Funktionelle Charakterisierung von RLP1, einem Rhomboid-ähnlichen Protein des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Claudia Mönchmeier

geb. am 12. Februar 1982 in Erfurt

Gutachter

1. Prof. Dr. D. Scheel
2. Prof. Dr. M. Stubbs
3. Prof. Dr. I. Bruchhaus

verteidigt in Halle (Saale) am 23. August 2011

Meinen Eltern

Ab esse ad posse valet,
a posse ad esse non valet.

Inhaltsverzeichnis

A Verzeichnis der verwendeten Kennzeichnungen **i**

A.1 Abkürzungen i

A.2 Einheiten iii

A.3 Aminosäurekode iii

A.4 Liste der verwendeten Stämme und des genutzten Saatgutes iv

A.5 Bemerkungen iv

1 Einleitung **1**

1.1 Wachstum von *Rhynchosporium commune* auf suszeptiblen Gerstensorten . . 1

1.2 Identifizierung eines möglichen Virulenzfaktors 2

1.3 Rhomboid-ähnliche Proteine 3

1.3.1 Verbreitung der Rhomboid-ähnlichen Proteasen 3

1.3.2 Kernstruktur der Rhomboid-ähnlichen Proteasen 4

1.3.3 Hydrolyse in hydrophober Umgebung - der Reaktionsmechanismus . . 5

1.3.4 Substrate 7

1.3.5 Regulation der Aktivität Rhomboid-ähnlicher Proteasen 7

1.3.6 Funktionelle Diversität von Rhomboid-ähnlichen Proteasen 9

1.4 Zielstellung 16

2 Material und Methoden **17**

2.1 Chemikalien 17

2.2 Puffer und Medien 17

2.3 Anzucht von *R. commune* 21

2.3.1 Kultivierung auf Lima-Bohnen-Agar 21

2.3.2 Pilzanzucht in Flüssigmedium 21

2.3.3 Sporenisolation von Limabohnen-Agar 21

2.3.4 Sporenisolation nach der Maracas-Methode 22

2.3.5 Inokulation von Gerstenpflanzen 22

2.3.6 Färbung von *R. commune* auf infizierten Gerstenblättern 22

2.3.7 Mikroskopie 22

2.4 Nukleinsäureanalytik 23

2.4.1 Präparation genomischer DNA aus Pilzmyzel bzw. Pflanzenmaterial . 23
2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA 23
2.4.3 DNA-Extraktion aus *S. cerevisiae* zur Überprüfung der Transformation 23
2.4.4 RNA-Isolation 24
2.4.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA 24
2.4.6 Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA 24
2.4.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen 25
2.4.8 Restriktion von DNA 25
2.4.9 PCR 25
2.4.10 *real-time*-PCR 25
2.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten 26
2.4.12 Sequenzierung 26
2.4.13 Synthese von cDNA 26
2.4.14 DNA-DNA-Hybridisierung 27
2.5 Klonierung 27
2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen 27
2.5.2 Transformation von *E. coli* 28
2.5.3 Transformation von *S. cerevisiae* 28
2.5.4 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen 28
2.5.5 Transformation von *A. tumefaciens* 28
2.5.6 *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *R. commune* 29
2.5.7 Herstellung von *R. commune* Protoplasten 29
2.5.8 Protoplastentransformation von *R. commune* 29
2.6 Proteinanalytik 29
2.6.1 SDS-PAGE 29
2.6.2 Proteinnachweis mit Antikörpern 30
2.7 Auswertungen 31
2.7.1 Nuklein- und Aminosäurevergleiche sowie Vektorkonstruktionen . . . 31
2.7.2 Prognose von Signalpeptiden 31
2.7.3 Prognose von Transmembrandomänen 31
2.7.4 Modellierung der Proteinstruktur der *Rc*RLP1 32

3 Ergebnisse **33**

3.1 Analyse der REMI-Mutante YH4.5 33

3.1.1 Integration des Plasmids pAN7-1 in das Genom von YH4.5 33

3.1.2 Expression von *Rc*RLP1 in der Mutante YH4.5 36

3.2 Sequenzvergleich der *RLP1*-Allele von *Rhynchosporium* 38

3.3 Genstruktur 39

3.4 Expression von *Rc*RLP1 41

3.4.1 Expression von Rc*RLP1* in *ex planta* gewachsenen *R. commune*-Kulturen 41

3.4.2 Untersuchungen zum Referenzgen für Expressionsanalysen *in planta* . 41

3.4.3 Phänotyp des *Rhynchosporium*-Isolats UK7 auf der Gerstensorte Ingrid 44

3.4.4 Phänotyp des *Rhynchosporium*-Isolats UK7 auf der Gerstensorte Atlas 47

3.4.5 Infektion der Gerstensorte Atlas 46 mit dem *Rhynchosporium*-Isolat UK7 49

3.4.6 *In silico*-Analyse von Promotorelementen 51

3.5 Deletion der Rc*RLP1* 53

3.5.1 Das Thymidinkinase-Deletionssystem nach Gardiner & Howlett (2004) 53

3.5.2 Identifizierung eines homologen Rekombinationsereignisses 55

3.5.3 Expression von *RLP1* in der Deletionsmutante #744 57

3.5.4 Generierung der Deletionsmutante UK7Δ*RLP1* 58

3.5.5 Überprüfung der *RLP1*-Expression in der Deletionsmutante UK7Δ*RLP1* 59

3.6 Phänotypanalyse von UK7-$RLP1_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* 60

3.6.1 Wachstum von UK7, UK7-$RLP1_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1 in planta* . . 60

3.6.2 Untersuchungen zur Keimfähigkeit und Sporenbildung von UK7, UK7-$RLP1_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* 63

3.6.3 Mikroskopischer Vergleich von *ex planta* gewachsener UK7-, UK7-$RLP1_{trunc}$- und UK7Δ*RLP1*-Kulturen 64

3.7 Stammbaumanalysen nach Lemberg & Freeman (2007) 65

3.8 Struktur des RLP1-Proteins 66

3.8.1 Prognose der Transmembranbereiche 66

3.8.2 Aminosäurevergleich der *Rc*RLP1 mit anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen 67

3.8.3 Homologiemodell der RLP1 . . . 69
3.8.4 Analyse des aktiven Zentrums . . . 72
3.8.5 Kristallisierung der RLP1 . . . 73
3.9 Aktivitätsanalysen in *E. coli* . . . 74
3.9.1 Komplementation von GW170Δ*GLPG* mit Rc*RLP1* . . . 74
3.9.2 Aktivierung der RLP1 durch Punktmutation . . . 75
3.10 Lokalisierung von *Rc*RLP1 . . . 76
3.10.1 Prognose einer möglichen mitochondrialen Lokalisierung . . . 76
3.10.2 Importstudien an isolierten Organellen aus Erbse (*Pisum sativum* L.) 77
3.10.3 N-terminale Fusion des *Rc*RLP1 Proteins an *Ave*GFP . . . 79
3.11 Untersuchungen zur möglichen Funktion der RLP1 in Mitochondrien . . . 80
3.12 Das Substrat der *Rc*RLP1? . . . 82
3.12.1 Exprimierte mitochondriale Proteine mit Transmembrandomänen . . 83
3.12.2 "Docking-Studien" mit bekannten Substraten im aktiven Zentrum der RLP1 . . . 84
3.12.3 Aktivitätsanalysen in *E. coli* mit modifiziertem Substrat . . . 88
3.13 Untersuchungen zu möglichen weiteren Rhomboid-ähnlichen Proteinen in *R. commune* . . . 90

4 Diskussion **92**
4.1 Einfluss der RLP1 auf die Pathogenität von *R. commune* . . . 92
4.2 Zusammenhang zwischen Struktur und Funktionalität der RLP1 . . . 92
4.3 Mögliche Funktion einer mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Protease . . . 96
4.4 Paraloge zur Rc*RLP1* . . . 99

5 Weiter führende Arbeiten **102**

6 Zusammenfassung **104**

Z Anhang **V**
Z.1 Oligonukleotide . . . V
Z.2 Schematische Darstellung von Vektoren und Sequenzen . . . VIII
Z.2.1 pAN7-1 . . . VIII

Z.2.2 pGW88 VIII
Z.3 Konstruktion spezifischer Vektoren VIII
Z.3.1 *RLP1*$_c$-pCR2.1 VIII
Z.3.2 cRc*RLP1*-pBAT IX
Z.3.3 Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP2000 und Rc*RLP1*$_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200 X
Z.3.4 Rc*RLP1*-pBBR1MCS5 und Derivate XIII
Z.3.5 P$_{ADH}$-Rc*RLP1*$_c$-T$_{ADH}$-YEplac181 und Derivate XIV
Z.3.6 *OPA1*-pGW88 XIV
Z.3.7 Kristallisierungsvektoren XV
Z.4 Sequenzvergleiche XVI
Z.4.1 Vergleich der RLP1-Aminosäuresequenz mit der UniProt-Datenbank . XVI
Z.4.2 Aminosäurevergleich vieler Rhomboid-ähnlicher Proteasen mit der *Rc*RLP1XVIII
Z.4.3 Aminosäurevergleich der 11 Proteine mit Domäne DUF1751 und der *Rc*PUF1 XVIII

A Verzeichnis der verwendeten Kennzeichnungen

A.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATMT	*Agrobacterium tumefaciens mediated transformation*
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl2-assoziiertes Protein
BLASTP	*Basic Local Alignment Search Tool Protein*
BSA	*bovine serum albumin*
$CaCl_2$	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCP1	Cytochrom *C* Peroxidase 1
cDNA	*complementary deoxyribonucleic acid*
C-Terminus	Carboxy-Terminus
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	*deoxyribonucleic acid*
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	*epidermal growth factor*
eGFP	*enhanced green fluorescent protein* (Thastrup *et al.*, 1995)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST-Datenbank	Ansammlung von Sequenzen exprimierter Gene (*expressed sequence tag*)
FdU	Fluordesoxyuridin
GFP	*green fluorescent protein* aus *Aequorea victoria*
GPD	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GTPase	Guaninnukleotid-bindendes Protein
Hax1	HS1-assoziiertes Protein
HPT	Hygromycin-B-Phosphotransferase aus *Escherichia coli*
HtrA2/Omi	*high temperature requirement protein A2*
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LacZ	β-Galaktosidase (Protein Z des Lac-Operons) aus *Escherichia coli*
LB	linke Grenze in Vektoren für Agrobakterien
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mAAA-ATPase	*mitochondrial ATPases associated with various cellular activities*
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mfn1	Mitofusin 1
MGM1	*mitochondrial genome maitenance* 1
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	*messanger ribonucleic acid*
NIP	Nekrosen induzierendes Protein

Abkürzung	Bedeutung
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
OPA1	*optic atrophy*
PARL	*Presenilin associated Rhomboid-like*
PCP1	*processing of cytochrome c peroxidase*
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PUF	Protein unbekannter Funktion
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RB	rechte Grenze in Vektoren für Agrobakterien
REMI	*restriction enzyme mediated insertion mutagenesis*
RLP	Rhomboid-ähnliche Protease (von *Rhomboid like protease*)
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkription gefolgt von Polymerasekettenreaktion
SC-Medium	*synthetic complete medium*
SDS	Natriumdodecylsulfat
T_a	Anlagerungstemperatur von Oligonukleotiden
TAE	*Tris-buffered acetate EDTA*
TBST	*Tris-buffered saline Tween20*
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFT	Trifluorothymidin
TMD	Transmembrandomäne
TMMH	*truncated multi-modular hash function*
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrpC	Teil des Tryptophan-Operons
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
YPD	*yeast extract peptone dextrose medium*
YPG	*yeast extract peptone glycerol medium*
YNB	*yeast nutrient base*

A.2 Einheiten

Größe	Einheit	Abkürzung
Anzahl an Aminosäuren	Aminosäure	AS
Beleuchtungsstärke	Lux	lx
Druck	Pascal	Pa
Fläche	Quadratzentimeter	cm^2
Fliehkraft	Drehzahl	g
Konzentration (Masse)	Gramm pro Liter	$\frac{g}{L}$
Konzentration (Stoffmenge)	Molar	M
Länge	Meter	m
	Ångström	Å
Masse	Gramm	g
Nukleotidgröße	Basenpaare	bp bzw. b
Optische Dichte	-	-
Reinheit (Nukleotide)	-	-
Spannung	Volt	V
Stromstärke	Ampere	A
Temperatur	Grad Celsius	℃
Verdünnungsfaktor	-	-
Volumen	Liter	L
Zeit	Sekunde	sec
	Minute	min
	Stunde	h
	Tag	d

A.3 Aminosäurekode

Code		Aminosäure	Code		Aminosäure	Code		Aminosäure
A	Ala	Alanin	G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin
R	Arg	Arginin	H	His	Histidin	S	Ser	Serin
N	Asn	Asparagin	I	Ile	Isoleucin	T	Thr	Threonin
D	Asp	Aspartat	L	Leu	Leucin	W	Trp	Tryptophan
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
E	Glu	Glutamat	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
Q	Gln	Glutamin	F	Phe	Phenylalanin			

A.4 Liste der verwendeten Stämme und des genutzten Saatgutes

Organismus	Stamm	Bemerkung
A. tumefaciens	AGL0	hypervirulentes T_i-Plasmid pTiBo542 enthalten
E. coli	DH5α	F' Φ80*lac*ZΔM15 Δ(*lac*ZYA-*arg*F) U169 *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (rK−, mK+) *pho*A *sup*E44 λ− *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1
	GW170	Wildtyp (Maegawa *et al.*, 2005)
	GW221	GW170Δ*GLPG*, GW170 mit Deletion in *GLPG* (Maegawa *et al.*, 2005)
	XL1Blue	*rec*A1 *end*A1 *gyr*A96 *thi*-1 *hsd*R17 *sup*E44 *rel*A1 *lac* [F' *pro*AB *lac*I^{q}ZΔM15 Tn10 (Tetr)]
H. vulgare	Ingrid	hochsuszeptibel gegenüber *R. commune*
	Atlas	suszeptibel gegenüber *R. commune* (Ali *et al.*, 1976; Habgood & Hayes, 1971; Rohe *et al.*, 1995)
	Atlas 46	resistent gegenüber *R. commune* (Hv*RRS1*) (Ali *et al.*, 1976; Habgood & Hayes, 1971; Rohe *et al.*, 1995)
R. commune	*strain*5	Wildtyp
	*strain*5-YH4.5	REMI-Mutante mit *strain*5 Hintergrund
	UK7	Wildtyp
S. cerevisiae	BY4741	Wildtyp
	Δ*PCP1*	Deletion in *PCP1* (Herlan *et al.*, 2004)

A.5 Bemerkungen

Gene sowie aus dem Englischen bzw. Lateinischen übernommene Begriffe werden in dieser Arbeit kursiv hervorgehoben.

1 Einleitung

Zu den ältesten Kulturpflanzen gehört die Gerste (*Hordeum vulgare* L.). Ihre Kultivierung begann bereits vor über 10.000 Jahren im Mittleren Osten (Badr *et al.*, 2000; Zohary & Zopf, 2001; Salamini *et al.*, 2002). In Europa wurde Gerste erst ab der Jungsteinzeit angebaut. Mit der Ausbreitung des Ackerbaus nach Nordeuropa konnte sich der Pilz *Rhynchosporium* zu einem Getreidepathogen entwickeln. Dies geschah vor etwa 1200 bis 3600 Jahren, indem sich die Urpopulation, welche Wildgräser infizierte, in vier Spezies mit unterschiedlicher Wirtsspezifität aufspaltete, *Rhynchosporium agropyri*, *Rhynchosporium commune*, *Rhynchosporium orthosporum* und *Rhynchosporium secalis* (Zaffarano *et al.*, 2010).
Das Wirtsspektrum von *R. commune* beinhaltet die Gerste und die Großährige Trespe (*Bromus diandrum*) (Zaffarano *et al.*, 2006, 2008). Die Blattfleckenkrankeit der Gerste, welche durch *R. commune* ausgelöst wird, reduziert den Gerstenertrag jährlich um bis zu 40 % (Bouajila *et al.*, 2010). In Deutschland ist dies einer der vielen Gründe für den jährlichen Einsatz von über 10.000 Tonnen antimikrobieller Substanzen (FAOSTAT, 2010). Durch die Forschung wird der Infektionsmechanismus des Gersten-Pathogens untersucht. Dadurch kann die Anfälligkeit bzw. Resistenz mancher Sorten analysiert und später für die Landwirtschaft genutzt werden.

