektin-abbauenden Enzymen „lohnt“, wird die Transkription und Translation der Gene erhöht im Fall von *pel2* und in Gang gesetzt im Fall von *pel1*.

Eine ähnliche Situation kann für die *in planta*-Situation während der Infektion angenommen werden. Während der frühen Phase des Wachstums lebt der Pilz zunächst von seinen eigenen Reserven. Doch schon kurz nach dem Eindringen in die Pflanze penetriert er die pflanzlichen Zellen direkt, wahrscheinlich durch den enzymatischen Abbau der Zellwände [Pritsch *et al.*, 2000]. Ist also die Zellwand erreicht und damit Pektin als Barriere in der Zellwand und als Substrat für pektinolytische Enzyme verfügbar, könnte es durch die geringen Mengen an vorhandenem Pel2-Enzym verdaut werden und gleichzeitig würden Induktoren entstehen, die die Synthese von Pel2 erhöhen und von Pel1 einleiten. Nach dieser Hypothese ist also zu erwarten, dass ein Transkript des *pel2*-Gens schon in einer relativ frühen Phase während der Infektion nachweisbar sein müsste, während das Transkript des *pel1*-Gens erst zu einem späteren Zeitpunkt der Interaktion nachzuweisen sein dürfte.

Bisher ist es nicht gelungen, die Transkription der beiden Gene während der Interaktion des Pilzes mit der Wirtspflanze Weizen nachzuweisen. Die Infektion von Weizenpflanzen mit Sporensuspensionen des Pilzes bereitet keine Probleme (Abb. 3.11). Verschiedene Strategien, mRNA der Gene mittels RT-PCR nachzuweisen, führten bisher aber nicht zum Erfolg, was möglicherweise an dem geringen Verhältnis an pilzlicher mRNA zur pflanzlichen mRNA nach der Isolation aus dem infiziertem Material liegt. Zudem ist möglich, dass der hohe Gehalt an Speicherstärke und anderen Polysacchariden, die während der Isolation nur unzureichend entfernt werden können, die Reverse Transkription und die PCR-Reaktion derart stören, dass ein Nachweis der Transkription der *pel*-Gene bisher nicht möglich war. Wichtig ist in der nahen Zukunft, diese Probleme in den Griff zu bekommen, um obige Hypothese weiter zu entwickeln, die die Pektat-Lyase als mögliche Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren von *F. graminearum* vorsieht, prüfen zu können. Ein erster Ansatz ist es, nur die infizierten Blütenblätter für die Isolation der Nukleinsäuren zu verwenden, um das Verhältnis von pflanzlichen Nukleinsäuren zu pilzlichen Nukleinsäuren anzugleichen und um vor allem die Speicherpolysaccharide aus den Körnern nicht mehr weiter zu verschleppen. Wenn der Nachweis der Expression der Gene *in planta* erbracht wäre, würde das nächste Ziel sein, beide Gene auszuschalten, um eine Funktion der Enzyme im Infektionsprozeß als mögliche Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren zu überprüfen.

## 4. DISKUSSION

---

Die in der Einleitung aufgestellte zweite Hypothese, dass die Menge an Pektin in den Zellwänden der Poales evolutionär reduziert und durch andere Elemente zur Quervernetzung der Zellulose ersetzt wurden (z. B. GAX), könnte eine alternative Erklärung der bisherigen Ergebnisse der *in planta*-Studien liefern. Für den Fall, dass Pektin keine Rolle für die Stabilität der Zellwände der Poales spielt und daher ein Abbau des Pektins nicht zur Auflösung der Zellwand-Strukturen führt, ist die Stoffwechsel-intensive Synthese der pektinolytischen Enzyme unwahrscheinlich. Es wären eher andere Zellwand-Komponenten-abbauende Enzyme, wie z.B. Xylanasen, zu erwarten. Die Pektat-Lyasen von *F. graminearum* könnten dann ebenfalls als evolutionäre Überbleibsel angesehen werden, die im Genom noch vorhanden sind, durch ein alleiniges Angebot der Substrate als Kohlenstoffquellen *in vitro* zum Überleben synthetisiert werden, jedoch in der Infektion der Wirtspflanzen keine Rolle mehr spielen. Möglicherweise spielen die Enzyme nur während der saprophytischen Lebensphase, wenn sich der Pilz von abgestorbenen Pflanzenresten auf den Feldern ernähren muß, eine Rolle.

Inokulationsversuche haben gezeigt, dass *F. graminearum* auch in der Lage ist, Nicht-Wirt-Pflanzen, wie z.B. Arabidopsis, Tomate, Tabak oder Sojabohne, zu besiedeln und im Fall von Arabidopsis sogar einen vollständigen Infektionszyklus auszuprägen [Urban *et al.*, 2002]. Diese dikotylen Pflanzen besitzen in ihren Zellwänden relativ große Mengen an Pektin, das für die Stabilität und die Quervernetzung eine große Rolle spielen. Wenn es also möglich ist, dass *F. graminearum* um zu Überleben sein Wirtsspektrum derart erweitern kann und auch dikotyle Pflanzen befällt, könnte das eine weitere Erklärung für das Vorhandensein der pektinolytischen Enzyme in diesem Pilz sein.

### 4.3 PROMOTORSTUDIEN

Die bisherigen Ausführungen haben deutlich gemacht, dass zumindest die Pektat-Lyase 1 aus *F. graminearum* durch Glukose reprimierbar und durch Substrate des Enzyms induzierbar ist. Damit stellt sich die Frage der Regulation dieses Mechanismus auf genetischer Ebene. Von zwei denkbaren Ansätzen ist dabei zunächst ausgegangen worden: (i) einer Kontrolle der Transkription oder (ii) einer Kontrolle der Translation. Das würde im letzteren Fall bedeuten, dass ein Transkript des Gens konstitutiv vorhanden, also mit RT-PCR oder Northern-Analysen in jedem Fall nachweisbar sein müsste. Für die Pektat-Lyase 1 ist jedoch nach Wachstum im Glukose-Medium zu keiner Zeit und nach Wachstum in den Induktionsmedien nicht vor dem Zeitpunkt 40 Stunden nach Inokulation ein Transkript des Gens zu detektie-

## 4. DISKUSSION

---

ren (3.1.4; Abb. 3.10), so dass von einer transkriptionalen Kontrolle und nicht von einer translationalen Kontrolle der Pektat-Lyase Synthese ausgegangen werden kann. Dagegen ist die *pe/2* konstitutiv transkribiert, auch wenn in dem Fall ebenfalls von einer Hochregulierung der Transkription durch Wachstum in den Induktionsmedien ausgegangen werden kann (3.2.1, Abb. 3.15).

Die entwickelte Arbeitshypothese geht davon aus, dass die Kontrolle des Promotors des *pe/1* Gens möglicherweise in einem direkten Zusammenhang mit den Substraten steht. Eine direkte Wirkung von Glukose oder anderen Sacchariden auf eukaryontische Promotoren ist bisher nicht beschrieben, die Wirkung wird über Transkriptionsfaktoren (CRE-Faktoren) gesteuert, entsprechende regulatorische Promotorelemente sind aus anderen Pilzen bekannt [Suto und Tomita, 2001]. Neueste Studien haben gezeigt, dass die Repression von Zellulasen und Xylanasen in *Trichoderma* durch Glukose allein abhängig von den CRE-Faktoren ist, während für die Induktion durch die Substrate wahrscheinlich weitere Transkriptionsfaktoren in Wechselwirkung mit CRE eine Rolle spielen. Die genauen Strukturen und Mechanismen dieser Aktivierung sind jedoch noch unklar, möglicherweise werden extrazelluläre Signale über Phosphorylierungsreaktionen dieser Faktoren innerhalb der Zelle umgesetzt [Mach und Zeilinger, 2003]. In bakteriellen Systemen ist eine direkte Wirkung von Zuckern auf die Transkriptionsfaktoren beschrieben worden [Spiridonov und Wilson, 1999], für eukaryontische Systeme konnte bisher ein solcher Regulationsmechanismus nicht beobachtet werden, wird aber spekulativ diskutiert [Mach und Zeilinger, 2003].

Für die Induktion durch die Substrate der Pel-Enzyme sind ebenfalls mehrere Hypothesen denkbar. Eine direkte Wechselwirkung der Pektin-Oligomere mit der DNA erscheint nach bisherigem Kenntnisstand sehr unwahrscheinlich. Eine Möglichkeit ist eine von den CRE-Faktoren der Glukose-Regulation unabhängige Regulation der Induktion durch weitere Transkriptionsfaktoren. Diese möglichen regulatorischen Elemente auf dem Promotor des Gens müßten durch die weiteren Arbeiten identifiziert werden.

Da das *pe/1*-Gen durch Glukose jedoch immer reprimiert ist, kann eine dritte Möglichkeit diskutiert werden. Danach ist die Induktion der Transkription durch Pektin-Oligomere und die Reprimierbarkeit durch Glukose mittels der CRE-Faktoren zumindest in gegenseitiger Wechselwirkung voneinander abhängig, oder wird möglicherweise nur durch die CRE-Faktoren bestimmt. Solange sich Glukose als Kohlenstoffquelle im System befindet, ist die Pektat-Lyase 1 aus, während durch die Basisaktivität der Pel2 mögliche Induktoren frei gesetzt werden. Sinkt der Glukose Spiegel rapide ab, bei gleichzeitiger Freisetzung von Induktoren, wird die Reprimie-

## 4. DISKUSSION

---

rung durch veränderte Eigenschaften des CRE-Faktors aufgehoben bzw. überwunden.

Um diese Theorien zu überprüfen sind Vektoren konstruiert worden, bei denen verschiedene Längen des Promotors von *pe11* in Verbindung mit dem GUS-Gen aus *E. coli*, das für  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität kodiert, gebracht worden sind. Erste Tests mit diesen Konstrukten sind in *E. coli* durchgeführt worden. Es zeigte sich, dass der Promotor in den Bakterien aktiv ist, die Regulation dieses eukaryontischen Promotors funktioniert jedoch nicht.

Aus diesem Grund wurden die weiteren Versuche in *A. niger* durchgeführt. Dieses pilzliche System ist in der Anwendbarkeit fast genauso gut etabliert wie das prokaryontische System *E. coli*. Zusätzlich bestand die Hoffnung, dass das Regulationssystem für pektinolytische Enzyme in Pilzen sehr hoch konserviert ist und die Regulation des *Fusarium*-Promotors deshalb in *A. niger* funktioniert. Es ist gelungen, ein Promotor-GUS-Konstrukt mit einer Promotorlänge von 756 bp in den Pilz zu transformieren und erste Untersuchungen bezüglich der Regulation durchzuführen. Erste Ergebnisse deuten eindeutig darauf hin, dass die Regulation in einer Abhängigkeit von der im Kulturmedium gewählten Kohlenstoffquelle steht. Nicht geklärt werden konnte bisher die Frage, wie die Regulation tatsächlich funktioniert (3.1.5.2). In einer Folgearbeit sollen diese initial begonnenen Studien fortgeführt werden um die regulatorischen Elemente auf dem Promotor zu identifizieren.

## 4. DISKUSSION

---

### 4.4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mit biochemischen Methoden gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der pektinolytischen Enzyme des Getreidepathogens *Fusarium graminearum* [Conze, 2000] mit molekularbiologischen Methoden weiter zu vertiefen. Mit der genetischen Analyse der pektinolytischen Enzyme des Pilzes sollen Grundlagen geschaffen werden, um in Zukunft Strategien ableiten zu können, die dabei helfen, (i) zusammen mit den Erkenntnissen der weiteren Mitarbeiter der „AG *Fusarium*“ zu verstehen, wie dieser Pilz bei der Interaktion mit seinen Wirtspflanzen im allgemeinen, und bei der Penetration der pflanzlichen Zelle im besonderen, vorgeht, (ii) eine weitere Charakterisierung der pektinolytischen Enzyme des Pilzes, ihrer Substrate und Produkte erlauben, (iii) auf der Basis dieser Erkenntnisse neue Abwehrmechanismen zu erschließen und Wirktargets zu entwickeln, die eine Überwindung des Schädlings fördern und (iv) einen ersten Einblick in die Regulationsmechanismen der Biosynthese von Zellwand-abbauenden Enzymen des Pilzes liefern.

Um dieses Ziel zu erreichen, sind zunächst die genetischen Informationen von zwei Genen, *pe1* und *pe2*, die für Pektat-Lyase kodieren, mit Hilfe verschiedener PCR-Methoden, Southern Analysen und dem Anlegen und Screenen subgenomischer Banken gewonnen worden. Die bisherigen biochemischen Analysen hatten das Vorhandensein von zwei pektinolytischen Enzymen vorhergesagt. Aufgrund der sehr hohen sequentiellen Homologie dieser Gene zu weiteren pektinolytischen Enzymen anderer Pilze aus der Gattung *Fusarium*, der strikten Abhängigkeit von zweiwertigen Kalzium-Ionen und von Strukturanalysen mit Hilfe von Datenbanken konnten beiden Gene kodierende Funktionen für Pektat-Lyase eindeutig zugewiesen werden. Die Induzierbarkeit der Transkription der Gene durch Substrate der Enzyme, wie z.B. Polygalakturonsäure und Pektin, aber auch durch pflanzliche (Weizen-) Zellwandextrakte, bzw. die völlige (im Fall von *pe1*) oder starke (im Fall von *pe2*) Reprimierbarkeit durch Glukose in *in vitro*-Versuchen lässt darauf schließen, dass die Enzyme nur unter induzierenden Bedingungen während der Interaktion mit der Pflanze synthetisiert werden. Aufgrund diverser Schwierigkeiten mit den Untersuchungen der *in planta*-Situation kann derzeit leider noch keine Aussage getroffen werden, ob und zu welchem Zeitpunkt die Gene auf der Pflanze angeschaltet werden.

Um eine erweiternde Charakterisierung der Enzyme vornehmen zu können ist versucht worden, beide Gene in heterologen Organismen zu exprimieren. Vektoren für die Expression der Gene in *A. niger* sind für beide Gene konstruiert worden, die he-

#### 4. DISKUSSION

---

terologe Expression des *pe1*-Gens in diesem Pilz ist erfolgreich durchgeführt worden. Die Charakterisierung des Genprodukts hat die zuvor gewonnenen Daten, und damit die Richtigkeit der Einordnung des Enzyms als Endo-Pektat-Lyase bestätigt. Mit dem aufgereinigten Protein werden zur Zeit weitere Untersuchungen z.B. mit Zellwand-Extrakten Rost-resistenter und -suszeptibler Pflanzen durchgeführt.

Da das *pe1*-Gen unter Bedingungen mit Glukose als Kohlenstoffquelle vollständig reprimierbar ist, mit Substraten des Enzyms jedoch eine Induktion der Transkription des Gens erreicht werden kann, ist der Promotor dieses Gens initial untersucht worden. Erste Versuche zeigten eine Aktivität des Promotors auch in dem bakteriellen System *E. coli*, eine Reprimier- bzw. Induzierbarkeit konnte jedoch nicht festgestellt werden. Im pilzlichen System *A. niger* zeigt sich, dass die Kontrolle des Promotors und damit der Reprimierung bzw. Induktion möglicherweise in direktem Zusammenhang mit Glukose bzw. Pektin oder Polygalakturonsäure steht. Für die Tests ist dabei ein Promotorfragment von 756 bp Länge in Verbindung mit dem GUS-Reportergen eingesetzt worden. Nächstes Ziel auf diesem Arbeitsgebiet ist die Identifizierung möglicher regulatorischer Elemente auf dem Promotor, die diese Beteiligung der Zucker an der Regulation bewirken.

## 4. DISKUSSION

---



## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Annis, S. L., Goodwin, P. H. (1997). "Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi." European Journal of Plant Pathology **103**: 1-14.

Armand, S., Wagemaker, M. J. (2000). "The active site topology of *Aspergillus niger* endopolygalacturonase II as studied by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **275**(1): 691-6.

Atanassov, Z., Nakamura, C. (1994). "Mycotoxin production and pathogenicity of *Fusarium* species and wheat resistance to Fusarium head blight." Can J Bot **72**: 161-167.

Bai, G., Shaner G. (2000). "Inheritance of resistance to *Fusarium graminearum* in wheat." Theor Appl Genet **100**: 1-8.

Bai, G., Shaner, G. (1994): Scab of wheat: Prospects for control. Plant Dis. **78**: 760–766

Bartling, S., Wegener, C. (1995). "Synergism between *Erwinia pectate* lyase isoenzymes that depolymerize both pectate and pectin." Microbiology **141**(Pt 4): 873-81.

Bateman, D. F., Millar, R.L. (1966): "Pectic enzymes in tissue degradation." Ann. Rev. Phytopathol. **4**: 119-146

Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau (2000): "Risiken durch den Ährenparasiten *F. graminearum* – Ergebnisse eines LBP-Forschungsverbunds." Schriftenreihe (ISSN 1433-3155), 4. Jahrgang, 03/2000

Benen, J. A., Kester, H. C. (2000). "Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A." Biochemistry **39**(50): 15563-9.

Benen, J. A., Kester, H. C. (1999). "Kinetic characterization of *Aspergillus niger* N400 endopolygalacturonases I, II and C." Eur J Biochem **259**(3): 577-85.

Bruins, M. B. M., Karsai, I. (1993). "Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to in vitro selection for *Fusarium* head blight resistance." Plant Science **94**: 195-206.

Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000): „Biochemistry and molecular biology of plants.“ American Society of Plant Biologists

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Burgess, L. W., Backhouse, D. (1996). "Control of Fusarium crown rot of wheat by late stubble burning and rotation with sorghum." Australian Plant Pathology **25**(4): 229-233.

Cano-Canchola, C., Acevedo, L. (2000). "Induction of lytic enzymes by the interaction of Ustilago maydis with Zea mays tissues." Fungal Genet Biol **29**(3): 145-51.

Carpita, N. C. (1996). "Structures and biogenesis of the cell walls of grasses." Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **47**: 445-476.

Carroll, A., Sweigard, J. A., Valent, B.: "Improved Vectors for Selecting Resistance to Hygromycin" Central Research and Development, E.I. Dupont de Nemours and Co., P.O. Box 80402, Wilmington, DE 19880-0402, USA

Cassini, R. "Fusarium diseases of cereals in Western Europe." In Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy. Nelson, P.E., Toussoun, T. A., Cook, R. J., Pennsylvania State University, S. 225–235

Christakopoulos, P., Kekos, D. (1996). "Purification and characterisation of a major xylanase with cellulase and transferase activities from Fusarium oxysporum." Carbohydr Res **289**: 91-104.

Clear, R. (2000). "Fusarium head blight in Canada." [www.cgc.ca/Pubs/fusarium/fusarium-e2.htm](http://www.cgc.ca/Pubs/fusarium/fusarium-e2.htm).

Collmer, A., Keen, N. T. (1986). "The role of pectic enzymes in plant pathogenesis." Annu. Rev. Phytopathol. **24**: 383-409.

Conze, T. (2000): " Molekulare Grundlagen der Pathogenität des Getreideschädling *Fusarium graminearum*: Identifizierung und Charakterisierung von pektinolytischen Enzymen." Diplomarbeit, Westfälische-Wilhelms Universität Münster, AG Moerschbacher, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen

Cook, R. J. (1991): "Fusarium disease of wheat and other small grains in North America." In Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy. Nelson, P.E., Toussoun, T. A., Cook, R. J., Pennsylvania State University, S. 225–235

Cook, R. J. (1991): "Fusarium diseases in the peoples republic of china." In Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy. Nelson, P.E., Toussoun, T. A., Cook, R. J., Pennsylvania State University, S. 225–235

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Crawford, M. S., Kolattukudy, P. E. (1987). "Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. pisi: purification, characterization, in vitro translation of the mRNA, and involvement in pathogenicity." Arch Biochem Biophys **258**(1): 196-205.

Dalcero, A., Torres, A. (1997). "Occurrence of deoxynivalenol and *Fusarium graminearum* in Argentinian wheat." Food Additives and Contaminants **14**(1): 11-14.

de Graaff, L. H. (1989): "The structure and expression of the pyruvatekinase gene of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus niger*." PhD thesis Agricultural University Wageningen

de Vries, R. P., Kester, H. C. (2000). "Synergy between enzymes from *Aspergillus* involved in the degradation of plant cell wall polysaccharides." Carbohydr Res **327**(4): 401-10.

de Vries, R. P., Visser, J. (2001). "Aspergillus enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 497-522, table of contents.

De Vries, R. P., Jansen, J., Guillermo, A., Parenicova, L., Joosten, V., Wülfert, F., Benen J. A. E., Visser, J. (2002): „Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*." FEBS Letters **530**: 41-47

Bussink, H. J. D., Buxton, F. P., Fraaye, B. A., deGraaff, L. H., Visser, J. (1992): "The polygalacturonases of *Aspergillus niger* are encoded by a family of diverged genes." Eur. J. Biochem. **208**: 83-90

De Vries, R. P. (2003) : "Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall polysaccharide-degrading enzymes; relevance for industrial production." Appl. Microbiol. Biotechnol. **61**: 10-20

Dean, R. A., Timberlake, W. E. (1989). "Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (pelA)." Plant Cell **1**(3): 275-84.

Di Pietro, A., Garcia-Maceira, F. I. (1998). "Endopolygalacturonase PG1 in Different Formae Speciales of *Fusarium oxysporum*." Appl Environ Microbiol **64**(5): 1967-71.

Di Pietro, A., Roncero, M. I. (1996). "Purification and characterization of an exopolygalacturonase from the tomato vascular wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. lycopersici." FEMS Microbiol Lett **145**(2): 295-9.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Di Pietro, A., Roncero, M. I. (1996). "Endopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*: purification, characterization, and production during infection of tomato plants." Phytopathology **86**: 1324-1330.

Di Pietro, A., Roncero, M. I. (1996). "Purification and characterization of a pectate lyase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* produced on tomato vascular tissue." Physiological and Molecular Plant Pathology **49**: 177-185.

Dixon, B. (1998): "Der Pilz, der John F. Kennedy zum Präsidenten machte." Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin

Doyle, E. A., Lambert, K. N. (2002) : "Cloning and characterization of an esophageal-gland-specific pectate lyase from the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*." Mol. Plant Microbe Interactions **15**(6): 549-556

Doyle, M. E. (2000). "Fusarium Mycotoxins." FRI-Briefings.

Estevez, P., Gonzales-Jaen, M. T., Guevara, M. A. (1996): "Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid." Can. J. Microbiol. **43**: 245-253

Garcia-Maceira, F. I., Di Pietro, A. (2000). "Cloning and disruption of *pgx4* encoding an in planta expressed exopolygalacturonase from *Fusarium oxysporum*." Mol Plant Microbe Interact **13**(4): 359-65.

Gomez-Gomez, E., Ruiz-Roldan, M. C. (2002). "Role in Pathogenesis of Two Endo-beta-1,4-xylanase Genes from the Vascular Wilt Fungus *Fusarium oxysporum*." Fungal Genet Biol **35**(3): 213-22.

Gonzalez-Candelas, L., Kolattukudy, P.E. (1992). "Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population VI)." J Bacteriol **174**(20): 6343-9.

Grasserbauer, M., Weingaertner, J., Krska R., Schuhmacher, R. (1997): Interlaboratory comparison study for the determination of the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods. Fresenius J. Anal. Chem. **359**: 510-515

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Guevara, M. A., Gonzáles-Jaén, M. T. (1997). "Multiple forms of pectic lyases and polygalacturonase from *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici*: regulation of their synthesis by galacturonic acid." Can. J. Microbiol. **43**: 245-253.

Guo, W., Gonzalez-Candelas, L. (1995). "Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*." Arch Biochem Biophys **323**(2): 352-60.

Guo, W., Gonzalez-Candelas, L. (1995). "Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*." J Bacteriol **177**(24): 7070-7.

Guo, W., Gonzalez-Candelas, L. (1996). "Identification of a novel *pelD* gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase." Arch Biochem Biophys **332**(2): 305-12.

Hansen, K. M., Truesen, A. B., Soderberg, J. R. (2001): „Enzyme assay for identification of pectin and pectin derivatives, based on recombinant pectate lyase.“ Journal AOAC Int. **84**(6):1851-1854.

Harmsen, J. A., Kusters-van Someren, M. L. (1990). "Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (*pelA*): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*." Curr Genet **18**(2): 161-6.

Heffron, S., Henrissat, B. (1995). "Structure-based multiple alignment of extracellular pectate lyase sequences." Mol Plant Microbe Interact **8**(2): 331-4.

Heijne, G. v. (1985). "Signal sequences: The limits of variation." Journal of Molecular Biology **184**: 99-105.

Heijne, G. v. (1986). "A new method for predicting signal sequence cleavage sites." Nucleic Acids Res **14**(11): 4683-4690.

Henrissat, B., Bairoch, A. (1996). "Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases." Biochem J **316**(Pt 2): 695-6.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Henrissat, B., Heffron, S. E. (1995). "Functional implications of structure-based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily." Plant Physiol **107**(3): 963-76.

Herron, S. B., Scavetta R. D., Visser, J; Jurnak, F (2000). "Structure and function of pectic enzymes: Virulence factors of plant pathogens." PNAS **97**(16): 8762 - 8769.

Hinze, A. (2000): "Fusarium graminearum als eine wachsende Bedrohung für die Landwirtschaft und mögliche Ansätze für Bekämpfungsstrategien." Staatsexamensarbeit, Westfälische-Wilhelms Universität Münster, AG Moerschbacher, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen

Howard, R. J., Ferrari, M. A., Roach, D. H., Money, N. P. (1991): "Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressure." PNAS **88**: 11281-11284

Huertas-Gonzalez, M. D., Ruiz-Roldan, M. C. (1999). "Cloning and characterization of pl1 encoding an in planta-secreted pectate lyase of Fusarium oxysporum." Curr Genet **35**(1): 36-40.