1.1 Wachstum von *Rhynchosporium commune* auf suszeptiblen Gerstensorten

R. commune vermehrt sich durch asexuell gebildete Sporen (Konidien), welche in Anwesenheit von Wasser auskeimen. Die Keimhyphen sind septiert und bilden auf dem Pflanzenblatt sitzend an der Spitze eine Appressorium-ähnliche Struktur. Damit gelingt es der Keimhyphe, die Kutikula zu penetrieren. Anschließend wachsen schlanke Pilzhyphen zwischen der Kutikula und der Epidermis zunächst häufig über den antiklinen Zellwänden (Ayesu-Offei & Clare, 1970).
In anfälligen (suszeptiblen) Gerstensorten schwillt die epidermale Zellwand in Nachbarschaft wachsender Hyphen an bis die Zelle kollabiert. Später kommt es auch zum Zusammenbrechen von Mesophyllzellen (Ayesu-Offei & Clare, 1970).
Durch zahlreiche Verzweigungen bildet der Pilz ein großflächiges subkutikulares Hyphennetzwerk aus. Bei Aufeinandertreffen von zweier Pilzhyphen ändert sich die Struktur des Pilzes. Er bildet dann ein dicht gepacktes Stroms, welches auch aus mehreren Zelllagen bestehen kann. Die Hyphen des Stromas sind sehr kurz septiert. Die Konidien werden meist vom Stroma gebildet. Oft reißt dort die Kutikula großflächig auf, und ganze Sporenherde werden an der Oberfläche frei (Ayesu-Offei & Clare, 1970).
Makroskopisch wird die Infektion der Gerstenblätter erst als glänzende Stelle auf der Blattspreite sichtbar. Es folgen zunächst wässrig Läsionen. Zu späteren Stadien der Pathogenese ver-

dichten sich die Läsionen, trocknen aus und bilden Nekrosen, die das ganze Blatt bedecken können (Lehnackers & Knogge, 1990).

1.2 Identifizierung eines möglichen Virulenzfaktors

Über den molekularen Mechanismus der Infektion ist nur wenig bekannt. Da die pilzlichen Hyphen keinen direkten Kontakt zum Plasmalemma der Pflanzenzelle haben, schloss man, dass die Infektion über vom Pilz sezernierte Moleküle gesteuert wird, welche durch die pflanzliche Zellwand diffundieren. Im Kulturfiltrat *ex planta* gewachsenen Pilzmyzels konnten drei sezernierte Proteine identifiziert werden, die auf noch ungeklärte Weise Nekrosen auf Gerstenblättern induzieren (NIP1, NIP2 und NIP1, Wevelsiep, 1991). Sie sind alle drei kleiner als 10 kDa und cysteinreich. Von NIP1 und NIP3 ist zusätzlich bekannt, dass sie die H^+-ATPase im Plasmalemma der Pflanzenzelle stimulieren (Wevelsiep *et al.*, 1993). Ferner wurde *NIP1* als Avirulenzgen korrespondierend zum Resistenzgen 1 (Rrs1, Rohe *et al.*, 1995) identifiziert. Der Infektionsmechanismus des phytopathogenen Pilzes *R. commune* ist ein komplexer Vorgang, der nicht allein auf sezernierte Proteine gestützt ist. Es wird eine Vielzahl an Prozessen vermutet, die notwendig sind, um die Pflanze zu erkennen und eine Infektion auszulösen. Spezifisch für das Auslösen der Virulenz benötigte Gene nennt man Virulenzfaktoren. Die Identifizierung solcher Virulenzfaktoren stand in den letzten Jahren im Fokus der Forschung. Im Fall von *R. commune* wurde experimentell unter anderem die Restriktionsenzym-vermittelte Insertion (REMI) verwendet. Dafür wurde ein Plasmid mit einem Selektionsmarker genutzt, der eine Selektion mit einem Antibiotikum erlaubt. Das Plasmid wurde mit einem Restriktionsenzym linearisiert und anschließend in Anwesenheit desselben Restriktionsenzyms in den Pilz transferriert. Das Enzym spaltet die genomische DNA des Pilzes an wenigen Stellen, in die das linearisierte Plasmid mit den kompatiblen Enden integrieren kann (Kahmann & Basse, 1999). Diese Integration geschieht zufällig. Findet sie in einem Virulenzgen statt, so wird dieses inaktiviert und die Virulenz wird beeinträchtigt. Solche Mutanten sind dann nicht in der Lage, auf suszeptiblen Pflanzen dem Wildtyp entsprechende Symptome zu erzeugen. Die REMI-Mutagenese birgt allerdings Risiken. So gibt es Belege für eine Vielzahl von falsch-positiven Mutanten. Der Anteil liegt bei filamentösen Pilzen zwischen 33 und 64 % (Sweigard *et al.*, 1998; Tanaka *et al.*, 1999; de Souza *et al.*, 2000). Mögliche Erklärungen sind mehrfache Integrationen des Plasmids oder Doppelstrangbrüche der DNA, die nicht durch Reparaturmechanismen geschlossen werden konnten.
Die REMI-Mutante YH4.5 (Yuill, 2008) stellt den Ausgangspunkt dieser Arbeit dar. Sie wurde mit dem Plasmid pAN7-1, das das Hygromyzin-Resistenz-Gen enthält, und der Restriktionsendonuklease *Hin* dIII generiert. Das australische Isolat *strain*5 wurde als Ausgangsisolat genutzt. YH4.5 war bei vier durchgeführten Infektionsexperimenten auf der hochsuszeptiblen Gerstensorte Sloop (Akzessionsnummer: WI2875-22, University of Adelaide, Barley Breeding Programm) apathogen, weshalb man von einer Integration in einem Virulenzgen

ausging. Zusätzlich zeichnete sich die Mutante durch ein verlangsamtes *ex-planta*-Wachstum und keine Konidienbildung aus. Durch PCR-Walking (Devic *et al.*, 1997) wurde die genomische DNA, welche die Integration flankiert, sequenziert. Daher wurde 442 bp in 3'-Richtung der Integration ein möglicher offener Leserahmen entdeckt, der für ein Protein kodieren könnte. Ein Vergleich dieser Sequenz mit der NCBI-Datenbank zeigte eine hohe Ähnlichkeit zu Rhomboid-ähnlichen Proteinen.

1.3 Rhomboid-ähnliche Proteine

Rhomboid1 aus *Drosophila melanogaster* ist eine membranständige Protease. Sie ist am Prozess der regulierten Intramembranproteolyse beteiligt. Die nach dieser Protease benannte Familie der Rhomboid-ähnlichen Proteine wird in drei Subfamilien untergliedert: die Rhomboid-ähnlichen Proteasen, die iRhom und die inaktiven Rhomboid-Homolgen. Die beiden letzteren besitzen dabei anscheinend keine proteolytische Aktivität. Der Unterschied der beiden Subfamilien liegt in der phylogenetischen Verwandtschaft innerhalb der Subfamilie, die bei den inaktiven Rhomboid-Homologen nicht vorhanden ist. Im Gegensatz dazu stellen die Rhomboid-ähnlichen Proteasen (EC 3.4.21.105) katalytisch aktive Enzyme dar (Lemberg & Freeman, 2007). Die für die Reaktion wichtigen Aminosäuren sind in Transmembrandomänen verankert und katalysieren die Spaltung des Substrates, das selbst mindestens eine Transmembrandomäne enthält, nahe an der Membranoberfläche oder in der Membran. Dies stellt einen wirksamen Kontrollmechanismus dar, da durch die Prozessierung das Substrat aktiviert werden kann. Die Rhomboid-ähnlichen Proteasen sind aufgrund ihrer weitläufigen Funktionen ein Brennpunkt in der heutigen Forschung.

1.3.1 Verbreitung der Rhomboid-ähnlichen Proteasen

Die Proteinfamilie der Rhomboid-ähnlichen Proteine ist evolutionär stark konserviert. Viele dieser Proteine sind anscheinend aktiv (Koonin *et al.*, 2003; Lemberg & Freeman, 2007). Im Genom der meisten Prokaryoten ist nur ein Protein kodiert; manche Prokaryoten besitzen jedoch zwei oder drei Paraloge (Koonin *et al.*, 2003). Eukaryoten weisen meist weit mehr Rhomboid-ähnliche Proteine auf als Prokaryoten. *Drosophila melanogaster* enthält beispielsweise sieben entsprechende Gene, *Arabidopsis thaliana* 13 (Koonin *et al.*, 2003).
Obwohl diese Proteinfamilie in allen Reichen des Lebens verbreitet ist, konnte man zeigen, dass Rhomboid-ähnliche Proteine nicht essentiell für die Zelle sind. Koonin *et al.* (2003) wiesen auf das Fehlen jeglicher Rhomboid-ähnlicher Proteine in manchen Organismem mit sehr kleinen Genomen hin. Darunter befinden sich das Mikrosporidium *Encephalitozoon cuniculi*, ein eukaryotischer Parasit mit stark degradiertem Genom, und das Archaebakterium *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. Desweiteren gibt es nah verwandte Organismen mit unterschiedlicher Anzahl von Rhomboid-ähnlichen Proteinen: beispielsweise fehlt ein solches

Protein in *Thermoplasma volcanium*, in *Thermoplasma acidophilum* hingegen ist eines vorhanden. Dies wurde mit einem Genverlust in manchen Linien erklärt (Koonin *et al.*, 2003). Die Rhomboid-ähnlichen Proteasen haben kaum Ähnlichkeit mit den katalytisch verwandten Serinproteasen. Nicht nur die Unterschiede in der Struktur, also den Transmembrandomänen, und der schlechten Wasserlöslichkeit, sondern auch die katalytisch aktiven Aminosäuren (siehe 1.3.3) zeigen, dass die Rhomboid-ähnlichen Proteasen höchstwahrscheinlich nicht von den Serinproteasen abstammen. Vielmehr wird vermutet (Koonin *et al.*, 2003), dass diese Proteinfamilie nichtenzymatische Transmembranproteine als ultimative Vorläufer gemeinsam hat. Als ein solcher wird ein bakterieller Transporter eines primitiven Exportsystems von Peptiden als Signalmoleküle diskutiert. Die Umwandlung zur proteolytischen Aktivität geschah vemutlich durch Zufallsmutation innerhalb von zwei oder drei Transmembranhelices (Koonin *et al.*, 2003).
Über die spätere Verbreitung der Rhomboid-ähnlichen Proteasen findet man in der Literatur gegensätzliche Meinungen. Doolittle (1998) und Koonin *et al.* (2002, 2003) vermuten mehrfachen horizontalen Gentransfer. Die Gruppe um M. Lemberg hingegen ist der Meinung, dass die Rhomboid-ähnlichen Proteasen nur durch vertikale Evolution verbreitet wurden (Lemberg & Freeman, 2007).
Phylogenetisch wird die Subfamilie der Rhomboid-ähnlichen Proteasen in die Gruppe der Sekretasen und in die des PARL-Typs unterteilt. Die Sekretasen können weiterhin untergliedert werden. Die Vertreter der verschiedenen Sekretase-Untergruppen sind phylogenetisch nicht klar einzuordnen. Die Sekretasen sind ausschließlich am sekretorischen Stoffwechsel beteiligt. Die Proteasen des PARL-Typs hingegen sind mitochondrial verankert (Lemberg & Freeman, 2007).

1.3.2 Kernstruktur der Rhomboid-ähnlichen Proteasen

Bei den Rhomboid-ähnlichen Proteasen handelt es sich um Proteine mit mehreren Transmembrandomänen, welche die Aufklärung der Struktur mit Röntgenkristallografie erschweren. Trotzdem konnten gleich drei Arbeitsgruppen die Struktur einer Rhomboid-ähnlichen Protease, GlpG aus *Escherichia coli*, unabhängig voneinander aufklären (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Ben-Shem *et al.*, 2007). Im gleichen Jahr gelang ebenso die strukturelle Aufklärung der GlpG aus *Haemophilus influenzae* (Lemieux *et al.*, 2007). Aus diesen Strukturen und vielzähligen Sequenzvergleichen kann man die allgemeine Kernstruktur aller aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen ableiten (Abb. 1).
Der Kern der Rhomboid-ähnlichen Proteasen besteht aus sechs Transmembranhelices, die den stärksten Konservierungsgrad dieser Proteinklasse aufweisen (siehe Aminosäurevergleich im Anhang Z.4.2). Die Bereiche zwischen den Transmembrandomänen, im Folgenden mit dem englischen Begriff *Loop* bezeichnet, stellen sehr variable Regionen der Proteine dar und

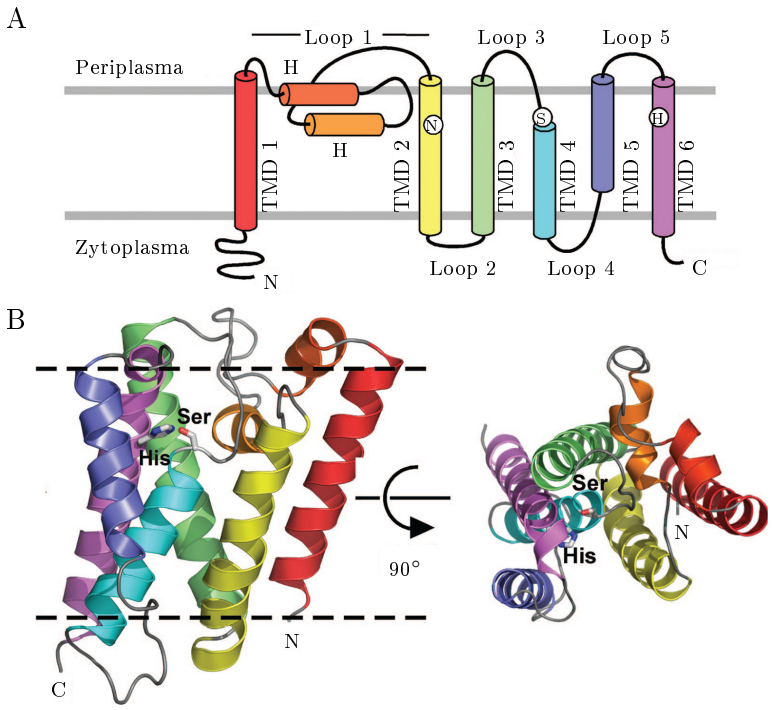


Abbildung 1: Kernstruktur Rhomboid-ähnlicher Proteasen dargestellt am Beispiel von GlpG aus *Escherichia coli*

Der N- und der C-Terminus liegen auf der zytosolischen Seite der Membran. Von den sechs Transmembrandomänen durchspannen vier die Membran vollständig. Die Transmembranhelix 4 (TMD 4) liegt näher zum Zytosol, während Helix 5 nahe an der Seite des Periplasmas lokalisiert wurde. Die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin sind in Transmembrandomänen (TMD4 und TMD6) platziert. Sie liegen etwas unterhalb der periplasmatischen Oberfläche der Membran eng beieinander.
Die Abbildung ist abgewandelt nach Ben-Shem *et al.* (2007): A - schematische Darstellung der GlpG; B - Struktur der GlpG als Richardson-Diagramm in zwei Ebenen
Die Farben stimmen in A und B überein. H - Helix

geben somit die Möglichkeit zur Erkennung verschiedener Substrate und zur Ausführung unterschiedlicher Funktionen. Die Transmembrandomänen weisen immer die gleiche Orientierung in der Membran auf. Innerhalb der zweiten, vierten und sechsten Transmembranhelix sitzen drei sehr stark konservierte Aminosäuren, Asparagin (N), Serin (S) und Histidin (H), die für die katalytische Funktion als essentiell postuliert wurden (Urban *et al.*, 2001, 2002a). Sie sitzen sehr eng zusammen knapp unterhalb der Membranoberfläche (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Ben-Shem *et al.*, 2007; Lemieux *et al.*, 2007).

1.3.3 Hydrolyse in hydrophober Umgebung - der Reaktionsmechanismus

Trotz der geringen Ähnlichkeit von Rhomboid-ähnlichen Proteasen zu zytolsolischen Serinproteasen (Bier *et al.*, 1990) ging man lange davon aus, der Mechanismus sei dem der zytosolischen Serinproteasen verwandt. Serinproteasen nutzen zwei Aminosäuren, ein Aspartat und

ein Histidin, um ein Serin zu deprotonieren. Dieses greift dann die Peptidbindung nukleophil an (Abb. 2). Für die Rhomboid-ähnlichen Proteasen stützte man sich zunächst auf die These einer katalytischen Triade bestehend aus Serin, Histidin und Asparagin (Urban *et al.*, 2001).

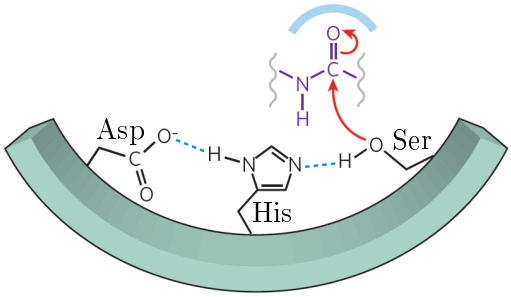


Abbildung 2: Reaktionsmechanismus der zytosolischen Spaltung von Peptidbindungen durch Serinproteasen (Erez *et al.*, 2009)

Wasserlösliche Serinproteasen nutzen eine katalytische Triade im aktiven Zentrum. Diese besteht aus den drei Aminosäuren Histidin, Serin und Aspartat, die eine wichtige Aufgabe im Reaktionsmechanismus erfüllen. Das Aspartat hilft durch die Deprotonierung des Histidins diesem, das Proton von Serin zu übernehmen. Das deprotonierte Serin ist dann in der Lage, den Carbonyl-Kohlenstoff der Peptidbindung des Substrates nukleophil anzugreifen. Zusätzlich formt das Peptidrückgrat der Protease eine Oxyanionen-Lücke, die für eine Stabilisierung des tetraedrischen Übergangszustandes sorgt.

Lemberg *et al.* (2005) und Maegawa *et al.* (2005) zeigten, dass die Annahme einer katalytischen Triade falsch war. Stattdessen beruht der Mechanismus in Rhomboid-ähnlichen Proteasen auf einer katalytischen Dyade (Serin und Histidin). Das Asparagin wird trotz des hohen Konservierungsgrades (in ausnahmslos allen aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen vorhanden) für die Katalyse nicht benötigt (Lemberg *et al.*, 2005; Maegawa *et al.*, 2005).
Der vielleicht größte Unterschied der Rhomboid-ähnlichen Proteasen zu zytosolischen Serinproteasen besteht in der chemischen Beschaffenheit des Milieus des Enzyms. Im Zytosol kann Wasser sehr leicht an das aktive Zentrum gelangen. Das Substrat der Rhomboid-ähnlichen Proteasen hingegen durchspannt ebenfalls die Membran und wird in oder direkt an der Oberfläche der Membran, also in einer eher hydrophoben Region, prozessiert. Es ist dort schwieriger, das richtige Milieu für eine Hydrolyse zu schaffen.
Rhomboid-ähnliche Proteasen haben einen eleganten Ausweg aus dieser Misere gefunden. In der Struktur von GlpG (Abb. 1B) duchspannt die vierte Transmembrandomäne die Membran nicht vollständig. Am Anfang dieser Transmembranhelix befindet sich zudem die katalytische Aminosäure Serin ca. 10 Ångström unterhalb der Membranoberfläche. Die anderen fünf Transmembrandomänen schirmen das hydrophile Serin gegen das hydrophobe Milieu der Membran ringförmig ab. Dadurch entsteht eine Mulde in der Oberfläche der Membran, die zur offenen Seite einen Zugang zum wässrigen Zytosol bietet. Das Histidin in der

sechsten Transmembrandomäne ist so im aktiven Zentrum platziert, dass es als generelle Base dienen kann (Wang *et al.*, 2006). Wie bei den zytosolischen Serinproteasen wird der tetraedrische Übergangszustand des Substrates durch das Peptidrückgrat der Protease stabilisiert (Oxyanionen-Lücke, (Wu *et al.*, 2006; Ben-Shem *et al.* 2007; Wang & Ha, 2007)).

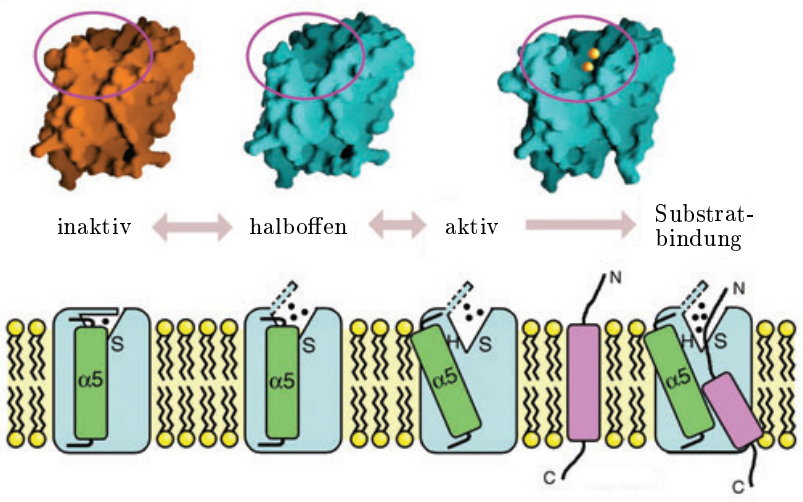


Abbildung 3: Darstellung des möglichen Deckelmechanismus und der Substratbindung (Wu *et al.*, 2006)

Wu *et al.* (2006) identifizierten mehrere Konformationen der GlpG aus *E. coli*. Im oberen Teil des Bildes sind die Oberflächen der Stadien (inaktiv, halboffen und aktiv) dargestellt. Rot symbolisiert die möglicherweise inaktive Form. Im mittleren Modell ist die Konformation des ersten *Loop* verändert (halboffen). Vermutlich hat das aktive Zentrum somit Zugang zum wässrigen Zytosol. Wassermoleküle sind im oberen Teil gelb und im unteren Teil als schwarze Punkte verdeutlicht. Durch eine leichte Drehung der fünften Transmembranhelix ($\alpha 5$) ist vermutlich die Bindungstasche für das Substrat (pink) offen und die Proteolyse kann stattfinden.

Bisher existiert noch keine Struktur einer Rhomboid-ähnlichen Protease im Komplex mit seinem Substrat. Daher ist der Weg des Substrates in die Protease noch unklar. Es werden zwei Möglichkeiten diskutiert: die Transmembrandomäne des Substrates gelangt

1. zwischen der ersten und der dritten Transmembrandomäne der Protease (Wang *et al.*, 2006; Lemieux *et al.*, 2007) oder

2. zwischen Transmembranhelix zwei und fünf ans aktive Zentrum (Baker *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Ben-Shem *et al.*, 2007; Wang & Ha, 2007)

Ben-Shem *et al.* (2007) konnten verschiedene Strukturen von GlpG identifizieren, welche die zweite These plausibel erscheinen lassen. Sie postulieren zusätzlich eine Art Deckelmechanismus, der von *Loop*1 (zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne) ausgeführt werden soll (Abb. 3). Wurde das Substrat erstmal gebunden, muss eine partielle Denaturierung vonstatten gehen, damit die Peptidbindung zur Hydrolyse freigelegt wird. Der genaue

Vorgang ist allerdings noch unbekannt.

1.3.4 Substrate

Im Gegensatz zu den Rhomboid-ähnlichen Proteasen gibt es bisher kein allgemein gültiges Motiv für die Beschaffenheit der Substrate. Deshalb gestaltet es sich schwierig, durch Sequenzvergleiche mit bekannten Substraten andere mögliche Substrate zu identifizieren.
Einige Eigenschaften sind trotzdem allen bisher bekannten Substraten von Rhomboid-ähnlichen Proteasen gemeinsam. Zum einen können nur Proteine mit mindestens einer Transmembrandomäne als Substrat fungieren. Jedoch bleiben die meisten Proteine mit Transmembrandomänen unprozessiert, das heißt, es muss irgendeinen Faktor oder ein Merkmal geben, was ein Substrat Rhomboid-ähnlicher Proteasen von anderen Transmembranproteinen unterscheidet. Urban & Freeman (2003) zeigten, dass nur das erste Drittel der Transmembrandomäne darüber entscheidet, ob es von der jeweiligen Protease prozessiert wird. Bei den bekannten Substraten von Rhomboid-ähnlichen Proteasen konnte festgestellt werden, dass in der Nähe der Prozessierungsstelle oft Helix-destabilisierende Aminosäuren zu finden sind. Manchmal sind diese in C-terminaler Richtung gepaart mit hydrophoben Aminosäuren. Bei Spitz, einem Substrat der Rhomboid-ähnlichen Proteasen in *Drosophila melanogaster*, wurde das Sequenzmotiv -ASIAGA- als essentiell für die Proteolyse identifiziert. Hierbei scheinen die letzten beiden Aminosäuren am wichtigsten zu sein. Man nimmt an, dass dieses Motiv das Schlüsselmerkmal der Substrate und eventuell sogar die Basis für die Spezifität der Prozessierungsstelle ist (Urban & Freeman, 2003; Maegawa *et al.*, 2005, Akiyama *et al.*, 2007). Erstaunlicherweise wird Spitz aus *D. melanogaster* als Substrat von einer Vielzahl von Rhomboid-ähnlichen Proteasen aus Bakterien, wirbellosen Tieren und Wirbeltieren akzeptiert (Urban & Freeman, 2003; Urban & Wolfe 2005). Dies impliziert, dass trotz der Unterschiede in der Sequenz und des evolutionären Abstandes die Rhomboid-ähnlichen Proteasen ähnliche enzymatische Merkmale nicht nur hinsichtlich des Reaktionsmechanismus teilen.

1.3.5 Regulation der Aktivität Rhomboid-ähnlicher Proteasen

Proteasen katalysieren die irreversible Spaltung von Proteinen. Sie stellen somit eine Enzymklasse dar, die einer starken Regulation unterliegen muss. Beispielsweise liegen viele lösliche Proteasen wie Chymotrypsin inaktiv vor, bis sie selbst durch einen Proteolyseschritt aktiviert werden (Rovery, 1988). Über die Regulation von Rhomboid-ähnlichen Proteasen ist allerdings wenig bekannt. Bei Rhomboid1 aus *D. melanogaster*, der am besten untersuchten Rhomboid-ähnlichen Protease, wurden noch keine Hinweise auf eine Regulation der Enzymaktivität gefunden. Das heißt, wo das Enzym ist, dort ist es auch aktiv. Man tendiert jedoch eher zu der Annahme, dass sich verschiedene Kontrollmechanismen entwickelt haben, die sich von denen der klassischen Proteasen unterscheiden.

Hinweise auf eine direkte Regulation der Aktivität von Rhomboid-ähnlichen Proteasen selbst wurden bisher nur bei der PARL aus Säugern gefunden. Bei dieser Protease unterscheidet sich der N-Terminus strukturell von dem anderer Proteasen des PARL-Typs. Er enthält eine Pβ-Domäne (etwa 100 Aminosäuren), die spezifisch für Wirbeltiere und in Säugern hoch konserviert ist. In wirbellosen Tieren und Insekten wurde die Pβ-Domäne noch nicht gefunden. Die Aktivität der PARL wird durch Dephosphorylierung und anschließende Prozessierung der Pβ-Domäne irreversibel verstärkt (Sík *et al.*, 2004). Genauer wird diese Form der Regulierung in Abschnitt 1.3.6 beschrieben, da der Mechanismus eine weitere Bedeutung in der Zelle hat. Aus dieser Form der Regulierung lässt sich schlussfolgern, dass die variablen Regionen (N- und C-Termini sowie die *Loops*) möglicherweise Regulationsmodule für posttranslationale Modifikationen und Ligandenbindungen enthalten. Zusätzlich entdeckten (Urban & Wolfe, 2005), dass die Zusammensetzung der Membranlipide einen Einfluss auf die Aktivität der Rhomboid-ähnlichen Proteasen haben kann.
Die Intramembranproteolyse muss nicht nur durch die Aktivität der Protease reguliert werden. Die Regulation kann auch auf der Ebene des Substrates stattfinden. Ein weitverbreiteter Mechanismus liegt in der räumlichen Trennung von Enzym und Prozessierungsstelle. Hierbei muss man die Kompartimentierung von der alternativen Topogenese unterscheiden.
Die Kompartimentierung wurde erstmals bei *Drosophila* entdeckt. Das Substrat Spitz sitzt in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums, wohingegen die Protease Rhomboid1 in der Membran des Golgi-Apparates verankert ist. Nur das Membranprotein Star ist für das Zusammenkommen der beiden Komponenten verantwortlich. Star bindet Spitz. Diesem Komplex ist es möglich, über Vesikel zum Golgi-Apparat zu gelangen. Dort kann Rhomboid1 Spitz prozessieren (Lee *et al.*, 2001; Pascall *et al.*, 2002; Tsruya *et al.*, 2002). In manchen menschlichen Parasiten, den Apicomplexa, wird ebenfalls Kompartimentierung als Kontrollmechanismus genutzt. Der Unterschied zu *D. melanogaster* liegt darin, dass in den Apicomplexa mehrere Rhomboid-ähnliche Proteasen räumlich voneinander getrennt werden und so nur das spezifische Substrat, das der Protease durch Vesikeltransport zugeführt wird, prozessieren (Singh *et al.*, 2007; Sheiner *et al.*, 2008).
Die zweite Möglichkeit der Regulierung durch das Substrat, die alternative Topogenese, wurde bisher nur bei der mitochondrialen Intramembranproteolyse gefunden. Es handelt sich um einen Mechanismus, der die Prozessierungsstelle erst bei Bedarf an bzw. in die Membran zieht, damit sie der Protease zugänglich ist. Beispiele sind die Substrate *Sc*MGM1p (Abb. 4) und *Sc*CCP1p der mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Protease PCP1p aus *Saccharomyces cerevisiae*. *Sc*MGM1p wird von einem ATP-gesteuerten Motorkomplex bei hohen ATP-Konzentrationen weiter in die mitochondriale Matrix gezogen, wodurch die zweite Transmembrandomäne mit der Prozessierungsstelle in der Membran gelangt (Herlan *et al.*, 2004). Bei *Sc*CCP1p ist eine erste Prozessierung durch eine mAAA-ATPase notwendig, damit die Proteolyse durch *Sc*PCP1p stattfinden kann (Esser *et al.*, 2002).

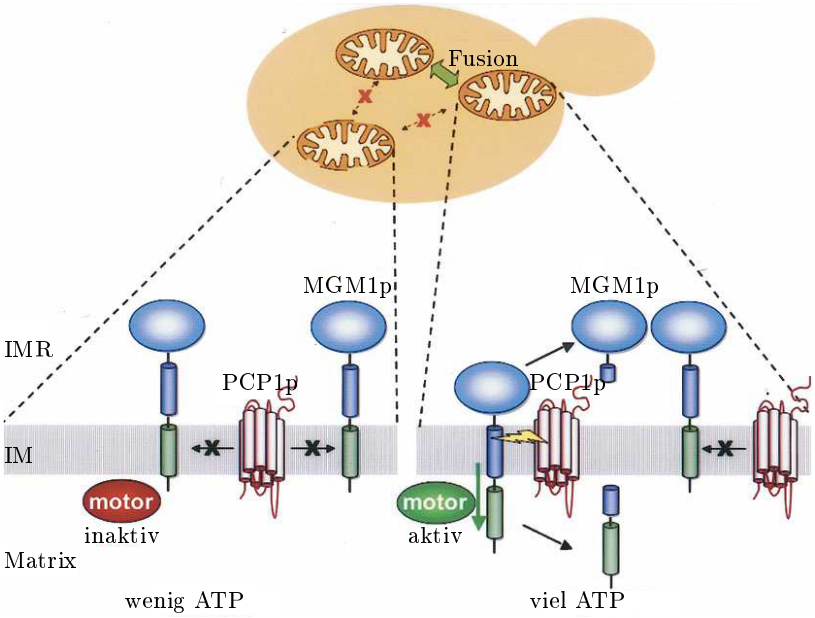


Abbildung 4: Die alternative Topogenese am Beispiel der *Sc*PCP1p (Urban (2006))

Ein Teil der Dynamin-ähnlichen GTPase MGM1p wird bei hohen ATP-Gehalt der Mitochondrien durch einen ATP-gesteuerten Motor so in Richtung Matrix gezogen, dass die zweite Membrandomäne der Rhomboid-ähnlichen Protease PCP1p ausgesetzt ist. Diese Domäne sitzt sonst nicht in der Membran, wodurch die Prozessierungsstelle von der Protease fern gehalten wird. PCP1p ist nach dieser Verschiebung des Proteins in der Lage, MGM1p zu prozessieren. Es ensteht eine lösliche verkürzte Version, die mit der unprozessierten Form interagiert. Ist der ATP-Gehalt zu niedrig, wird MGM1p nicht prozessiert und kann keine Interaktion eingehen.
IM - innere Membran, IMR - Intermembranraum

In Bakterien wurde bisher noch keine Strategie zur Regulation der Intramembranproteolyse identifiziert. Allerdings ist die Anzahl an Membranen limitiert, wodurch die Kompartimentierung höchstwahrscheinlich nicht genutzt wird. Da nach der Endosymbiontenhypothese die Mitochondrien bakteriellen Ursprungs sind und in Mitochondrien die alternative Topogenese zur Regulation genutzt wird, ist ein solcher Regulationsschritt auch in Bakterien wahrscheinlich. Trotzdem sind noch viele Rhomboid-ähnliche Proteasen unvollständig oder gar nicht charakterisiert.