Hugoevieux-Cotte-Pattat, N., Condemine, G., Nasser, W., Reverchon, S. (1996) : Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annu. Rev. Microbiol. **50**: 213 – 257

Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., Reverchon, S. (2002): "PehN, a polygalacturonase homologue with a low hydrolase activity, is coregulated with the other *Erwinia chrysanthemi* polygalacturonases." J. Bacteriology **184**(10):2664-73

Idnurm, A., Howlett, B. J. (2001). "Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi." Mol Plant Pathol **2**(4): 241-255.

Jenkins, J. (1996). "Crystalization and preliminary X-ray analysis of pectin lyase A from *Aspergillus niger*." Acta Cryst. **D52**: 402-404.

Jenkins, J., Mayans, O. (1998). "Structure and evolution of parallel beta-helix proteins." J Struct Biol **122**(1-2): 236-46.

Kelemu, S., Collmer, A. (1993). "Erwinia chrysanthemi EC16 produces a second set of plant-inducible pectate lyase isoenzymes." Applied and Environmental Microbiology **59**(6): 1756-1761.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Kester, H. C., Benen, J. A. E. (2000). "Tandem mass spectrometric analysis of *Aspergillus niger* pectin methyl-esterase: mode of action on fully methyl-esterified oligogalacturonates." Biochem J **346**(Pt 2): 469-74.

Kimura, M., Kaneko, I. (1998). "Trichothecene 3-O-acetyltransferase protects both the producing organism and transformed yeast from related mycotoxins. Cloning and characterization of Tri101." J Biol Chem **273**(3): 1654-61.

Klein, C (2002): "Pektinolytische Enzyme von *Mycosphaerella graminicola* und *Fusarium graminearum*." Diplomarbeit, Westfälische-Wilhelms Universität Münster, AG Moersbacher, Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen

Kolattukudy, P. E., Gonzales-Candelas, L., Guo, W. (1996): "Identification of a novel *pelD* gene expressed uniquely in planta by *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type IV) and characterization of its protein product as an endo-pectate lyase." Arch. Biochem. Biophys. **332**(2): 305-312

Kolattukudy, P.E., Gonzales-Candelas, L., Guo, W. (1995,a): "Cloning of a novel constitutively expressed pectate lyase gene *pelB* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*." J. Bacteriology **177**(24): 7070-7077

Kolattukudy, P. E., Gonzales-Candelas, L., Guo, W. (1995,b): "Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type IV) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*." Arch. Biochem. Biophys. **323**(2): 352-360

Kolattukudy, P. E., Gonzales-Candelas, L. (1992): "Isolation and analysis of a novel inducible pectate lyase gene from the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* f.sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating population IV)." J. Bacteriol. **174**: 6343-6349

Kolattukudy, P. E., Crawford, M.S. (1987): "Pectate lyase from *Fusarium solani* f. sp. *pisi*: purification, characterization, *in Vitro* translation of the mRNA and involvement in pathogenicity." Arch. Biochem. Biophysics **258**(1): 196-205

Kusters-van Someren, M. A., Harmsen, J. A. (1991). "Structure of the *Aspergillus niger* *pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*." Curr Genet **20**(4): 293-9.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Lietzke, S. E., Yoder, M. D., Keen, N. T., Jurnak, F. (1994): „The three dimensional structure of pectate lyase E, a plant virulence factor from *Erwinia chrysanthemi*.” Plant Physiology **106**: 849-862

Linhardt, R. J., Galliher, P. M., Cooney, C. L. (1986): “Polysaccharide Lyases.” Applied Biochemistry and Biotechnology **12**: 135-176

Luria, S.E., Adam, J.N., Teng, R.C. (1960): “Transduction of lactose utilizing ability among strains of *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* and the properties of the transducing phage particles.” Virology **12**: 348-390.

Mach, R. L., Zeilinger, S. (2003). “Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*.” Appl. Microbiol. Biotechnol.: **60**: 515-522

Mayans, O., Scott, M. (1997). “Two crystal structures of pectin lyase A from *Aspergillus* reveal a pH driven conformational change and striking divergence in the substrate-binding clefts of pectin and pectate lyases.” Structure **5**(5): 677-89.

McMullen, M. (2000). “Environmental Conditions favoring *Fusarium* Head Blight of Wheat.” <http://www.wheatworld.org/forum36.htm>.

McMullen, M. P., Stack, R. W. (1999). “*Fusarium* Head Blight (Scab) of Small Grains.” [www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/smgrains/pp804w.htm](http://www.ext.nodak.edu/extpubs/plantsci/smgrains/pp804w.htm).

McMullen, M., Jones, R. (1997). “Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact.” Plant Disease **81**(12): 1340-1348.

Mendgen, K., Deising, H. (1993): “Infection structures of fungal plant pathogens – a cytological and physiological evaluation.” New Phytol., **124**, 193-213

Mesterházy, A. (1995). “Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat.” Plant Breeding **114**: 377-386.

Mesterházy, A., Bartok, T. (1999). “Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding.” Plant Breeding **118**: 97-110.

Miedaner, T. (2000). “*Fusarium* head blight in cereals - A growing challenge for farmers and breeders.” [www.uni-hohenheim.de](http://www.uni-hohenheim.de).



## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Mielke, H., Weinert, J. (1996). "Investigations on the effect of various fungicides on the pathogen of partial head blight (*Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc.)." Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **48**(5): 93-95.

Miller, J. D., Culley, J. (1998). "Effect of tillage on fusarium head blight of wheat." Canadian Journal of Plant Pathology **20**: 95-103.

Miller, J. D., Wang, Y.Z . (1987): "Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to Fusarium head blight resistance." J. Phytopathology **122**: 118–125

Moerschbacher, B., Mendgen, K. (2000): "Structural aspects of defense." In: A. J. Slusarenko, R. S. S. Fraser, L. C. van Loon, eds., Mechanisms of Resistance to Plant Diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp.231-277

Nganje, W. E., Johnson, D. D. J. (2001). "Economic impacts of fusarium head blight in wheat and barley: 1998-2000." Agribusiness and Applied Economics Report **464**: 1-41.

Nielsen, H., Engelbrecht, J. (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Protein Eng **10**(1): 1-6.

Nikaidou, N., Kamio, Y., Izaki, K. (1993): "Molecular cloning and nucleotide sequence of the pectate lyase gene from *Pseudomonas marginalis* N6301." Biosci. Biotech. Biochem. **57**(6), 957-960

Ochman, H., Ayala, F. J. (1993). "Use of polymerase chain reaction to amplify segments outside boundaries of known sequences." Methods Enzymol **218**: 309-21.

Oeser, B., Heidrich, P. M., Müller, U., Tudzynski, P., Tenberge, K. B. (2001): „Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction." Fungal Genetics and Biology, submitted

Parenicova, L., Benen, J. A. (1998). "pgaE encodes a fourth member of the endopolygalacturonase gene family from *Aspergillus niger*." Eur J Biochem **251**(1-2): 72-80.

Parenicova, L., Benen, J. A. (2000). "pgaA and pgaB encode two constitutively expressed endopolygalacturonases of *Aspergillus niger*." Biochem J **345**(Pt 3): 637-44.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Parenicova, L., Kester, H. C. (2000). "Characterization of a novel endopolygalacturonase from *Aspergillus niger* with unique kinetic properties." FEBS Lett **467**(2-3): 333-6.

Pickersgrill, R., Jenkins, J., Harris, G., Nasser, W., Robert-Baudouy, J. (1994): "The structure of *Bacillus subtilis* pectate lyase in complex with calcium." Nature Structure Biol. **1**:717-723

Pontecorvo, (1953): The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet. **5**: 141–238

Popeijus, H., Overmars, H., Jones, J., Blok, V., Goverse, A., Helder, J., Schots, A., Bakker, J., Smant, G. (2000): "Degradation of plant cell walls by a nematode." Nature **406**(6791): 36-37

Pritsch, C., Muehlbauer, G. J. (2000). "Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*." Molecular Plant-Microbe Interactions **13**(2): 159-169.

Roberts, K., McCann, M. C. (1996): "Plant cell wall architecture: the role of pectins." In: Visser, J.; Voragen, A.G.J.: Pectins and Pectinases © 1996 Elsevier Science B. V. S. 91–107

Rogers, L. M., Kim, Y. K. (2000). "Requirement for either a host- or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca*." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(17): 9813-8.

Scavetta, R. D., Herron, S. R. (1999). "Structure of a plant cell wall fragment complexed to pectate lyase C." Plant Cell **11**(6): 1081-92.

Scheinpflug, H., Heupel, M. (1998). "The Importance of Fungal Taxonomy for Plant Pathology." Journal of Plant Diseases and Protection **105**(3): 246-263.

Schisler, D. A., Khan, N. I. (2002). "Biological control of *Fusarium* head blight of wheat and deoxynivalenol levels in grain via use of microbial antagonists." Adv Exp Med Biol **504**: 53-69.