1.3.6 Funktionelle Diversität von Rhomboid-ähnlichen Proteasen

Einige der prokaryotischen Rhomboid-ähnlichen Proteasen enthalten neben der Kernstruktur eine weitere C-terminale Transmembrandomäne. Dagegen sind verlängerte N-Termini selten. Die meisten prokaryotischen Proteasen dieser Klasse sind nicht weiter charakterisiert worden. Eine Ausnahme bildet AarA aus *Providencia stuartii*, die einen Signaltransporter aktiviert.
Die meisten eukaryotischen Rhomboid-ähnlichen Proteasen weisen zusätzlich zur Kernstruk-

tur eine siebente Transmembrandomäne auf. Diese kann entweder N-terminal dem Kern vorweggehen, wie das bei den mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Proteasen in Tieren und Pilzen der Fall ist, oder sie schließt sich C-terminal an den Kern an, z.B. bei den Sekretasen (Koonin *et al.*, 2003). Die pflanzlichen PARL-Typ-Proteasen bestehen lediglich aus der Kernstruktur. Zusätzlich wurden auch in den Plastiden Rhomboid-ähnliche Proteasen gefunden. In *Arabidopsis* sind sie wahrscheinlich an der Prozessierung von Tic40, einer Komponente des plastidären Translokons, beteiligt (Karakasis *et al.*, 2007). Die Sekretasen enthalten zusätzlich zu ihrer siebenten Transmembrandomäne am C-Terminus manchmal weitere Domänen am N-Terminus wie eine EF-Hand oder Kalzium-bindende Domänen (Koonin *et al.*, 2003). Erstaunlicherweise ergaben Datenbankauswertungen in Pflanzen eine größere Zahl Rhomboid-ähnlicher Proteasen als in tierischen Organismen (in *Arabidopsis* 14, in Reis 13; im Menschen 6 und in *Drosophila* 7). Dies kann nicht nur auf das Vorhandensein der Plastiden zurückgeführt werden (Lemberg & Freeman, 2007).
Viele Rhomboid-ähnliche Proteasen sind bisher funktionell noch nicht charakterisiert worden. Dennoch sind diese Enzyme bereits an sehr verschiedenen Prozessen beteiligt. Einige prominente Beispiele werden im Folgenden erläutert.

Quorum Sensing bei *Providencia stuartii*

P. stuartii ist ein gram-negative Bakterium und befällt unter anderem den menschlichen Körper und ist zum Teil für Harnwegsinfektionen verantwortlich (Zink, 1990).
Die Rhomboid-ähnliche Protease AarA spielt in *Providencia* beim *Quorum Sensing* eine Rolle in der Signalemission. Das Signal ist noch nicht bekannt, aber es wird über eine Translokationspore nach außen abgegeben. AarA ist eine aktive Rhomboid-ähnliche Protease, die auch in der Lage ist, Spitz aus *D. melanogaster*, das Substrat von Rhomboid1, zu prozessieren (Gallio *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2002a). Ihr genuines Substrat TatA ist jedoch von Spitz verschieden. TatA ist die große Untereinheit der twin-Arginin-Proteintranslokase des Tat-Weges. Dieser Weg ermöglicht den Export vollständig gefalteter und modifizierter Proteine ins Periplasma (Lee *et al.*, 2006). In *P. stuartii* besitzt TatA im Vergleich zu anderen Bakterien eine N-terminale Verlängerung. Diese dehnt die Transmembrandomäne, wodurch das Protein inaktiviert wird. AarA trennt den N-Terminus vom Rest des TatA (Stevenson *et al.*, 2007). Das aktivierte TatA bildet nun als Multimer die Translokationspore (Gohlke *et al.*, 2005).

Die Rolle der Intramembranproteolyse in der Entwicklung von *Drosophila*

Bei der Analyse einer Mutante von *D. melanogaster* mit abnormal geformten Kopfskelett wurde Rhomboid1 als erste Protease dieser Klasse identifiziert (Mayer & Nüsslein-Volhard, 1988). Später erkannte man, dass Rhomboid1 als Teil des Signalweges des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) die Entwicklung von Geweben beeinflusst (Sturtevant *et al.*, 1993; Freeman, 1994). EGF wird von einer Rezeptor-Tyrosinkinase (EGF-Rezeptor) erkannt, die das Signal in den Zellkern der signalempfangenden Zelle weitergibt (Shilo, 2003). Dieser Signalweg ist in die Entwicklung von nahezu jedem Gewebe in *D. melanogaster* involviert. Er reguliert sogar den Schlaf der Fruchtfliege (Urban *et al.*, 2002b, Foltenyi *et al.*, 2007).
Die Rhomboid-ähnlichen Protease 1 ist in der signalsendenden Zelle notwendig (Bang & Kintner, 2000; Wasserman *et al.*, 2000). Sie ist für die Prozessierung der membrangebundenen Präform des EGF, genannt Spitz, verantwortlich und generiert so den biologisch aktiven Wachstumsfaktor, das EGF-Signal (Guichard *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2001; Urban *et al.*, 2001). Der Mechanismus wird nicht über die Expression vom EGF-Rezeptor oder von Spitz (Price *et al.*, 1989; Schejter & Shilo, 1989; Rutledge *et al.*, 1992), sondern durch die unterschiedliche Lokalisierung der Komponenten reguliert (Vgl. 1.3.5). Dabei ist entscheidend, dass das Substrat Spitz im Komplex mit Star erst vom Endoplasmatischen Retikulum zur Membran des Golgi-Apparates transportiert wird, damit es anschließend von der im Golgi-Apparat lokalisierten Protease Rhomboid1 prozessiert wird (Lee *et al.*, 2001; Pascall *et al.*, 2002; Tsruya *et al.*, 2002; Urban *et al.*, 2002b).
Der Signalweg des EGF-Rezeptors wurde 2004 auch in *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Dutt *et al.*, 2004). Womöglich ist der Regulationsmechanismus in der Entwicklung von *C. elegans* ähnlich dem der Fruchtfliege.

Invasionsmechanismus in Apicomplexa Zum Stamm der Apicomplexa (Sporentierchen) gehören unter anderem die menschlichen Parasiten *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum*. Beides sind eukaryotische Einzeller mit komplexen Lebenszyklen. Sie gehören zu den obligat intrazellulär-lebenden Parasiten (Sibley, 2004). Die zelluläre Struktur der Sporentierchen enthält zusätzliche Organellen mit für Apicomplexa spezifischen Funktionen. Ein Beispiel hierfür sind die Mikroneme. Das sind kleine regulierte sekretorische Vesikel, die polar an der Spitze der Zelle verteilt sind. Die Funktion der Mikroneme besteht in der zeitlich abgestimmten Abgabe eines hochkonzentrierten Gemisches von Adhesinproteinen (Tomley & Soldati, 2001). Die Adhesine spielen eine Schlüsselrolle bei der Invasion der Wirtszelle. Sie bilden Komplexe mit Rezeptorproteinen in der Wirtsmembran, die Voraussetzung für eine endozytotische Aufnahme des Parasiten sind. Der enzymatische Abbau des Sporentierchens wird durch Auflösung des Adhesinkomplexes unterbunden (Sibley, 2004).
Es wird vermutet, dass die für die Invasion notwendigen Adhesine von einer Rhomboid-ähnlichen Protease prozessiert werden. Hinweise dafür liegen zum einen in der Notwendigkeit

der Prozessierung der Adhesine, wodurch der Verschluss der Wirtsmembran ermöglicht wird (Sibley, 2004). Zum anderen wurde gezeigt, dass einige Transmembranproteine in den Mikronemen aus *T. gondii* als Substrate von den Rhomboid-ähnlichen Proteasen Rhomboid1 aus *D. melanogaster* und RHBDL2 aus *Homo sapiens* akzeptiert und prozessiert werden. Zu diesen Proteinen gehören MIC2, MIC6 und *Tg*AMA1 (Opitz *et al.*, 2002; Urban & Freeman, 2003; Zhou *et al.*, 2004; Howell *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2006). Die Prozessierungsstelle (IA↓GG) ist in diesen Proteinen scheinbar konserviert (Opitz *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004). Sie ähnelt der des gut untersuchten Substrates Spitz aus *D. melanogaster* (Urban & Freeman, 2003).
Für *Tg*ROM5 wird eine Rolle beim Invasionsmechanismus vermutet (Brossier *et al.*, 2005; Dowse & Soldati, 2005). Weiterhin ist von *Pf*ROM4 bekannt, dass diese Protease einige Adhesine prozessiert, die von anderen bekannten Rhomboid-ähnlichen Proteasen kaum oder gar nicht gespalten werden (Baker *et al.*, 2006; O'Donnell *et al.*, 2006). Durch Deletion von Tg*ROM4* zeigten (Buguliskis *et al.*, 2010), dass *Tg*ROM4 für den Grad an prozessierten Adhesinproteinen auf der Zelloberfläche und somit für eine effiziente Wirtsinvasion notwendig ist.

Regulation der mitochondrialen Morphologie und Entwicklung

In fast jedem Eukaryot ist nach bisherigem Kenntnisstand, eine mitochondrial lokalisierte Rhomboid-ähnliche Protease kodiert (Koonin *et al.*, 2003). Eine Ausnahme bildet *Cryptosporidium parvum* vom Stamm der Apicomplexa. In diesem einzelligen Eukaryoten fehlt jegliche mitochondriale Rhomboid-ähnliche Protease. Die Mitochondrien dieser Spezies ähneln nur noch Relikten mit anormaler Morphologie. Sie können keine metabolische Funktion wie den Krebszyklus oder die oxidative Phosphorylierung mehr ausführen (Dowse & Soldati, 2005). Demnach erfüllen die Rhomboid-ähnlichen Proteasen in den Mitochondrien wichtige definierte Prozesse, die jedoch nicht essentiell für das Überleben sind.
Von den mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Proteasen ist PCP1p aus *S. cerevisiae* am besten untersucht. PCP1p ist in der Lage, zwei Transmembranproteine der Hefe als Substrate zu prozessieren. Die Funktion des einen Substrates, der Cytochrom-C-Peroxidase 1 (CCP1p), ist unbekannt. Der Verlust dieses Proteins führt lediglich zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Peroxiden (Esser *et al.*, 2002).
Über das zweite Substrat der PCP1p ist mehr bekannt. Es ist eine der drei mitochondrialen Dynamin-ähnlichen GTPasen der Hefe, MGM1p. Es reguliert spezifisch die mitochondriale Membranfusion (Shephard & Yaffe, 1999; Wong *et al.*, 2003). Wird MGM1p in der Bäckerhefe deletiert, erhält man Zellen mit stark fragmentierten Mitochondrien, die zu keiner Fusion mehr fähig sind (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003). Nach Prozessierung von MGM1p wird die lösliche GTPase-Domäne in den Intermembranraum abgegeben. Sowohl das unprozessierte Protein als auch das lösliche Prozessierungsprodukt

werden für eine effiziente Fusion der Mitochondrien benötigt (Sesaki *et al.*, 2003). Reguliert wird der Mechanismus durch alternative Topogenese (Vgl. 1.3.5). Die Fusion der Mitochondrien ist abhängig vom ATP-Gehalt und selektiert die intakten von defekten Mitochondrien. Diese Art der Selektion intakter Mitochondrien könnte auch in den Apicomplexa vorkommen. Im Genom von *P. falciparum* wurden zwei *Sc*MGM1p-Homologe, jedoch kein *Sc*CCP1p-Homologes gefunden. Dies lässt vermuten, dass die Rhomboid-ähnliche Protease ROM6 in den Apicomplexa lediglich ein Substrat prozessiert (Dowse & Soldati; 2005).
In Säugern wurde ebenfalls ein *Sc*MGM1p-Homolges gefunden, das OPA1 genannt wird. OPA1 ist das Substrat der mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Protease PARL (McQuibban *et al.*, 2003) und reguliert wie ScMGM1p die mitochondriale Fusion (Cipolat *et al.*, 2004). OPA1 erfüllt eine weitere Funktion, indem es in der inneren Membran der Mitochondrien zu einem Heteromer bestehend aus unprozessiertem OPA1 und prozessiertem OPA1 oligomerisiert. Durch diesen Komplex werden die Cristae, die Einstülpungen der inneren mitochondrialen Membran, geformt und gefestigt (Hinshaw & Schmid, 1995; Frezza *et al.*, 2006). Um diese beiden Funktionen koordinieren zu können, benötigt OPA1 für die mitochondriale Fusion ein weiteres Protein, Mfn1 (Abb. 5). Dieses ist aber nicht in die Strukturgebung der Cristae involviert (Cipolat *et al.*, 2004).
Einen Hinweis für die Konservierung dieses Mechanismus gibt der Befund, dass das menschliche Substrat der PARL, OPA1, als Substrat von der mitochodrialen Rhomboid-ähnlichen Protease aus *D. melanogaster*, Rhomboid7, gebunden und prozessiert wird (McQuibban *et al.*, 2006).

Die besondere Rolle der Rhomboid-ähnlichen Protease PARL aus Säugern

Im Anfangsstadium der Apoptose einer Zelle (regulierter Zelltod) sind Veränderungen in der Struktur der Mitochondrien zu vermerken. Die Cristae der inneren Membran weiten sich und fusionieren. Daraufhin lockert sich das membrangebundene Cytochrom *C* und wandert in den Intermembranraum sowie später ins Zytosol (Scorrano *et al.*, 2002). Da die PARL und ihr Substrat OPA1 für die Bildung und Festigkeit der Cristae notwendig sind, regulieren sie dadurch unter anderem auch die Konzentration von Cytochrom *C* im Intermembranraum und damit die Apoptose (Frezza *et al.*, 2006). Bei Verlust von OPA1 sind die Mitochondrien zu keiner Funktion mehr fähig und der Cytochrom-*C*-Gehalt in der Zelle steigt (Olichon *et al.*, 2003).
Beim Menschen verursacht eine nicht funktionale Mutation von OPA1 die dominant vererbte optische Atrophie, die häufigste Form von erblicher Blindheit (Alexander *et al.*, 2000). Daher rührt auch der Name des Proteins (*optic atrophy* 1).
Die PARL muss eine weitere Funktion erfüllen, denn der Verlust der PARL in Mäusen führt zu einem sehr frühen Tod an multisystemischer Atrophie. Die Deletion hat einen starken Einfluss auf das postnatale Wachstum und die Lebensspanne (Cipolat *et al.*, 2006).

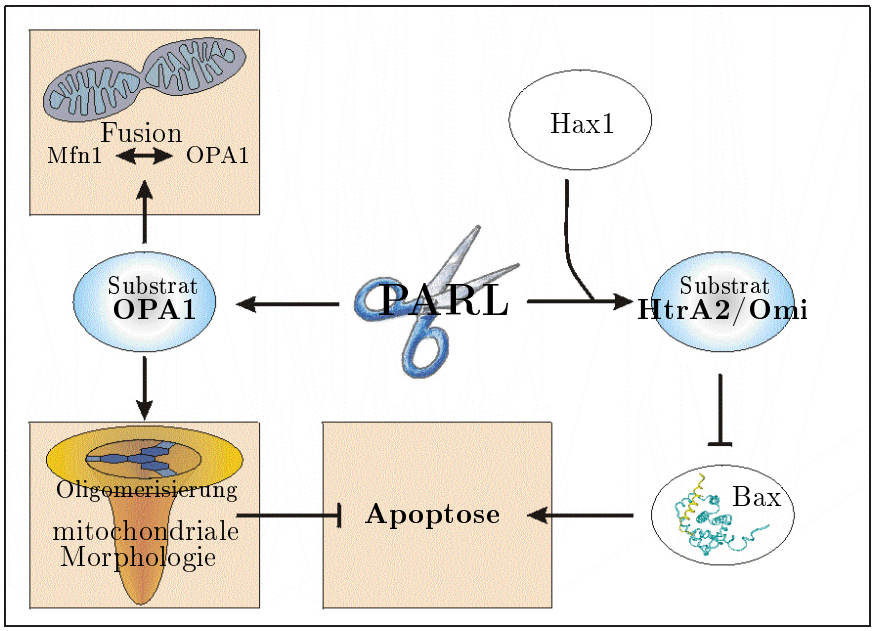


Abbildung 5: Die Rolle der PARL aus Säugern in der Regulation der Apoptose

Die Protease PARL ist in der Lage, zwei Substrate zu prozessieren, HtrA2/Omi und OPA1. OPA1 ist in die mitochondriale Fusion involviert. Dieser Vorgang ist funktional abhängig von Mfn1. Die zweite Funktion von OPA1 liegt in der Oligomerisierung mit seiner unprozessierten Form. Dadurch werden die Cristae gefestigt und der Gehalt an Cytochrom *C* im Intermembranraum bleibt niedrig. Steigt die Konzentration des Cytochrom *C*, wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Die Spaltung des zweiten Substrates der PARL, des HtrA2 (Omi) ist abhängig von der Präsenz von Hax1. Die prozessierte Form des HtrA2 ist eine aktive Protease und baut sein Substrat Bax ab, welches die Cytochrom-*C*-Konzentration im Intermembranraum erhöht und somit wie OPA1 an der Apoptose beteiligt ist.

Dieser Phänotyp unterscheidet sich drastisch von dem bei Verlust von OPA1. Man zog die Schlussfolgerung, dass PARL noch ein zweites Substrat prozessiert. Tatsächlich fanden Chao *et al.* (2008) heraus, dass die Freisetzung von HtrA2, auch bekannt als Omi, in den Intermembranraum von PARL abhängig ist. Die Spaltung benötigt zusätzlich die Anwesenheit von Hax1 (Chao *et al.*, 2008). HtrA2 ist selbst eine Protease und für die Regulation der Apoptose in den Lymphozyten verantwortlich (Abb. 5). Es spaltet das Protein Bax, welches bei Akkumulation die Apoptose initiiert, indem es die Cytochrom-*C*-Konzentration im Intermembranraum der Mitochondrien erhöht (Wei *et al.*, 2001). Die Prozessierungsstelle von HtrA2 liegt außerhalb der Transmembrandomäne, weshalb die Möglichkeit einer Regulation durch alternative Topogenese in Betracht gezogen wird (Martin *et al.*, 2002).
Interessant ist der Aspekt, dass die PARL am N-Terminus prozessiert wird. Diese Modifizierung wird durch die PARL selbst reguliert. Nach den ersten 52 Aminosäuren des Proteins wird die Protease beim Import in die Mitochondrien gespalten (α-Prozessierung). Die PARL ist konstitutiv exprimiert und liegt in der inneren Membran der Mitochondrien N-terminal phosphoryliert vor (Sík *et al.*, 2004). Wird die Protease an den drei Aminosäuren Serin-65,

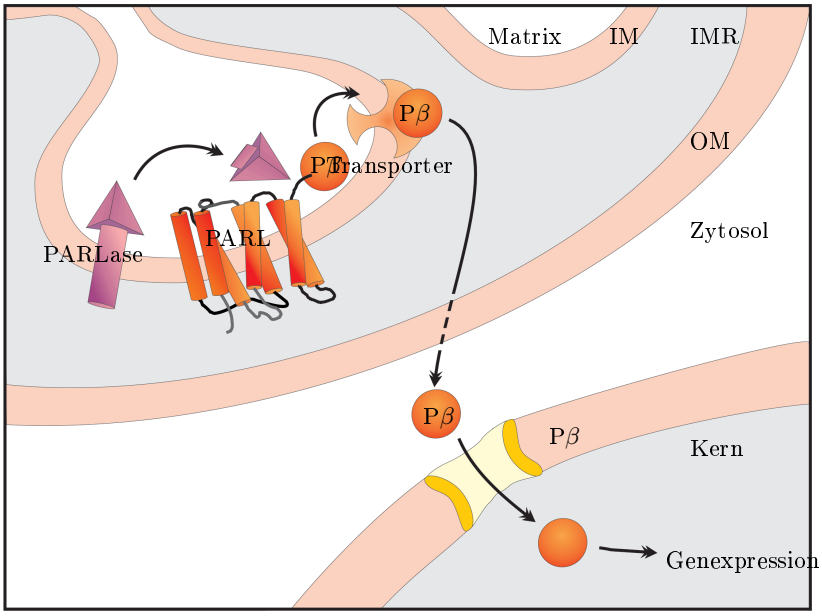


Abbildung 6: Schematische Einbindung der PARL-Prozessierung in das zelluläre Geschehen

Der N-Terminus der Protease PARL wird nach Perzeption eines unbekannten Signals dephosphoryliert. Daraus resultierend erfolgt die Abspaltung eines 25 Aminosäure großen Peptids vom N-Terminus der PARL. Dieses Peptid enthält die Pβ-Domäne. Über einen Transporter gelangt es von der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien. Von dort kann es ins Zytosol diffundieren und anschließend durch Import in den Kern seine Funktion erfüllen, wahrscheinlich die Regulation der Expression spezifischer Gene.
Abbildung nach Sík *et al.* (2004) aktualisiert, IM - innere Membran, IMR - Intermembranraum, OM - äußere Membran, PARLase - unbekannte Protease, Transporter - unbekannter Peptidtransporter)

Threonin-69 und Threonin-70 durch eine noch unbekannte Phosphatase dephosphoryliert (Jeyaraju *et al.*, 2006), kommt es zu einem zweiten Prozessierungsschritt nach Aminosäure 77 (Gakh *et al.*, 2002). Vermutlich wird dadurch eine hydrophobe Helix gebrochen, welche die Aktivität des Enzyms leicht beeinträchtigt. Die β-Prozessierung wird wahrscheinlich von einer mAAA-Protease, PARLase genannt, katalysiert (Abb. 6). Diese Protease wurde noch nicht identifiziert (Sík *et al.*, 2004). Die Prozessierung einer Intramembranprotease an sich ist nicht neu, da Moliaka *et al.* (2004) bei einer Protease des Presenilin-Typs einen Prozessierungsschritt zur proteolytischen Aktivierung entdeckten.
Das Besondere an der PARL ist, dass durch die β-Prozessierung ein 25 Aminosäuren langes Peptid, Pβ, entsteht, welches ein hocheffizientes Kernlokalisierungssignal aufweist. Lokalisierungsstudien bestätigten den Import in den Kern *in vivo* (Sík *et al.*, 2004). Pβ wird in die Matrix der Mitochondrien abgegeben. Wie das Peptid den Weg ins Zytosol und daraufhin in den Kern findet, ist unbekannt. Bekannt ist nur von anderen kleinen Peptiden, dass diese über spezifische Effluxtransporter in Abhängigkeit vom ATP-Gehalt und der Temperatur in den Intermembranraum befördert werden (Jeyaraju *et al.*, 2006). Es gibt für Pβ innerhalb

der Säugetiere kaum eine Sequenzabweichung. Bei Mensch, Maus, Ratte und Schwein gibt es lediglich an drei der 25 Aminosäurepositionen Unterschiede, die die chemische Beschaffenheit des Proteins nicht beeinträchtigen. Bei allen anderen Wirbeltieren ist das Peptid nicht so stark, aber trotzdem hoch konserviert (Sík *et al.*, 2004). Wahrscheinlich hat Pβ eine wichtige spezifische Funktion. Im Kern könnte es mit Proteinen wie Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Expression von Genen variieren. Von anderen kleinen Peptiden ist eine biologische Aktivität in Hormonreaktionen oder Apoptose bekannt. Ein Beispiel hierfür ist Humanin, ein 24 Aminosäuren langes Peptid. Es unterdrückt die Apoptose, indem es mit Bax, dem Apoptose-induzierenden Protein, interagiert (Guo *et al.*, 2003).
Walder *et al.* (2005) konnte weiterhin den Zusammenhang der PARL mit Diabetes in Israelischen Sandratten zeigen. Die Mutation eines Leucins (Leu262) zu Valin erhöhte zusätzlich den Diabetes-Risikofaktor (Walder *et al.*, 2005). Das könnte ein Nebeneffekt der weitläufigen Funktionen der PARL sein, oder die Möglichkeit eines weiteren Regulationsmechanismus, zum ersten Mal des Primärstoffwechsels, könnte die Bandbreite der Funktionen der Rhomboid-ähnlichen Proteasen ergänzen.

1.4 Zielstellung

Das in der REMI-Mutante YH4.5 betroffene Gen kodiert vermutlich für eine Rhomboid-ähnliche Protease. Die Apathogenität von YH4.5 lässt eine Rolle des Gens in der Pathogenese des Pilzes vermuten. Eine Verifizierung dieses Phänotypes kann durch eine Komplementierung der REMI-Mutante und durch gezielte Deletion der mutmaßlichen Rhomboid-ähnlichen Protease erfolgen. Zu Beginn dieser Arbeit wurde sich für die Generierung einer Deletionsmutante entschieden. Die phänotypische Analyse hinsichtlich der Pathogenität dieser Mutante sollte im Vordergrund dieser Arbeit stehen.
Zusätzlich sollte das Genprodukt, die RLP1, charakterisiert werden. Das beinhaltet die subzelluläre Lokalisierung des Proteins, Aktivitäts- sowie Komplementationsstudien unter Verwendung einer Deletionsmutante von *S. cerevisiae*. Wenn möglich sollte das Substrat identifiziert werden, wodurch Einblicke in die übergeordneten zellulären Prozesse gewonnen werden können, in die die untersuchte mutmaßliche Rhomboid-ähnliche Protease involviert ist.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden von den Firmen Fluka, Merck, ROTH, SERVA und SIGMA® geliefert. Die organischen Lösungsmittel wurden von CALBIOCHEM®, ROTH und SIGMA® bezogen. Die Antibiotika, X-Gal und IPTG stammten von SIGMA®, ROTH und Ducheva Biochemie.

Enzyme:	High Fidelity PCR Enzyme Mix	MBI Fermentas
	Taq-Polymerase	MBI Fermentas
	Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
	RNase	ROTH
	RNase-freie DNase	Roche
Marker:	DNA-Marker	MBI Fermentas
	RNA-Marker	MBI Fermentas
	Protein-Marker	MBI Fermentas
	MitoTrackerÂő Red CMXRos	Invitrogen
Nukleotide:	α-[^{32}P]-dATP	ICN Biomedicals
	Desoxynukleotide	MBI Fermentas
	Oligonukleotide	MWG-Biotech AG
„Kits“:	QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN
	RNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN
	RevertAid™First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
	SMART™RACE cDNA Amplification Kit	Clontech Laboratories
	TA Cloning® Kit	Invitrogen
	Megaprime DNA Labelling System	Amersham Biosciences
	SYBR® GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems
	ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare

2.2 Puffer und Medien

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Medien und in Tabelle 3 alle genutzten Puffer mit ihren Zusammensetzungen aufgeführt. Nach dem Autoklavieren wurde ab einer Temperatur von ca. 50°C dem Medium die Antibiotika, X-Gal bzw. IPTG zugegeben. In der Tabelle 4 sind alle verwendeten Antibiotika und Zusätze mit den genutzten Konzentrationen aufgelistet.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Medien

Medium	Zusammensetzung	Volumen
2× Agrobakterien Minimalmedium	8,2 g Dikaliumhydrogenphosphat, 5,8 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,6 g Natriumchlorid, 0,8 g Ammoniumsulfat in 1200 mL destillierten Wasser lösen, (pH 5,3), 0,272 g Kalziumchlorid Hexahydrat in 400 mL warmen destillierten Wasser lösen, 2 g Magnesiumsulfat Heptahydrat in 200 mL warmen destillierten Wasser lösen, 0,01 g Eisen-(II)-sulfat Heptahydrat in 200 mL warmen destillierten Wasser lösen, alle Lösungen vereinen, 8 g Glukose hinzufügen	2 L
10× FRIES No.3	37,5 g Saccharose, 25 g Ammoniumtartrat, 5 g Hefeextrakt, 5 g Ammoniumnitrat, 5 g Kaliumdihydrogenphosphat, 2,5 g Magnesiumsulfat Heptahydrat, 0,65 g Kalziumchlorid Monohydrat, 0,5 g Natriumchlorid, (pH 6,0) bei -20ÂřC aufbewahren, vor dem Autoklavieren auf 1x verdünnen	500 mL
2× Induktionsmedium	2 L 2 × Agrobakterien Minimalmedium, 31,2 g MES, 40 mL 50 % Glycerin, (pH 5,3), steril filtrieren	
Induktionsmedium Platten	7,5 g Bacto-Agar in 250 mL destillierten Wasser autoklavieren, hinzufügen von 250 mL steriles 2 × Induktionsmedium und 2 mL sterilem 50 mM Acetosyringon	500 mL
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 15 g Bacto-Agar (nur für Platten)	1 L
Limabohnen-Agar	25 g Lima-Bohnen mit 250 g destilliertem Wasser autoklavieren, hinzufügen von 200 mL destillierten Wasser und gut durchschütteln, durch Muslin filtern, 1:2 mit destilliertem Wasser auffüllen, pro 500 mL 8 g Bacto-Agar hinzufügen	
Minimalmedium für *R. commune*	25 mM Kaliumnitrat, 7,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 2 mM Magnesiumsulfatheptahydrat, 2,97 μM Thiamin, 0,02 μM Biotin, 28mM Glukose bzw. Glyzerin	

Medium	Zusammensetzung	Volumen
SC-Medium	4 g YNB (ohne Aminosäuren), 12 g Glukose, 0,5 g Drop out-Mix (-Leucin/ Histidin/ Tryptophan), 23 mg Histidin, 23 mg Tryptophan (pH 5,6 10N Natriumhydroxid), 10 g Bacto-Agar falls Platten erwünscht	600 mL
YPD-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Bacto-Pepton (pH 5 Salzsäure), 2 % Glukose, 2 % Bacto-Agar falls Platten erwünscht	
YPG-Medium	1 % Hefeextrakt, 2 % Bacto-Pepton (pH 5 Salzsäure), 2 % Glyzerin, 2 % Bacto-Agar	

Tabelle 3: Zusammensetzung der Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Aufschlusspuffer (Hefen)	2 % [v/v] Triton X-100, 1 % [v/v] SDS, 100 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris (pH 8 Salzsäure), 1 mM EDTA
Blocklösung	5 % Milchpulver, 1× TBST
Denaturierungspuffer	1,5 M Natriumchlorid, 0,5 M Natriumhydroxid
Denaturierungspuffer (für RNA)	7 % [v/v] 10× MOPS, 24 % [v/v] Formaldehyd, 69 % [v/v] Formamid
DNA-Extraktionspuffer	100 mM (pH 8,0 Salzsäure), 100 mM Natriumchlorid, 10 mM EDTA, 1 % [w/v] PVPP, 1 % [w/v] Sarcosyl
Entfärbelösung (Pilz)	80 % [v/v] Ethanol, 20 % [v/v] Chloroform, 0,15 % [w/v] TCA
6× DNA-Ladepuffer	60 % [v/v] Glyzerin (99%), 60 mM ETDA, 0,01 % [w/v] Bromphenolblau
Färbelösung (Pilz)	50 % [v/v] Ethanol, 16,7 % [v/v] Milchsäure, 16,7 % [v/v] Glyzerin, 1,25 % [w/v] Trypanblau
Färbelösung (Protein)	0,05 % [w/v] Coomassie, 10 % [v/v] Essigsäure, 30 % [v/v] Methanol
Hybridisierungslösung	0,5 M Dinatriumhydrogenphosphat, 0,17 % [v/v] Phosphorsäure, 1 % [w/v] BSA, 1 mM EDTA, 7 % [w/v] SDS
Lagerlösung (Pilz)	33 % [v/v] Milchsäure, 33 % [v/v] Glyzerin