Schroeder, H. W., Christensen, J. J. (1963). "Factors Affecting Resistance of Wheat to Scab Caused by *Gigigerella zeae*." Phytopathology **53**: 831-838.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Schuhmacher, R., Krska, R. (1997). "Interlaboratory comparison study for the determination of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol in wheat and zearalenone in maize using different methods." Fresenius J. Anal. Chem. **359**: 510-515.

Shih, J., Wei, Y. (2000). "A comparison of the pectate lyase genes, pel-1 and pel-2, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection." Gene **243**(1-2): 139-50.

Soriano, M., Blanco, A. (2000). "An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization." Microbiology **146**(Pt 1): 89-95.

Spiridonov, N. A., Wilson, D. B. (1999). "Characterization and cloning of celR, a transcriptional regulator of cellulase genes from *Thermomonospora fusca*." Journal of Biological Chemistry: **274**(19): 13127-13132

Stack, R. W. (1997). "Fusarium Head Blight of Wheat and Barley - An Overview." Fusarium Scab Forum: 10-12.

Stack, R. W. (1999). "Return of an old problem: Fusarium Head Blight of small Grains." <http://199.86.26.55/feature/FHB/Top.htm>.

Suto, M., Tomita, F. (2001): "Induction of catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi." J. Bioscience Bioengineering **92**(4): 305 – 311

Sutton, J. C. (1982). "Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*." Canadian Journal of Plant Pathology **4**: 195-209.

Sweeney, M. J., Dobson, A. D. (1998). "Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species." Int J Food Microbiol **43**(3): 141-58.

Tenberge, K. M., Homann, V., Oeser, B., Tudzynski, P. (1996): "Structure and expression of two polygalacturonase genes of *Claviceps purpurea* orientated in tandem and cytological evidence for pectinolytic enzyme activity during infection of rye." Phytopathology **86**: 1084-1097

Triglia, T. (2000). "Inverse PCR (IPCR) for obtaining promoter sequence." Methods Mol Biol **130**: 79-83.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Trigo-Stockli, D. M., Sanchez-Marinez, R. I. (1998). "Comparison of the Distribution and Occurrence of *Fusarium graminearum* and Deoxynivalenol in Hard Winter Wheat for 1993-1996." Cereal Chem **75**(6): 841-846.

Tuite, J., Shaner, G., Everson, R. J., (1990): "Wheat scab in soft red winter wheat in Indiana in 1986 and its relation to some quality measurements." Plant Dis. **74**: 959-962

Urban, M., Daniels, S., Mott, E., Hammond-Kosack, K. (2002): „*Arabidopsis* is susceptible to the cereal ear blight fungal pathogens *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*.“ Plant Journal **32**(6):961-973

Vander, P (1995): "Solvolysen in wasserfreiem Fluorwasserstoff als Methode zur Fraktionierung pilzlicher Zellwände und Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Chitin und Chitosanen in Weizen." Dissertation, Rheinisch-Westfälische TH Aachen

van Santen, Y., Benen, J. A. (1999). "1.68-Å crystal structure of endopolygalacturonase II from *Aspergillus niger* and identification of active site residues by site-directed mutagenesis." J Biol Chem **274**(43): 30474-80.

Vitali, J., Schick, B. (1998). "The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å resolution." Plant Physiol **116**(1): 69-80.

Wang, Y. Z., Miller, J. D. (1988). "Effects of *Fusarium graminearum* Metabolites on Wheat Tissue in Relation to *Fusarium* Head Blight Resistance." J Phytopathology **122**: 118-125.

Wood, T. M. (1992). "Fungal cellulases." Biochem Soc Trans **20**(1): 46-53.

Yakoby, N., Beno-Moualem, D. (2001). "Colletotrichum gloeosporioides pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction." Mol Plant Microbe Interact **14**(8): 988-95.

Yoder, M. D., Keen, N. T., Jurnak, F. (1993): „New domain motif – the structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor.“ Science **260**: 1503-1507

Yoder, M. D., Jurnak, F. (1995). "The refined three dimensional structure of pectate lyase C from *Erwinia chrysanthemi* at 2.2 Å resolution." Plant Physiology **107**: 349-364.

## 5. LITERATURVERZEICHNIS

Yuan, S., Wu, Y. (2001). "A fungal endoglucanase with plant cell wall extension activity." Plant Physiol **127**(1): 324-33.

Welling, M. (2002): "Schimmelpilze im Getreide als Folge des nassen Sommers." Informationsdienst Wissenschaft, [http://idw-online.de/public/zeige\\_pm.html](http://idw-online.de/public/zeige_pm.html)

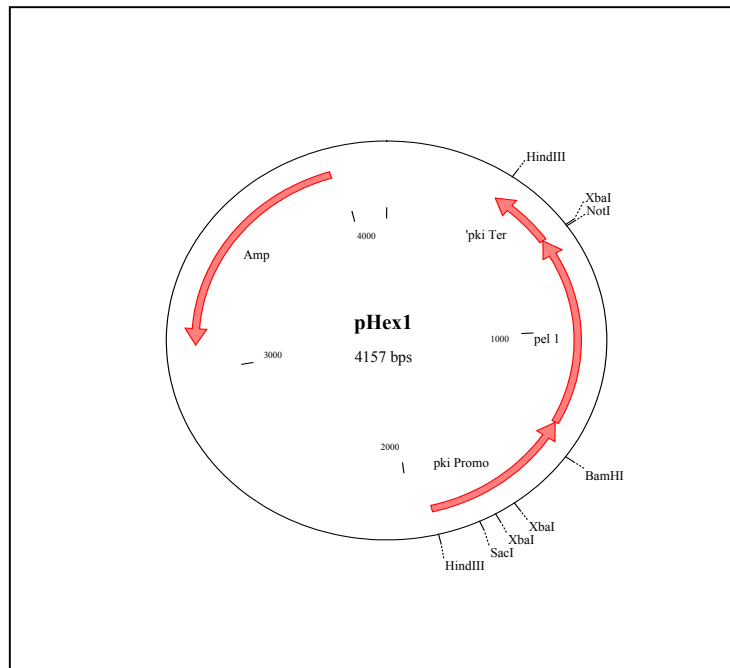
## 5. LITERATURVERZEICHNIS

## 6. ANHANG

---

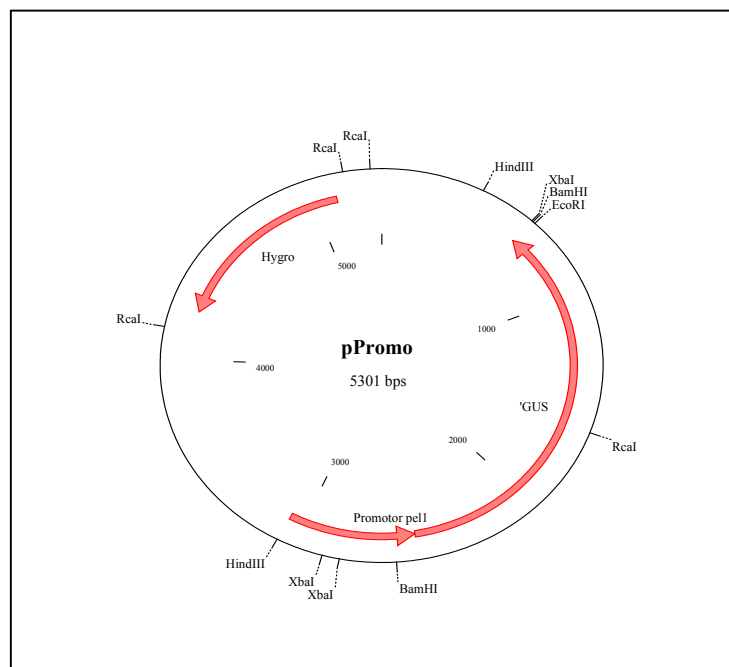
**TABELLE 6.1:** Liste der für die Klonierungen verwendeten Oligonukleotide mit Sequenzen und Annealing-Temperaturen (An-Temp).