Medium	Zusammensetzung
Plasmidlösung 1	25 mM Tris (pH 8,0 Salzsäure), 10mM EDTA
Plasmidlösung 2	0,2 M Natriumhydroxid, 1 % [w/v] SDS
Plasmidlösung 3	3 M Natriumacetat (pH 5,0 Salzsäure)
10× MOPS	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA (pH 7,0)
Neutralisierungspuffer	1,5 M Natriumchlorid, 0,5 M Tris (pH 7,0 Salzsäure)
Proteinprobenpuffer	0,09 M Tris (pH 6,8 Salzsäure), 20 % [v/v] Glyzerin, 2 % [w/v] SDS, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 M DTT
Protoplastenpuffer B1	10 mM Tris (pH 7,5 Salzsäure), 0,7 M Kaliumchlorid, 50 mM Calciumchlorid
Protoplastenpuffer B2+PEG	10 mM Tris (pH 7,5 Salzsäure), 1 M Sorbitol, 50 mM Calciumchlorid, 50 % [w/v] PEG6000
6× RNA-Ladepuffer	50 % [v/v] Formamid, 38 % [v/v] 1× MOPS, 6 % [v/v] Formaldehyd, 6 % [v/v] Glyzerin, 0,04 % [w/v] Bromphenolblau, 0,1 % [w/v] Ethidiumbromid
SDS-Laufpuffer	0,05 M Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % [w/v] SDS
20× SSC	0,3 M Natriumcitrat, 3 M Natriumchlorid (pH 7,0)
50× TAE	2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, (pH 8,3)
10× TBST	10 mM Tris (pH 8,0 Salzsäure), 150 mM Natriumchlorid, 0,05 % [v/v] Tween20
Transferpuffer	0,05 M Tris, 0,08 M Glycin, 0,04 % [w/v] SDS, 20 % [v/v] Methanol
Waschlösung 1	2× SSC, 0,05 % [w/v] SDS
Waschlösung 2	0,1× SSC, 0,1 % [w/v] SDS

Tabelle 4: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika und anderen Zusätze

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	0,1 mg/mL	Wasser
Cefotaxim	0,1 mg/mL	Wasser
Flourdesoxyuridin	0,1 μM	Wasser
Gentamycin	15 μg/mL	Wasser
Hygromycin	0,1 mG/mL	Wasser
IPTG	1 mM	Wasser
Kanamycin	30 μg/mL	Wasser
Phleomycin	20 μg/mL	10 % [v/v] Ethanol
Rifampicin	50 μg/mL	Methanol
Spectinomycin	50 μg/mL	Wasser
Tetracyclin	12,5 μg/mL	Ethanol
X-Gal	80 μg/mL	Dimethylformamid

2.3 Anzucht von *R. commune*

2.3.1 Kultivierung auf Lima-Bohnen-Agar

Die Sporen des Pilzes wurden auf festem Lima-Bohnen-Agar ausgebracht. Die Lima-Bohnen-Platten mit den Sporen wurden bei 17°C etwa zwei Wochen im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit ist der Pilz gewachsen und hat Sporen in optimaler Anzahl produziert. Anschließend können von den Platten Sporen isoliert werden.

2.3.2 Pilzanzucht in Flüssigmedium

Jeweils 100 mL steriles 1× FRIES No.3 wurde in großen Petrischalen mit 10^5 Pilzsporen angeimpft. 6-Well Platten wurden mit je 8 mL sterilem 1× Flüssigmedium und 10^4 Pilzsporen befüllt. Die Inkubation erfolgte bei 17°C unter langsamen Schwenken 10 - 14 Tage im Dunkeln. Zur Weiterverarbeitung musste das Myzel mit einer Wasserstrahlpumpe vom Medium getrennt werden. Das Myzel konnte bis zur DNA- bzw. RNA-Isolierung bei -80°C gelagert werden.

2.3.3 Sporenisolation von Limabohnen-Agar

Um die höchstmögliche Sporenanzahl zu ernten wurden die mit Pilzmyzel bewachsenen Lima-Bohnen-Platten mit 10 mL sterilem Wasser bedeckt. Die Ablösung der Sporen erfolgte durch

Abkratzen mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze. Die Suspension wurde durch sterile Glaswolle filtriert, die anschließend mit sterilem Wasser gewaschen wurde. Nun konnten die Sporen für 10 min bei 5500 g sedimentiert werden. In einer geeigneten Menge sterilen Wasser aufgenommen wurde die Konzentration der Sporen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Sporen wurden langsam auf -80°C abgekühlt und anschließend bei dieser Temperatur gelagert.

2.3.4 Sporenisolation nach der Maracas-Methode

Für einen Vergleich der produzierten Sporen wurden die mit Pilzmyzel bewachsenen Lima-Bohnen-Platten mit ca. 30 g Glaskugeln (Durchmesser 2,85 - 3,3 mm) und 5 mL sterilem Wasser 30 min auf einem Schüttler (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Sporenanzahl mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

2.3.5 Inokulation von Gerstenpflanzen

Es wurden Gerstensamen auf einem gedämpften Erde-Sand-Gemisch ausgebracht. Die Pflanzen wurden bis zur Inokulation bei 18°C, 16,67 klx Beleuchtungsstärke und 60 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für die Inokulation wurden die ca. 6 Tage alten Pflanzen mit einer Sporensuspension besprüht, die 0,1 % Tween20 enthielt. Es wurden 10^7 Sporen pro 10 Pflanzen ausgebracht und 24 Stunden bei nahezu 100% Luftfeuchtigkeit im Dunkeln inkubiert. Anschließend wuchsen die Pflanzen zu den gleichen Bedingungen wie vor der Inokulation. Nach 14 - 21 Tagen traten gegebenenfalls Symptome auf den Primärblättern auf.

2.3.6 Färbung von *R. commune* auf infizierten Gerstenblättern

Die infizierten und uninfizierten Gerstenblätter wurden zunächst über Nacht in der Entfärbelösung (Pilz) geklärt. Nun wurde der Pilz und tote Zellen mit der Färbelösung (Pilz) ebenfalls über Nacht gefärbt. Nachdem die Blätter zweimal mit der Lagerlösung (Pilz) gewaschen wurden, konnten sie bis zum Mikroskopieren bei Raumtemperatur gelagert werden. Das Mikroskopieren erfolgte in 50 % [v/v] Glyzerin.

2.3.7 Mikroskopie

Für sämtliche mikroskopischen Arbeiten wurde das Axioplan 2 imaging Carl Zeiss verwendet. Es verfügte über ein ApoTome Kamerasystem. Die Anregung mit UV-Licht wurde durch FluoArc quantitativ geregelt. Für die Lokalisierungsstudien wurden die Filter-Sets 09 (Anregungswellenlänge: 450 - 490 nm, Emissionswellenlänge: 515 nm) und 45 (Anregungswellenlänge: 560 nm, Emissionswellenlänge: 630 nm) verwendet. Dazu wurden die Mitochondrien der Hyphen mit MitoTrackerÂő Red CMXRos nach Herstellerangaben gefärbt. Für die Analyse der Mikroskopie-Bilder stand die Software AxioVision LE zur Verfügung.

2.4 Nukleinsäureanalytik

2.4.1 Präparation genomischer DNA aus Pilzmyzel bzw. Pflanzenmaterial

Das bei -80°C eingefrorene Pilzmyzel wurde in einem Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Puder zerrieben und anschließend mit einem Volumenteil DNA-Extraktionspuffer gemischt. Nach Zugabe von 1 mL Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) wurde nochmals gemischt und dann 15 min bei Raumtemperatur unter Schütteln (1000 rpm) inkubiert. Nach einem 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei 6650 g erfolgte die Präzipitation der DNA aus dem Überstand durch Zugabe eines Volumenteils Isopropanol. Das durch Zentrifugieren (10 min, 15500 g) entstandene DNA-Sediment wurde mit 70 % [v/v]-igem Ethanol gewaschen und in einer geeigneten Menge deionisiertem Wasser aufgenommen.
Durch Messungen der optischen Dichte (OD) bei 260 und 280 nm konnte die Konzentration (c_DNA) nach Formel 1 und die Reinheit (q) (sollte zwischen 1,8 und 2 liegen) bestimmt werden (Formel 2). Der Verdünnungsfaktor der DNA geht als f_v mit in die Konzentrationsbestimmung ein.

$$c_{DNA} = OD_{260} \cdot 50 \frac{mg}{mL} \cdot f_v \tag{1}$$

$$q = \frac{OD_{260}}{OD_{280}} \tag{2}$$

2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

3 - 5 mL *E. coli* Übernachtkultur wurde bei 6650 g 10 min sedimentiert. Die Zellen wurden in 0,1 mL Plasmidlösung 1 resuspendiert. Durch die Zugabe von 0,2 mL Plasmidlösung 2 und 5 μL RNase (10 mg/mL) erfolgte bei Raumtemperatur in 15 min die RNA-Degradierung. Anschließend wurden die Protein durch Zugabe von 0,2 mL Plasmidlösung 3 10 min bei 0°C präzipitiert und durch Zentrifugieren (10 min bei 15500 g) sedimentiert. Die DNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe eines Volumenteils Isopropanol zum Nukleinsäure-haltigen Überstand. Schließlich wurde die Plasmid-DNA durch Zentrifugieren (10 min bei 15500 g) sedimentiert, anschließend mit 70 % Ethanol gewaschen und in destillierten Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte erneut nach Formel 1.

2.4.3 DNA-Extraktion aus *S. cerevisiae* zur Überprüfung der Transformation

0,5 mL Übernachtkultur wurde sedimentiert (2 min, 15500 g) und anschließend in 0,5 mL Aufschlusspuffer (Hefen) resuspendiert. Mit 0,5 g Glasperlen (0,25 - 0,5 mm) versetzt wurden die Zellen durch 1 min sehr starkes Schütteln aufgeschlossen. Nach 1 min bei 15500 g zentrifugieren konnte der Überstand direkt für eine PCR als Matrize eingesetzt werden.

Tabelle 5: Zusammensetzung und Programm der PCR

Zusammensetzung		Programm		
Komponente	Konzentration/ Menge	Temperatur	Zeit	Zyklen
Matrize (DNA)	20 - 100 ng	95°C	2 min	
10× Puffer	2 μL	95°C	1 min	25 - 50 Zyklen
Magnesium-chlorid	2,5 mM	45-65°C (T_a)	30 sec	
Desoxynukleotide	je 0,25 mM	72°C	30 sec - 6 min (t_s)	
Senseprimer	0,25 μM	72°C	1 - 8 min	
Antisenseprimer	0,25 μM	14°C	bis zur Entnahme	
Taq-Polymerase	0,5 U			
Wassser	bis 20 μL auffüllen			

2.4.4 RNA-Isolation

Die Isolation von RNA erfolgte mit Hilfe des QIAGEN RNeasy Plant Mini Kit nach Herstellerangaben. Die Konzentration der RNA wurde laut Formel 3 bestimmt.

$$c_{RNA} = OD_{260} \cdot 40 \frac{mg}{mL} \cdot f_v \tag{3}$$

2.4.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung von DNA in einer Horizontalgelapparatur wurden Agarosegele einer Konzentration von 0,5 - 1,5 % [w/v] Agarose in 1× TAE-Puffer genutzt. Die Agarose wurde bei circa 70°C in TAE-Puffer aufgelöst. Die Elektrophorese erfolgte mit 1× TAE-Puffer bei 25 - 100 V. Die aufgetrennte DNA wurde mit Ethidiumbromid auf dem UV-Transilluminator detektiert.
Die Agarosegele wurden mit der GeneSnap 6.05 Software der Firma SynGene (Synoptics Ltd.) fotografiert und mit GeneTools 3.06 wurden die Fragmentstärken analysiert.

2.4.6 Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Zur Auftrennung von RNA wurden mit Formaldehyd versetzte 1 % [w/v] Agarosegele verwendet. 1 % [w/v] Agarose wurde in 1× MOPS-Puffer bei etwa 70°C geschmolzen und nach kurzem Abkühlen mit 5 % [v/v] Formaldehyd gemischt. 7 μL RNA-Probe wurde mit 15 μL Denaturierungspuffer (für RNA) versetzt und 10 min bei 65°C denaturiert. Nach Zugabe von

4 μL 6× RNA-Ladepuffer konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde bei 70 V durchgeführt. Auch bei der RNA erfolgte die Detektion mit Hilfe von Ethidiumbromid.

2.4.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die gewünschten DNA-Fragmente im Agarosegel wurden unter einer UV-Lampe vom Rest des Gels separiert und anschließend mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde entweder über Gelelektrophorese anhand der Markerfragmente (siehe MBI Fermentas) geschätzt oder bei höheren Konzentrationen durch die Formel 1 bestimmt.

2.4.8 Restriktion von DNA

Für Endonukleasebehandlungen wurden bei genomischer DNA 15 μg und bei Plasmid-DNA 3-5 μg DNA eingesetzt. Unter Verwendung von 30 U Enzym bei der Behandlung genomischer DNA und von 10 U Enzym bei der Behandlung von Plasmid-DNA war die DNA-Restriktion nach 2 - 8 h bei der für das Enzym spezifischen Temperatur vollständig. Auf einem 1 - 2 % [w/v]-igem Agarose-Gel wurde die Restriktion übersprüft.

2.4.9 PCR

Alle Oligonukleotide (Primer) sind im Anhang Z.1 zusammengefasst. Die Zusammensetzung der PCR mit der Taq-Polymerase wurde in Tab. 5 aufgeführt. In dieser Tabelle kann zudem das Programm der PCR entnommen werden. Die Annealing-Temperatur (T_a) sowie die Synthesezeit (t_s) wurde bei jeder PCR angegeben. Der High Fidelity PCR Enzyme Mix wurde nach dem Protokoll des Herstellers zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Vektorkonstruktionen genutzt.
Die Kontrolle der PCR erfolgte auf einem 1 - 2 % [w/v]-igen Agarosegel.

2.4.10 *real-time*-PCR

Die *real-time*-PCR wurde entweder mit 20 ng genomischer DNA oder mit 1:10 verdünnter cDNA von uninfizierten und infizierten Blättern als Matrize mit dem SyberGreen Mix wie in Tab. 6 dargestellt durchgeführt. Für die Auswertung der Rohdaten wurde die Software MxPro - Mx3005P v4.10 von Stratagene genutzt. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte nach Pfaffl (2001) mit Office Exel® von Microsoft®.

Tabelle 6: Zusammensetzung und Programm der *real-time*-PCR

Zusammensetzung		Programm		
Komponente	Konzentration/Menge	Temperatur	Zeit	Zyklen
Matrize (DNA)	siehe oben	95°C	10 min	
SyberGreen Mix	5 μL	95°C	30 sec	40
Senseprimer	25 nM	60°C	30 sec	
Antisenseprimer	25 nM	72°C	1 min	
Wasser	bis 10 μL auffüllen	95°C	2 min	
		60°C	30 sec	
		95°C	1 min	

2.4.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation eines DNA-Fragmentes in den pCR2.1-Vektor wurde nach Angaben des TA Cloning® Kits durchgeführt.
Für Ligationen eines DNA-Fragmentes in andere Vektoren wurden äquimolare Mengen (ca. 50 - 100 ng) der DNA-Komponenten mit 10 U T4-DNA-Ligase im entsprechenden Puffer 4 - 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Eine Zugabe von 1 mM dATP erhöhte die Ligationseffizienz.

2.4.12 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA durchgeführt. Dazu wurden Plasmide und PCR-Fragmente nach Angaben von AGOWA vorbereitet.

2.4.13 Synthese von cDNA

Vor der eigentlichen cDNA Synthese erfolgte eine Entfernung der genomischen DNA aus der RNA durch eine DNase-Behandlung nach Herstellerangaben (Roche). Die vollständige Beseitigung der genomischen DNA wurde mit einer PCR mit 50 Zyklen überprüft.
Die anschließende Synthese von cDNA geschah nach Angaben des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit mit 5 μg RNA. Als Startoligonukleotid wurde Oligo(dT)$_{18}$ verwendet. Zur Identifizierung der Intro-Exon-Struktur wurde das SMART™ RACE cDNA Amplification Kit nach Herstellerangaben genutzt. Die 5' RACE cDNA wurde mit Primer 10 (Sequenz siehe Anhang Z.1) als Startoligonukleotid hergestellt.