<b>Oligonukleotid</b>	<b>Sequenz</b>	<b>An-Temp</b>
<i>pe/2uni</i>	ATGGC(CT)TGCCTCGG(AC)TACAC	55 °C
<i>peklyslrev</i>	CCGTAGTTGGA(T/C)GTTGATGCC	55 °C
<i>pe/2inv3'</i>	CGCCAACATCATCGGTGGTG	55 °C
<i>pe/invrev</i>	GCCCGTGTATCCGAGGCAC	55 °C
<i>pelcDNAuni</i>	ATGAAGTACGCCACTATCCTCG	56 °C
<i>pelcDNArev</i>	TTAGCAGGTCTTGGTCGCACC	56 °C
<i>pe/2cDNAuni</i>	ATGCACGCTCCCAGCCTTATC	56 °C
<i>pe/2cDNArev</i>	CTAGCACTTGCTGGCCTTGG	56 °C
M-13uni	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	50 °C
M-13rev	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	50 °C
Proguskasfor	AACGGTACCAGTGCCAAGCTTGCATGCCTG	63 °C
Proguskasrev	TATGGTACCGTTAGCTCACTCATTAGGCACC	63 °C
<i>pe/1uni</i>	CCCAAGCTTGAAGCTTCCCCCTTTGG	56 °C
<i>Protexpe/1stopNotI</i>	GCAGCGGCCGCTTAGCAGGTCTTGGTCGC	56 °C
<i>pe/2cDNAuniRcal</i>	ATCATGAACGCTCCCAGCCTTATC	62 °C
<i>pe/2cDNArevNotI</i>	AAGGCGGCCGCTTAGCACTTGCTGGC	68 °C
<i>pe/R1-1</i>	TGdCCGTAGTTGGyGTTTrAyGCC	55 °C
<i>pe/F1-1</i>	TGGTGGGCCGyGTCTGyGAGGyGC	55 °C



**ABBILDUNG 6.1:** Vektorkarte des Expressionsvektors pHex1 für die heterologe Expression der Pektat-Lyase 1 in *A. niger*

---



**ABBILDUNG 6.2:** Vektorkarte des Vektors für die Promotorstudien in *A. niger*. Es wurden verschiedene Promotorlängen kloniert. Die Isolation der Promotor-GUS-Kassette erfolgte durch PCR-Reaktion aus pRT-104-GUS.

---



## 6. ANHANG

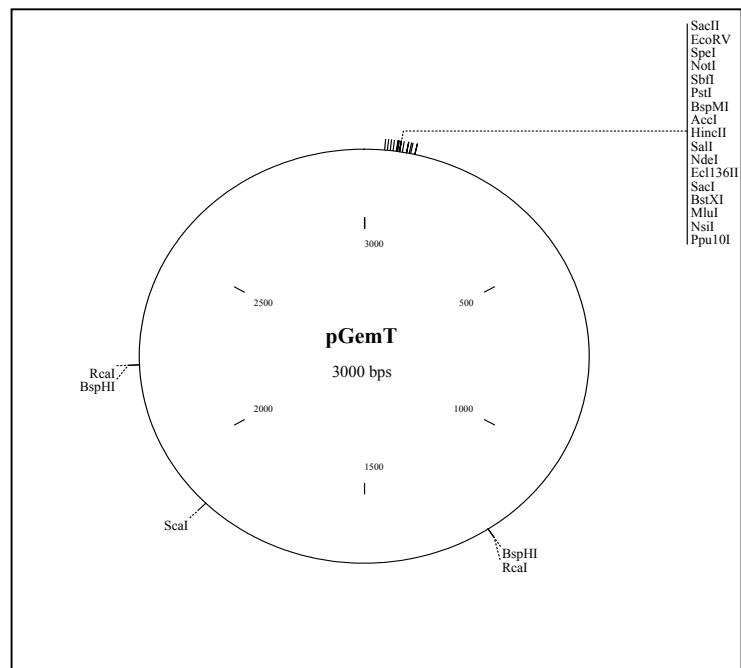


ABBILDUNG 6.3: Vektorkarte des pGemT-Vektors für die Klonierung von PCR-Fragmenten.

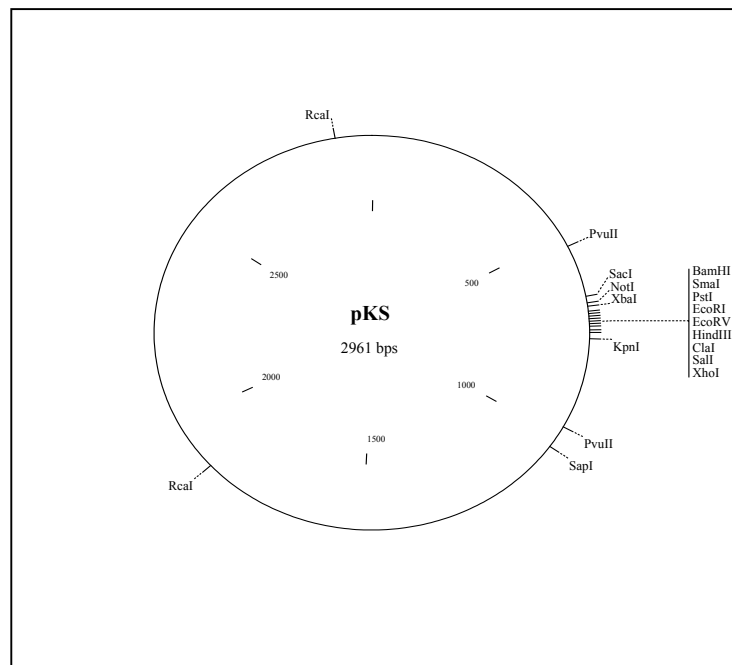


ABBILDUNG 6.4: Vektorkarte des pBluescriptIIKS-Vektors.

**Manuskript DNA/RNA-Isolation aus Pilzmycel mit Hilfe der Harnstoff-Methode**

An efficient urea based extraction protocol for the isolation of high yield, high quality nucleic acids from filamentous fungi

**Thorsten Conze**, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology,

**Bruno Moerschbacher**, Department of Plant Biochemistry and Biotechnology, University of Münster

**Neil Emans**, Department of Molecular Biotechnology, RWTH Aachen

**Dirk Prüfer**, Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology,

Address correspondence to:

**Thorsten Conze**

Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology

Department of Applied Genomics and Proteomics

Auf dem Aberg 1

57392 Schmallenberg

e-mail: conze@ime.fraunhofer.de

Tel.: +49 (0)2972-302-222

FAX: +49 (0)2972-302-368

Key words: DNA extraction, filamentous fungi, RNA extraction, urea

## 6. ANHANG

---

While a number of reagent kits for the isolation of DNA and RNA from plants and bacteria are available, none of these is optimized for the isolation of nucleic acids from filamentous fungi. The quality and yield of DNA/RNA isolated from filamentous fungi using these protocols are unsatisfactory. Similarly, when other commonly used methods for the isolation of nucleic acids from plants or microorganisms are applied to filamentous fungi, they typically yield only low amounts of nucleic acids, and the quality is often poor [1; 2]. These methods for the extraction of nucleic acids yield between 20 and 200 µg NA per gram of fresh weight mycelium. In order to isolate substantial amounts of high quality DNA and RNA from fungal mycelia, we developed a fast and simple method based on existing techniques used for the isolation of DNA from plant tissues.

High quality DNA can be isolated from plant tissues in high yields using a urea/phenol/chloroform (UPC) protocol. This simple and reliable method exploits the rapid denaturation of proteins in at least 5 M urea, followed by the extraction of nucleic acids with a mixture of phenol and chloroform, and their precipitation with isopropanol. We used the UPC protocol as the basis for the development of an efficient method for the isolation of DNA and RNA from six different fungal species: *Fusarium graminearum*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Sordaria macrospora*, *Botrytis cinerea*, and *Claviceps purpurea*. The novel UPC protocol gave significantly higher DNA and RNA yields from fungal mycelia than existing protocols. The quality of the obtained nucleic acids was assayed by assessing the suitability of selected DNA and RNA preparations for downstream applications.

The procedure for the isolation of DNA for filamentous fungi using the UPC protocol was the following: Freshly harvested mycelium was dried by vacuum filtration and snap frozen in liquid nitrogen. Alternatively, freeze-dried mycelium was also used and gave identical results. The success of the protocol depended strongly on careful grinding of the mycelium in liquid nitrogen, where care was required to ensure the material remained securely frozen at all times during grinding. After grinding, five ml of two-fold concentrated isolation buffer (0.1 M Tris, 0.6 M sodium chloride, 40 mM EDTA, 4 % Sarcosyl, 1 % SDS), 5 ml of 10 M urea and 5 ml of phenol were mixed in a 50 ml polypropylene reaction vial (Falcon, Becton Dickinson Labware Europe, France) on ice, and 0.5 g of the ground mycelium was added. The suspension was then thoroughly mixed on a laboratory vortex device for at least 30 s, carefully avoiding the generation of clumps, and placed back on ice. Denatured proteins and cell debris were removed by the addition of 10 ml of a 1/1 (v/v) mixture of phenol and chloroform, followed by vigorous vortexing. Phase separation was performed by

## 6. ANHANG

---

centrifugation at 3500 rpm at 4 °C for 5 min in a swinging bucket rotor. The upper aqueous phase containing the nucleic acids was transferred to a fresh vial, and the nucleic acids were precipitated by the addition of 0.7 vol. of ice-cold 2-propanol and centrifugation at 4000 rpm at 4 °C for 2 h. The supernatant was discarded and the pellet was washed with 70 % ethanol before centrifugation at 4000 rpm for 15 min. The pellet was air-dried and then dissolved in either 1 ml 7U/ml RNase (RNase One™, Promega Life Sciences, Mannheim, Germany) in 0.1 M Tris/HCl–buffer pH 8.0 or in 1 ml distilled water with a slightly alkaline pH of 8.3 for the removal of contaminating RNA.

A slight modification of this protocol can be used for the RNA isolation from filamentous fungi. Following the phenol/chloroform extraction, RNA was specifically precipitated by the addition of lithium chloride to the nucleic acid containing aqueous phase to a final concentration of 2 M. The precipitated RNA was then recovered by centrifugation as above. Any remaining DNA was then removed by RNase-free DNase treatment (Promega Life Sciences, Mannheim, Germany) as follows. Sixty micro-litres of the upper isolation was mixed with 10µl of each 1M KCl, 30mM Mg<sub>2</sub>Cl and 0.2M Tris-HCl, pH 8.3. Finally 100U of the DNase was added. The reaction was incubated at 37°C for two hours, the enzyme was then denatured by shifting the temperature to 75°C for 15 minutes, followed by an direct incubation on ice for another 15 minutes. DNA and RNA extraction was assessed by spectrophotometry and agarose gel electrophoresis.

Table 2 shows a brief description of the steps of the enhanced UPC-protocol.

We isolated nucleic acids from six different filamentous fungi using the enhanced UPC protocols and the results are presented in Table 1. DNA yields were significantly higher when compared to conventional methods, up to 36-times greater in the case of the wheat pathogen *F. graminearum* and 200-times greater in the case of *P. graminis*. The ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm ( $A_{260/280}$ ) ranged from 1.8 to 2.0 indicating that the UPC protocol yielded high quality DNA.

Quality of the DNA isolated was assessed by assaying its suitability for downstream applications such as PCR, restriction enzyme digestion, and Southern analysis. As an example, PCR was performed on genomic DNA isolated from axenically grown mycelium of the obligately biotrophic fungus *P. graminis* f. sp. *tritici* [3] using homologous primers for the EF-1 $\alpha$ -gene [4] (EF-1 $\alpha$ forward: 5'-GGTACCCTCGAGC GATCGGGCAGATGCACAGC-3'; EF-1 $\alpha$ reverse: 5'-CTCTTTACCCATTGTGCGACG TAGATTAGGG-3'). Using this primer combination, a 500 bp fragment of the EF-1 $\alpha$ -promotor can be amplified (200 ng of genomic DNA; 10 pmol each of both primers;

## 6. ANHANG

---

10 U of Taq-DNA-polymerase; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; final volume 25 µl). PCR was carried out using an Eppendorf Mastercycler Gradient PCR cycler (25 cycles of i) 30 s at 94 °C, ii) 60 s at 57 °C, and iii) 60 s at 72 °C; followed by 5 min at 72 °C ). When PCR products were separated on a 1 % agarose gel, the expected 500 bp fragment was seen (Fig. 1, lane 8).

We assessed the suitability of the enhanced UPC protocol for the extraction and digestion of genomic fungal DNA. Genomic DNA (5 µg in a total volume of 30 µl) from *P. graminis* f. sp. *tritici* was digested (4 h, optimum temperature) with four different restriction enzymes (1 unit *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, or *Xba*I per µg DNA). Enzymes were denatured at 75 °C and the digested DNA was separated on a 1 % agarose-gel (Fig. 1). While undigested DNA appeared as a clear band with high molecular mass, all four DNA digests showed the typical smear of fragments indicating complete digestion of the genomic DNA.

The isolation of RNA was assessed for several fungal species. Yields and quality were significantly higher when compared with conventional protocols. Figure 2 shows the isolated RNA of *F. graminearum* before and after DNase digestion. Downstream applications including Northern, RT-PCR were performed successfully; demonstrating the quality of the NA isolated using the enhanced UPC protocol (data not shown).

DNA and RNA isolated using the enhanced UPC protocols was shown to be stable for at least two months when stored in water at 4 °C (DNA) or at -20 °C (RNA). The enhanced UPC procedure to smaller amounts of fungal mycelium (e.g. <0.1 g) by adjusting the volumes used, was successful and without losses in the relative yield and quality of the NA (data not shown). We have successfully used genomic DNA and RNA isolated from *F. graminearum* using the UPC protocol for the cloning of a number of cell wall degrading enzymes, and for downstream methods such as PCR, RT-PCR, Southern and Northern analysis, and the generation of sub-genomic and cDNA libraries (manuscript in preparation). This demonstrated that both DNA and RNA isolated using the UPC protocol was of sufficient quality for all routine downstream applications.

Our results indicate that

the simple and fast enhanced UPC protocol can be used successfully for the isolation of DNA and RNA from filamentous fungi;

DNA and RNA yields are significantly higher than achieved with alternative conventional methods;

the quality of the DNA and RNA obtained is sufficient for typical downstream applications.

## 6. ANHANG

---

### References:

Doyle J. J., J. L. Doyle 1991: Isolation of plant DNA from fresh tissue. FOCUS 12: 13–15

Nucleospin Plant DNA Isolation Kit: Working procedure for fungi. Macherey and Nagel GmbH & Co. KG, Düren Germany

Fasters M., U. Daniels, B. M. Moerschbacher 1993. A simple and reliable method for growing the wheat stem rust fungus, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, in liquid culture. Physiological and Molecular Plant Pathology 42: 259-265

Schillberg S, Gross P, Tiburzy R. 1995: Isolation and characterization of the EF-1 alpha gene of the filamentous fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Curr. Genet. 27(4):367-72

**Table 1. DNA concentrations measured spectrophotometrically at 260 nm.**

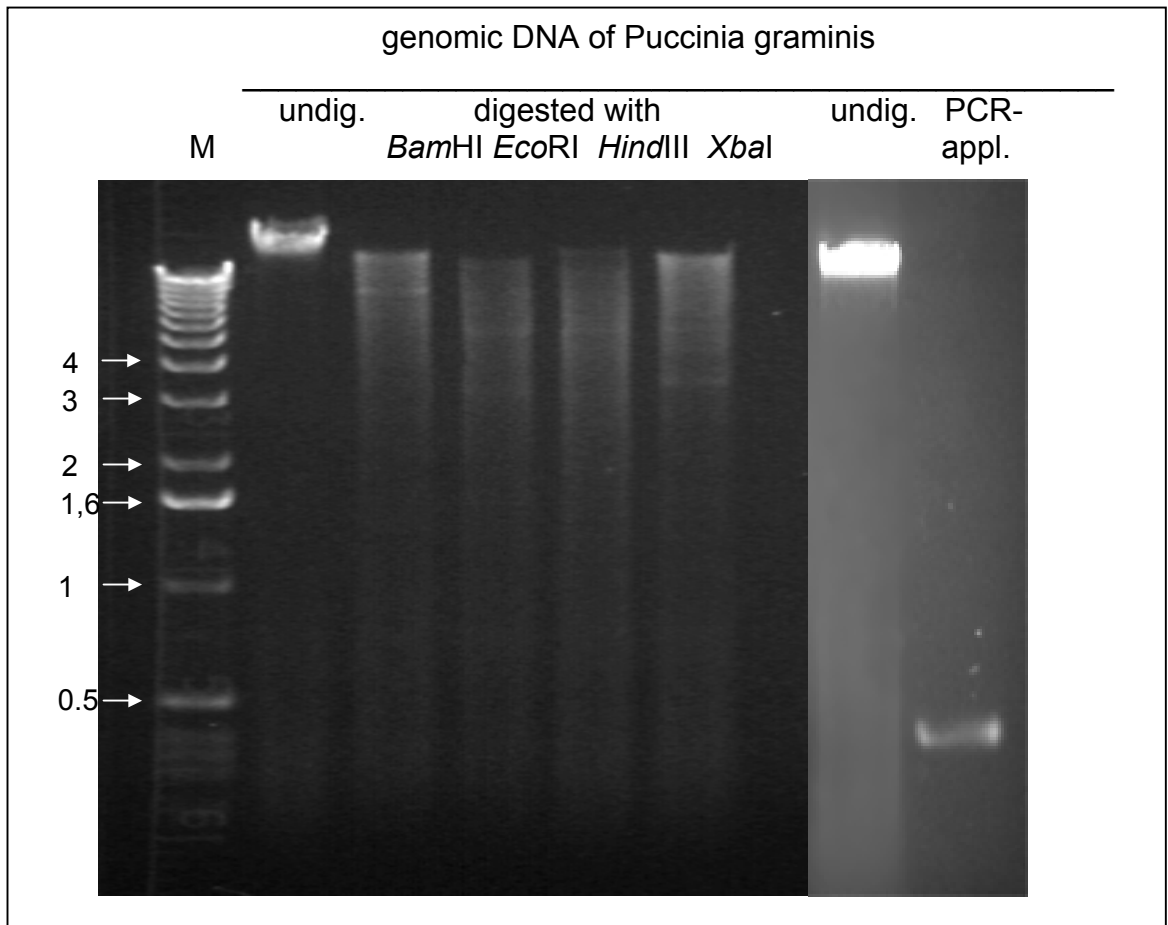
No.	Organism	Quantity (g fresh weight (fw) or dry weight (dw))	DNA yield [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]	
			Urea method <sup>(1)</sup>	alternative methods
1	<i>B. cinerea</i>	0.4 (fw)	2025	625 <sup>(2)</sup>
2	<i>C. purpurea</i>	0.5 (dw)	5780	1200 <sup>(2)</sup>
3	<i>F. graminearum</i>	0.2 (fw)	360	10 <sup>(3)</sup>
4	<i>P. graminis</i>	0.15 (dw)	7200	330 <sup>(2)</sup>
5	<i>P. infestans</i>	0.3 (fw)	500	n.t.
6	<i>S. macrospora</i>	0.5 (fw)	360	n.t.