2.4.14 DNA-DNA-Hybridisierung

Die Sonde für DNA-DNA-Hybridisierungen wurde mit dem Megaprime DNA Labelling System nach Herstellerangaben synthetisiert. Hierfür wurde statt dem Nukleotid dATP α-[^{32}]-dATP genutzt. Mit Hilfe von ProbeQuant™ G50 Micro Columns wurde das überschüssige radioaktive dATP durch Zentrifugation (15500g, 1 min) von der Sonde getrennt. Nach 10 min Denaturierung bei 95°C wurde die Sonde sofort auf 4°C bis zum Einsatz herabgekühlt. Für die DNA-DNA-Hybridisierung wurde die mit Restriktionsenzymen behandelte genomische DNA auf einem 1 % [w/v]-igem Agarosegel bei 20 V über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das Gel verschiedenen Waschungen unterzogen:

- kurz in destilliertem Wasser
- 20 min in 0,25 M Salzsäure
- kurz in destilliertem Wasser
- zweimal 20 min in Denaturierungspuffer
- kurz in destilliertem Wasser
- zweimal 20 min in Neutralisierungspuffer

Anschließend wurde die DNA mit einem Vakuum-Blotter 1 h mit 7 kPa auf eine Nylon-Membran transferiert. Als Transferpuffer diente 10× SSC. Die DNA wurde durch 30 min Trocknung bei 80°C und eine UV-Bestrahlung im Stratalinker auf die Membran fixiert.
Die DNA-DNA-Hybridisierung fand folgendemaßen statt:

- 2 h Vorhybridisierung bei 60°C in Hybridisierungslösung
- 10 h Hybridisierung durch Zugabe der vorbereiteten Sonde (Temperaturen siehe Ergebnisse)
- zweimal 30 min mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur waschen
- zweimal 30 min mit Waschlösung 2 bei 50°C waschen

Die Auswertung erfolgte 24 h nach Auflegen des Screens mit dem Typhoon Scanner von Amersham Biosciences.

2.5 Klonierung

2.5.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

100 mL LB-Medium wurden mit 1 mL einer Übernachtkultur von *E. coli* angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD von 0,4 unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Kultur 10 min auf 0°C herabgekühlt ist, wurden die Zellen sedimentiert (7 min, 3300 g, 4°C). Das Sediment wurde mit 100 mM $CaCl_2$ (steril und gekühlt) gewaschen und anschließend erneut sedimentiert (5 min, 3000 g, 4°C). Das in 100 mM $CaCl_2$ (steril und gekühlt) aufgenommene Sediment

wurde für 30 min bei 0°C inkubiert. Nach einem dritten Sedimentationsschritt (5 min, 3000 g, 4°C) wurden die Zellen in 2 mL 100 mM $CaCl_2$, 15 % [v/v] Glyzerin aufgenommen und ebenfalls für 30 min bei 0°C inkubiert. In 100 μL Aliquots konnten die kompetenten Zellen für ein Jahr bei -80°C gelagert werden.

2.5.2 Transformation von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde die Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock genutzt. Dafür wurden die kompetenten Zellen mit dem Ligationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Hierbei war ein Verhältnis von 50 μL Zellen auf 2 μL Ligation optimal. Der Hitzeschock erfolgte während einer 1 minütigen Inkubationsphase bei 42°C. Nach 5 min auf Eis wurden 750 μL LB-Medium zum Ansatz hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubationsphase der Zellen bei 37°C wurde der Transformationsansatz auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze in Antibiotika-haltiges LB-Medium überführt, um anschließend die Plasmid-DNA daraus zu isolieren (siehe 2.4.2).

2.5.3 Transformation von *S. cerevisiae*

100 mL YPD-Medium wurden mit 1 mL einer Übernachtkultur von *S. cerevisiae* angeimpft und 6 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Das Sediment von 5 mL dieser Kultur (30 sec bei 15500 g) wurde in 240 μL 50 % [w/v] PEG4000, 36 μL 1 M Liciumacetat, 50 μL denaturierte Lachsspermien-DNA ($\frac{10mg}{mL}$), 0,5 μg Plasmid-DNA, und Wasser (bis 360 μL) steril gelöst und 1 h bei 42°C inkubiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen (30 sec 15500 g) wurden diese in 1 mL sterilem Wasser aufgenommen und je 100 μL auf Selektionsplatten (SC-Medium) verteilt. Nach 4 Tagen bei 30°C konnten die Kolonien vereinzelt werden.

2.5.4 Herstellung kompetenter *A. tumefaciens*-Zellen

Mit einer Übernachtkultur des *Agrobacterium*-Stammes wurden 100 mL LB-Medium mit Rifampicin beimpft und bei 28°C bis zu einer OD von 0,4 - 0,8 unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurde anschließend sedimentiert (10 min, 4000 g, 4°C) und in 2 mL LB-Medium resuspendiert. Aliquots von jeweils 200 μL wurden max. 2 Monate bei -80°C gelagert.

2.5.5 Transformation von *A. tumefaciens*

Zur Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* wurden 200 μL kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 6 μg Plasmid-DNA versetzt. Nach einem 1 minütigen Bad in flüssigen Stickstoff erfolgte ein Hitzeschock bei 37°C über 6 min. Anschließend wurden 800 μL LB-Medium hinzugegeben und 2 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach dem Ausbreiten

der Zellen auf LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt, konnten die transformierten Zellen 2 Tage bei 28 - 30°C wachsen.

2.5.6 *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation von *R. commune*

Es wurde von einer zwei Tage alten *Agrobacterium*-Kultur, die das gewünschte Konstrukt enthielt, die optische Dichte bei 660 nm gemessen. Nun wurden die Zellen zu einer optischen Dichte von 0,15 mit 1 × Induktionsmedium und 0,2 mM Acetosyringon verdünnt und 6 h bei 28 - 30°C induziert. Anschließend wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ Sporen mit 100 μL der induzierten Agrobakterien gemischt und auf mit OPTITRAN BA-S 85 Filtern (0,45 μm) von Whatman belegten Induktionsmedium Platten ausgestrichen und bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach 2 Tagen wurden die Filter auf Lima-Bohnen-Agar mit Tetracyclin und dem entsprechenden Antibiotikum für die Transformanden übertragen. 8 - 10 Tage wurden die Transformation bei 17°C im Dunkeln gelagert. Dann konnten die Kolonien auf Lima-Bohnen-Agar überführt und analysiert werden.

2.5.7 Herstellung von *R. commune* Protoplasten

Etwa 2 g 10 Tage altes Mycel wurde durch Zentrifugation (5 min, 5500 g, 17°C) sedimentiert und zweimal mit Protoplastenpuffer B1 gewaschen. In Protoplastenpuffer B1 gelöst wurde es 5 sec mit einem sterilen Ultraturrax zerkleinert. Nach Zentrifugation (5 min, 5500 g, 17°C) wurde das Pilzmyzel in 10 mL Protoplastenpuffer B1 mit 125 mg Lysing Enzym gelöst und 6 h bei 29°C und unter leichten Schütteln (40 rpm) inkubiert. Durch sterile Glaswolle gefiltert und erneut pelletiert (5 min, 5500 g, 17°C) wurden die Protoplasten nach der Konzentrationsbestimmung mit der Fuchs-Rosenthal-Zählkammer in Protoplastenpuffer B1 auf $5{\cdot}10^7 \ \frac{Protoplasten}{mL}$ verdünnt.

2.5.8 Protoplastentransformation von *R. commune*

200 μL der Protoplasten wurden mit 20 μg linearer DNA (PCR-Fragment) oder 1 μL Plasmid-DNA und 500 μL Protoplastenpuffer B2+PEG gemischt und auf Lima-Bohnen-Platten mit 0,6 M Saccharose verteilt. Nach 24 h Inkubation bei 17°C wurde die Selektion dazugegeben (500 μg Phleomycin). Etwa 10 - 14 Tage nach Inkubation bei 17°C im Dunkeln konnten die Kolonien vereinzelt werden.

2.6 Proteinanalytik

2.6.1 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinen in einem denaturierenden Gel wurden SDS-Gele der in Tab. 7 aufgeführten Zusammensetzung hergestellt.

Tabelle 7: Zusammensetzung von SDS-Gelen

Komponente	12 % Trenngel	Sammelgel
Wasser	4,55 mL	3,77 mL
30 % Acrylamid Mix	4 mL	0,83 mL
3 M Tris (pH8,85 Salzsäure)	1,25 mL	
2 M Tris (pH 6,8 Salzsäure)		0,315 mL
10 % [w/v] SDS	100 μL	50 μL
10 % [w/v] APS	100 μL	75 μL
TEMED	4 μL	4 μL

Für die Proteinproben wurden 3 mL LB-Medium mit einer *E. coli* Kultur bis zu einer OD_{600} von 0,6 bei 37°C wachsen gelassen. Nach Entnahme von 1,5 mL der uninduzierten Kontrolle wurde IPTG hinzugegeben. Nach weiteren 30 min bei 37°C wurden diese induzierten und die uninduzierten Zellen sedimentiert (5 min, 10000 g) und mit 100 μL 5× Proteinladepuffer aufgenommen. Der Aufschluss der Zellen und gleichzeitig die Denaturierung der Proteine erfolgte 10 min bei 95°C. Nun konnten die Proben auf dem SDS-Gel separiert werden. Als Laufpuffer diente 1× SDS-Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 100 V pro Apparatur durchgeführt.
Ein Gel wurde jeweils mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt (30 min in Färbelösung (Protein), in 10 % [v/v] Essigsäure entfärbt bis der Hintergrund farblos war).

2.6.2 Proteinnachweis mit Antikörpern

Die Proteine wurden vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran mit Hilfe von Strom transferiert. Der Aufbau war wie folgt:

- Pluspol
- Whatman-Papier
- Nitrocellulosemembran
- SDS-Gel
- Whatman-Papier
- Minuspol

Der Transfer erfolgte mit 1× Transferpuffer bei 0,8 mA pro cm^2 für 1 h. Dann wurde die Membran 1 h in Blocklösung geschwenkt. Nach Zugabe des ersten Antikörpers wurde die Membran 1 h weiter inkubiert. Anschließend wurde 6 mal mit 1× TBST für je 10 min gewaschen. Die folgende Inkubation mit dem zweiten Antikörper und das ansschließende Waschen geschah exakt wie die Behandlung mit dem ersten Antikörper. Die Membran wurde

mit den ECL Plus Western Blotting Detection Reagents nach Herstellerangaben entwickelt. Die Antikörper sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der genutzten Antikörper

Antikörper	Antigen	Wirt	Verdünnungsfaktor
erster Antikörper	β-Laktamase	Hase	1:15000
zweiter Antikörper	Hasenproteine	Ziege	1:5000

2.7 Auswertungen

2.7.1 Nuklein- und Aminosäurevergleiche sowie Vektorkonstruktionen

Alle Sequenzen und Sequenzierungen wurden mit Vector NTI Advance™10.0 (Invitrogen) analysiert und verglichen. Mit diesem Programm wurden zudem die Überlegungen zu den Konstruktionen der Vektoren erleichtert. Mit Hilfe von MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008) wurde die Phylogenie des Proteins untersucht, wobei der Aminosäurevergleich mit ClustalW (Mackey *et al.*, 2002), welches in Vector NTI Advance™10.0 integriert ist, durchgeführt wurde. Zur Identifizierung von Sequenzen wurde das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLASTP 2.2.23+) mit der UniProtKB-Datenbank (Consortium, 2010) genutzt (Altschul *et al.*, 1990, 1997, 2005).

2.7.2 Prognose von Signalpeptiden

Die Aminosäuresequenz der *Rc*RLP1 wurde mit frei zugänglichen Programmen zur Prognose von Signalpeptiden auf eine mögliche Translokation untersucht. Die genutzten Programme sind:

- TargetP1.1 - Emanuelsson *et al.* (2007)
- WoLFPSORT - Horton *et al.* (2006, 2007)
- SubLoc v1.0 - Reinhardt & Hubbard (1998)
- CELLO -Yu *et al.* (2006)
- MitoProtII v1.101 - Claros & Vincens (1996)
- URGI Predotar - http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html (unveröffentlicht)

2.7.3 Prognose von Transmembrandomänen

Zur Ermittlung der Sekundärstruktur der *Rc*RLP1 wurden die Transmembranbereiche mit

mehreren Programmen vorhergesagt. Die Programme sind zugänglich und sind im Folgenden aufgelistet:

- TMHMM - Sonnhammer *et al.* (1998); Krogh *et al.* (2001)
- Phobius prediction - Köll *et al.* (2004)
- TMpred - Hofmann & Stoffel (1993)
- „DAS“ - Cserzo *et al.* (1997)
- MEMSAT3 - Jones *et al.* (1994)

2.7.4 Modellierung der Proteinstruktur der *Rc*RLP1

Proteine mit einer homologen Struktur zur RLP1 konnten aus Proteindatenbanken wie im Internet (http://www.rcsb.org/pdb) mit dem Programm BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) herausgefiltert werden. Eine Sekundärstrukturvorhersage erfolgte nach Bryson *et al.* (2005) mit dem Programm PSIPRED PREDICTION. Nach der Ähnlichkeit mit Rhomboid-ähnlichen Proteinen wurde eine Röntgenkristallstruktur einer Protease dieser Klasse als Matritze für eine Modellierung gewählt.
Zunächst wurde ein Sequenzvergleich zwischen der zu modellierenden Sequenz und der Matritzensequenz mit dem Programm Molecular Operating Environment (MOE) der Chem. Comp. Group. Inc. mit der BLOSUM30 Matrix nach Henikoff & Henikoff (1992, 1993) durchgeführt. Unter der Verwendung des Kraftfeldes CHARMM22 (MacKerell *et al.*, 1998) wurde auf der Basis des Sequenzvergleiches mit dem Programm MOE ein Modell erstellt. Dieses wurde mit den Programmen PROCHECK (Laskowski, 1993) und PROSA II (Sippl, 1990) energetisch optimiert. PROCHECK bewertet die stereochemische Qualität und zeigt, dass alle Kriterien, wie Ramachandran-Plot, Wasserstoffbrückenbindungen, Bindungslängen und -winkeln im erlaubten Bereich liegen. Mit PROSA II wurde bei dem entwickelten Modell untersucht ob es sich um eine Struktur mit potentieller nativer Faltung handeln könnte.
Aufgrund der Ähnlichkeit der modellierten Struktur zur Röntgenkristallstruktur des Matritzenproteins wurden Interaktionsstudien *in silico* in Betracht gezogen. Das Programm SYBYL optimierte die Position der gewählten Fragmente in der Bindungstasche mit dem TRIPOS-Kraftfeld (Tripos). Nachfolgend wurden Moleküldynamiksimulationen durchgeführt zur Erfassung von *induced-fit*-Effekten.
Die Strukturen wurden mit dem Programm Pymol v0.99 (Schrödinger, LLC, 2010) analysiert und visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der REMI-Mutante YH4.5

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Transformande YH4.5 des Isolates *strain5* von *R. commune* zur Verfügung (Yuill, 2008). Diese Mutante zeichnete sich durch langsames Wachstum *ex planta* (auf Lima-Bohnen-Agar) aus und bildete keine Sporen. Kurz nach Beginn der Arbeiten konnte YH4.5 nicht mehr nur durch Transfer von Platte zu Platte vervielfältigt werden, wodurch die Mutante verloren ging. Trotzdem konnten noch einige Untersuchungen durchgeführt werden, die im Folgenden erläutert sind. Anzumerken ist, dass aufgrund der fehlenden Sporulation nur ein biologisches Replikat im Falle der Expressionsstudie angefertigt werden konnte.