DNA was re-dissolved in 1ml double-distilled water and measured in an 1:50 dilution in an Eppendorf BioPhotometer <sup>TM</sup>. Sample 3 was re-dissolved in 0.3ml of double-distilled water.  
Method according to Doyle and Doyle [1] , re-dissolved in 0.5 ml of double-distilled water.  
Macherey & Nagel extraction kit for plant DNA, also applicable for filamentous fungi, DNA re-dissolved in 0.1 ml of double-distilled water.  
n.t. not tested

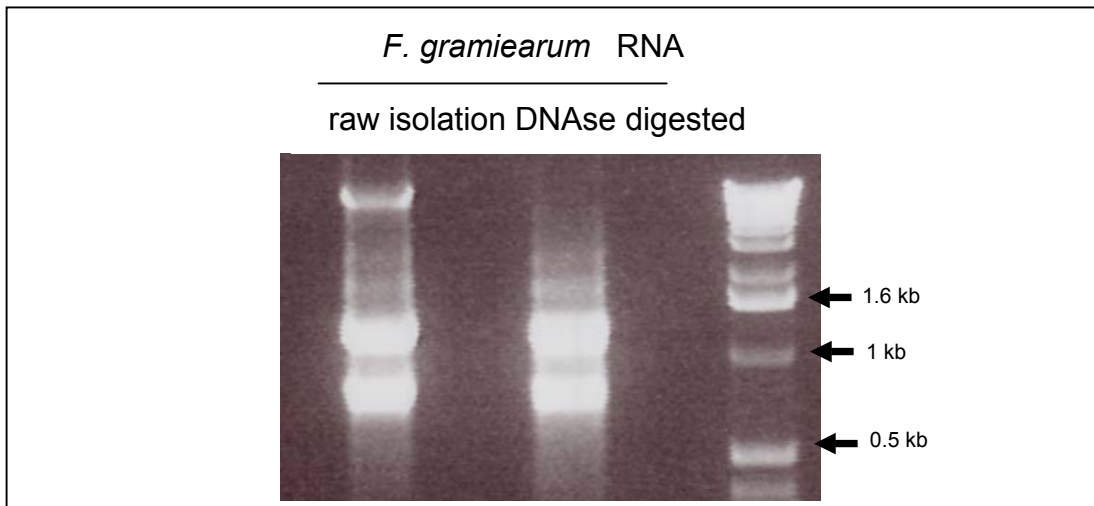
**Table 2: enhanced UPC protocol for the isolation of DNA and RNA from filamentous fungi**

1. Harvest mycelium and grind to a very fine powder under liquid nitrogen.
2. Prepare 5 ml of two-fold concentrated isolation buffer (0.6 M sodium chloride, 0.1 M Tris, 40 mM EDTA, 4 % Sarcosyl, 1 % SDS), 5 ml of 10 M urea and 5 ml of phenol in a clean Falcon tube on ice and add 0.5 g of the ground mycelium.
3. Mix the suspension well by vortexing for at least 30 s avoiding to produce clumps, and place back on ice.
4. Add 10 ml of a 1:1 (v/v) mixture of phenol and chloroform, mix well.
5. Separate phases by centrifugation at 3500 rpm at 4 °C for 5 min in a swinging bucket rotor.
6. Transfer the upper, nucleic acids containing aqueous phase into a fresh Falcon tube, precipitate the nucleic acids with 0.7 vol of ice-cold 2-propanol by centrifugation at 4000 rpm at 4 °C for 2 h in a swinging bucket rotor. In the case of RNA-isolation precipitation with exactly 2M LiCl prior to the use of propanol is done.
7. Wash the pellet with 70 % ethanol and re-centrifuge at room temperature at 4000 rpm for 15 min in a swinging bucket rotor.
8. Re-dissolve the air-dried pellet in 1 ml of 0.1 M Tris/HCl–buffer pH 8.0, or in distilled water with slightly basic pH, containing RNAses to remove contaminating RNA.
9. For isolation of RNA raise the aqueous phase from step 6 to exactly 2 M lithium chloride prior to the isopropanol precipitation.





**Figure 1. Genomic DNA of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (*Pgt*) isolated using the enhanced UPC protocol was either undigested (lane 2) or digested with four different restriction enzymes (lanes 3-6) and PCR product (lane 8) amplified with primers derived from *Pgt* EF1- $\alpha$ -promotor sequence.** Five micrograms of genomic DNA were incubated with 1 U/ $\mu$ g of restriction enzyme (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III. or *Xba*I) in a total volume of 30  $\mu$ l and incubated at 37 °C for four hours. The digestion products were separated on a 1 % agarose gel. Two hundred ng of genomic DNA of *Pgt* were used as template for PCR. PCR profile was 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94 °C for 30 s, 57°C for 1 min, 72 °C for 1 min, followed by 72 °C for 5 min. The DNA standard is a 1-kb ladder (M) (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), scale given in kb.



**Figure 2.** RNA extracted from *Fusarium graminearum* using the enhanced UPC protocol, undigested (lane 1) or digested with RNase free DNase. Five micrograms of total nucleic acid isolation were incubated with 5 U/ $\mu$ g of RNase free DNase in a total volume of 20  $\mu$ l and incubated at 37 °C for eight hours. The separation of both isolations was on a 1 % agarose gel. The standard is a 1-kb DNA ladder (Marker) (GIBCO BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany), scale given in kb.

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Moerschbacher danke ich für die Überlassung des Themas für diese Dissertation, für seine stetige Bereitschaft zur Diskussion, für seine Tips und Anregungen und besonders für seine Fähigkeit zu motivieren und mich selbst aus den tiefsten Löchern der Forscherverzweiflung wieder herauszuholen.

Dr. Prüfer gilt mein Dank für die Übernahme des Co-Referats dieser Arbeit. Ohne die Weitergabe seiner molekularbiologischen Kenntnisse wäre der Einstieg in die Arbeit und deren Fortschritt sicher nicht so glatt verlaufen.

Ein Dank geht auch an das „Team“ vom Fraunhofer IME, das mir die letzten 3 Jahre sehr leicht gemacht hat. Im besonderen gilt das natürlich für „unsere“ TA Steffi, die mir einen großen Teil der praktischen Arbeiten abgenommen hat und somit entscheidend zum Gelingen beigetragen hat.

Die drei absolut wichtigsten Leute der letzten drei Jahre waren aber Kerstin, Heiko und Beata, deren Verdienste hier nicht ausreichend zu würdigen sind. Deshalb will ich das auch gar nicht erst versuchen, ich denke jeder der drei weiß, was ich meine.

**DANKE für alles!**

## Tabellarischer Lebenslauf

Thorsten Conze

geboren am 07. März 1974 in Schmallenberg

Familienstand ledig

Name des Vaters Josef Conze

Name der Mutter Edith Conze, geb. Schefke

**Schulbildung:** Grundschule Dorlar von 1980 bis 1984  
Realschule Fredeburg von 1984 bis 1990  
Gymnasium der Benediktiner  
In Meschede von 1990 bis 1993

**Hochschulreife:** am 16. Juni 1993 in Meschede

Militärdienst: ABC-Abwehr-Bataillon 7 in Höxter von 1993 bis 1994

**Studium:** Diplom-Biologie  
Westfälische Wilhelms-Universität  
Münster von 1994 bis 2003

**Prüfungen:** Diplom im Fach Biologie am 14. März 2000 an der  
WWU Münster

**Tätigkeiten:** studentische Hilfskraft von 08. 1999 bis 12. 1999 am  
Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen,  
AG Prof. Moerschbacher, WWU Münster

**Beginn der Dissertation:** 01. April 2000 am Fraunhofer Institut für Molekularbio-  
logie und Angewandte Oekologie in Schmallenberg,  
Betreuer der Arbeit  
Prof. Dr. Moerschbacher