3.1.1 Integration des Plasmids pAN7-1 in das Genom von YH4.5

Die Analyse der die Integrationsstelle flankierenden DNA-Sequenz ergab kein nach der REMI-Theorie erwartetes Integrationsereignis. Am 5'-Ende der Integration konnte das pAN7-1-Plasmid in Antisense-Richtung nachgewiesen werden. Am 3'-Ende der Integration wurde eine pAN7-1-Integration in Sense-Richtung identifiziert. Daraus schloss man, dass das Plasmid in zwei Kopien in die Integrationsstelle integriert war. Aufgrund der gegenläufigen Sequenzen ging man von einer Schwanz-an-Schwanz-Integration aus. Eine folgende DNA-DNA-Hybridisierung mit dem Hygromyzin-Resistenzgen (Ec*HPT*) als Sonde zeigte jedoch, dass dieses Gen nur einmal im Genom von YH4.5 vorhanden war. Demzufolge wurde das Plasmid pAN7-1 zwar zweimal, aber mindestens einmal unvollständig integriert. Der Abschnitt mit dem *HPT*-Gen muss laut Hybridisierungsanalyse in der 3'-integrierten Plasmid-DNA, also in Sense-Richtung, liegen. Die 5'-integrierte DNA kann demzufolge nur Teile des Plasmids pAN7-1 enthalten. Dies war der Ausgangspunkt für die genaue Identifizierung des Integrationsereignisses der Mutante YH4.5 in dieser Arbeit.
Für die grobe Eingrenzung des Schwanz-Schwanz-Überganges wurden auf der 5'-Seite der Integration PCR-Fragmente unterschiedlicher Größe generiert. Der Sense-Primer (Primer 14) bindet spezifisch auf der genuinen genomischen DNA des Ausgangsisolates und war für alle PCR identisch. Die Antisense-Primer wurden so gewählt, dass sie zunehmend weiter in Richtung des Schwanz-Schwanz-Überganges binden. Konnte einer dieser Primer nicht mehr binden, war der Übergang überschritten (Abb. 7A). Es konnte nur mit dem Primer-Paar 14 und 55 kein Fragment amplifiziert werden. Somit endet die Antisense-Integration von pAN7-1 zwischen Primer 55 und 56, mit dem das größte Fragment (4193 bp) generiert werden konnte.
Nach einer PCR, bei der nur ein Primer (Primer 69) eingesetzt wurde, konnte der Schwanz-Schwanz-Übergang exakt bestimmt werden (Abb. 7B). Durch Sequenzierung des entstandenen Fragmentes wurde jeweils eine Bruchstelle des pAN7-1-Plasmids sowohl in der Antisense-

als auch in der Sense-Integration identifiziert. Demnach wurden zwei verschiedene Fragmente des Plasmids pAN7-1 gegenläufig in die Integrationsstelle von YH4.5 eingebaut. Die Integration in YH4.5 ist in Abb. 8B schematisch dargestellt. Die Bindungsstellen der genutzten Primer im Plasmid pAN7-1 sind im Anhang Z.2.1 verdeutlicht.

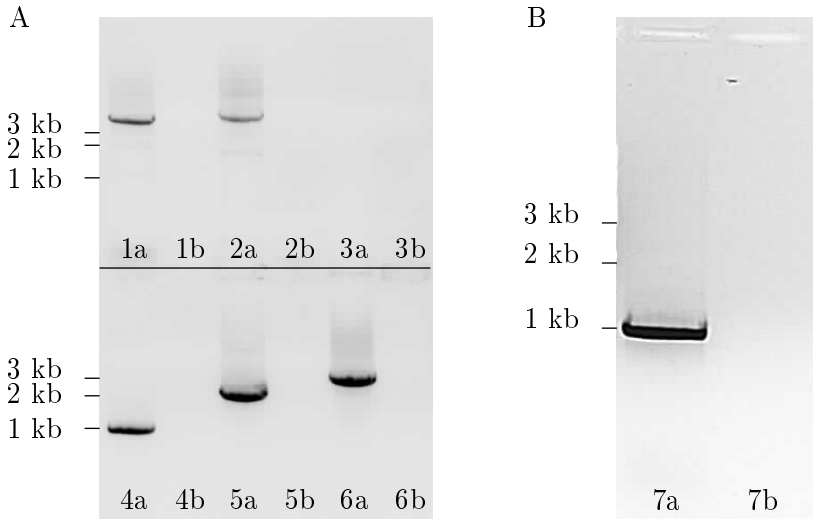


Abbildung 7: Abbildung 7: PCR-Analyse der REMI-Integration in YH4.5

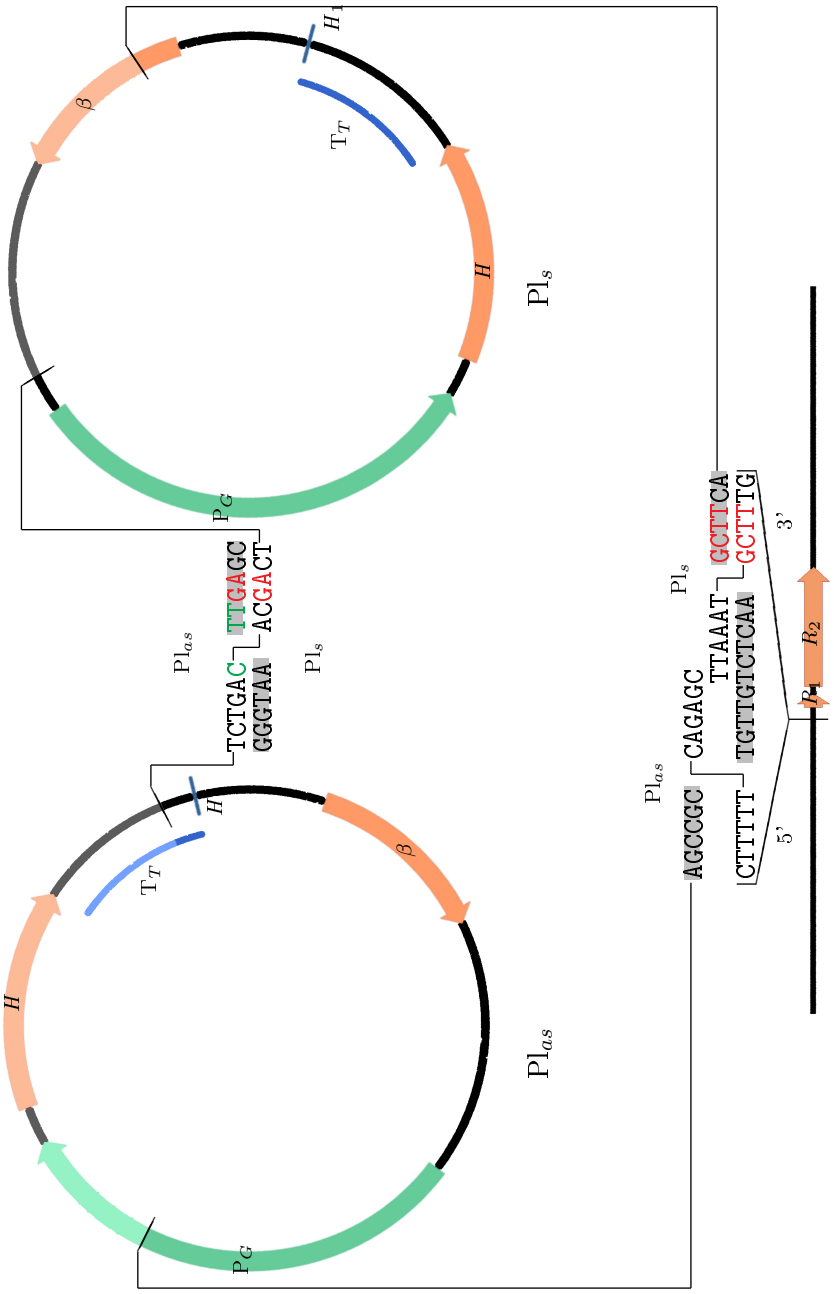
A - Der Sense-Primer wurde konstant gehalten und entsprach Primer 14. Durch die Variation des Antisense-Primers sollte die Region des Schwanz-Schwanz-Überganges eingegrenzt werden. Mit den Antisense-Primer 56 (4193 bp), 57 (3576 bp), 58 (2743 bp), 59 (1843 bp) und 60 (856 bp) konnte jeweils das erwartete Fragment vervielfältigt werden. Die Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigten das Ergebnis. Mit dem Primer-Paar 14 und 55 konnte jedoch kein Fragment erzeugt werden.
B - Diese PCR wurde mit Primer 69 durchgeführt, der sowohl auf der 5'- als auch auf der 3'-Seite des Schwanz-Schwanz-Überganges bindet. Durch Sequenzierung des erhaltenen PCR-Fragmentes (899 bp) konnte der Übergang exakt identifiziert werden.
T_a = 55°C, t_s = 6 min, a - YH4.5 als Matrize, b - Wasserkontrolle, 1 - Primer 14 und 57, 2 - Primer 14 und 56, 3 - Primer 14 und 55, 4 - Primer 14 und 60, 5 - Primer 14 und 59, 6 - Primer 14 und 58, 7 - Primer 69
Die genutzten Primer sind im Anhang Z.1 mit Sequenzen aufgeführt.

Abbildung 8: Abbildung 8: Schematische Darstellung des Integrationsereignisses der Mutante YH4.5

A - Darstellung des Integrationsereignisses: Die helleren Teile des dargestellten Plasmids pAN7-1 bzw. die grau hinterlegten Sequenzbereiche wurden nicht ins Genom von YH4.5 übertragen. Sequenzhomologien nahe der Integrationsstellen wurden rot markiert. Die grün hervorgehobene Sequenz CTT stellt ein mögliches Bindungsmotiv der Topoisomerase I dar. Die Integrationsrichtung wurde mit Linien verdeutlicht. Die Sequenzen sind der Übersicht halber nur einzelsträngig dargestellt.
B - Schematische Darstellung der Integrationsstelle: Die Fragmente von pAN7-1 sind gegenläufig im Genom von YH4.5 gelegen. Sie integrierten im Promotorbereich von Rc*RLP1*.
P_G - Promotor des An*GPD*-Gens, *H* - Hygromycin-B-Phosphotransferase, T_T - Terminator des An*TRPC*-Gens, β - β-Laktamase, H_1 - *Hin* dIII-Erkennungsstelle, Pl_s - , Pl_{as} - pAN7-1 bzw. pAN7-1-Fragment in Antisenserichtung, 5' - 5'-Integrationsstelle, 3' - 3'-Integrationsstelle

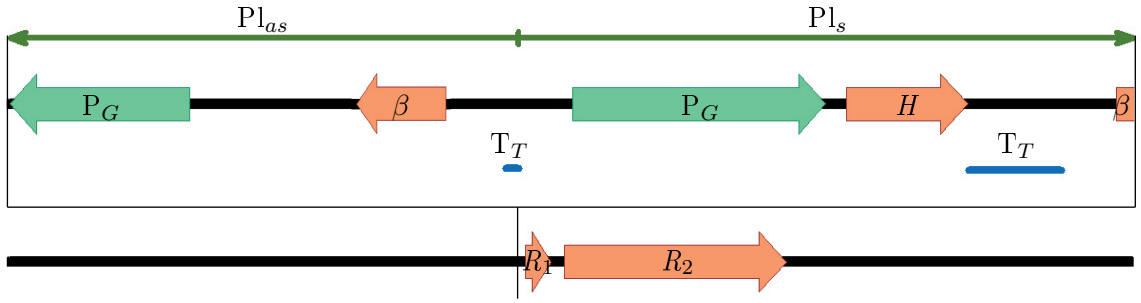
Nach Yuill (2008) geschah die Integration in die *Hin* dIII Erkennungsstelle der pilzlichen DNA. Er vermutete den Abbau von einem Basenpaar vom 5'-Überhang der Restriktionsstelle, in die das Plasmid pAN7-1 integrierte. Dabei geschah die Linearisierung von pAN7-1 nicht durch die Endonuklease *Hin* dIII. Ein einfaches Ligationsereignis zweier homologer *sticky*-Enden ist jedoch unwahrscheinlich. Dies wird durch die Deletion eines 11-bp-Fragmentes der genomischen DNA und die fehlende Homologie der 5'-Integrationsstelle zur Plasmidsequenz der 5'-Integration deutlich. Zusätzlich sprechen die Abstände der Integrationsstellen im Plasmid von der Restriktionserkennungsstelle gegen die Ligationstheorie.
Aufgrund einer Homologie von 4 bp an der 3'-Integrationsstelle (Abb. 8A) ist eine durch Mikrohomologien-vermittelte Rekombination (Schiestl *et al.*, 1993) wahrscheinlicher. Für diesen Typ der Rekombination sind nur sehr kleine Homologien von bis zu 4 bp notwendig. Zusätzlich treten dabei häufig nahe den Homologien Deletionen von einigen Basenpaaren auf. Chan *et al.* (2007) zeigten auch, dass die Wahrscheinlichkeit des Auftretens solcher Ereignisse durch Zugabe von Restriktionsendonukleasen gesteigert wird (im Fall einer 4-bp-Homologie um das Achtfache).
Eine Erklärung für die Integration von zwei Plasmidfragmenten ist hingegen nicht ganz einfach zu finden. Der Vergleich der Integrationsstellen von pAN7-1 zeigt eine 2-bp-Homologie, die 2 bp von der Übergangsstelle entfernt ist (Abb. 8A). Dies spricht erneut für eine mögliche Mikrohomologie-vermittelte Rekombination. Die Integration geschah aber auch an einer CTT-Sequenz des 5'-Integrationsfragments von pAN7-1. Dies ist eine Erkennungsstelle für die Topoisomerase I, welche unter anderem in *S. cerevisiae* Doppelstrangbrüche in der DNA herstellt und dadurch eine unzulässige Rekombination begünstigt (Zhu & Schiestl, 1996). Demzufolge kann der Schwanz-Schwanz-Übergang ebenso durch die Topoisomerase I entstanden sein.
Die Reihenfolge der Integrationsereignisse kann anhand der oben beschriebenen Theorien nur vermutet werden. Ob die Rekombination der zwei pAN7-1-Fragmente oder die 3'-Integration

A



H_1
T_T
β
H
Pl_s
P_G
TCTGAC
GGGTAA
TTGAGC
ACGACT
Pl_{as}
Pl_s
H
T_T
β
H
Pl_{as}
P_G
AGCCGC
CAGAGC
CTTTTT
TGTTGTCTCAA
TTAAAT
GCTTCA
GCTTTG
Pl_{as}
Pl_s
5'
3'
R_1
R_2

B



Pl_{as}
Pl_s
P_G
β
P_G
H
β
T_T
T_T
R_1
R_2

ins Genom zuerst geschah, kann nicht gesagt werden. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass die 5'-Integration zuletzt stattfand, da an dieser Stelle keine Hinweise für eine Rekombination bzw. Ligation in Form von Homologien oder Sequenzmotiven gefunden werden konnten.

3.1.2 Expression von *Rc*RLP1 in der Mutante YH4.5

Die REMI-Mutante YH4.5 erzeugte nach Inokulation von suszeptiblen Gerstenpflanzen der Sorte Sloop keine Symptome. Daraus schlussfolgerte man, dass die Integration die Ursache dieser Apathogenität ist. Die Integration erfolgte jedoch in den Promotorbereich 90 bp vor dem Startcodon der Rc*RLP1* (Abb 8A), wodurch eine Expression dieses Genes nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte.

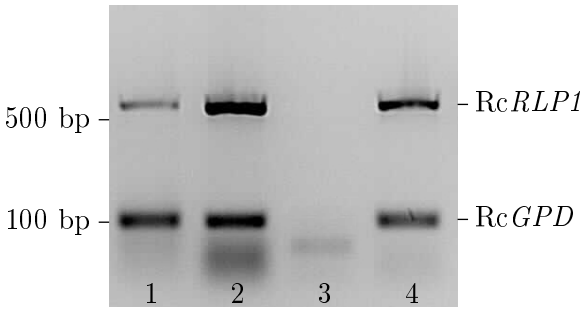


Abbildung 9: Abbildung 9: Analyse der Expression von Rc*RLP1*

Als Matrize für diese Multiplex-PCR wurde frisch synthetisierte cDNA von 14 d alten Myzelkulturen (Medium: FRIES No.3) eingesetzt. Als Referenzgen wurde Rc*GPD* mit den Primer 78 und 79 (109 bp) amplifiziert. Das Fragment der Rc*RLP1* entstand durch die Primer 10 und 13 (558 bp). Das Verhältnis der Primer betrug 1:1:2:2 (Primer 78:79:10:13). $T_A = 57°C$, $t_s = 30$ sec, Matrizen-DNA: 1 - cDNA von *strain*5, 2 - cDNA von YH4.5, 3 - Wasserkontrolle, 4 - genomische DNA von *strain*5

Um eine mögliche Expression von Rc*RLP1* nachzuweisen, wurde eine Multiplex-PCR auf cDNA durchgeführt. Dies ist eine PCR mit zwei Primer-Paaren, die Fragmente von unterschiedlicher Größe generieren. Mit einem Primer-Paar (Primer 78 und 79, 109 bp) wurde die cDNA eines Referenzgens (Glyzerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase, Rc*GPD*) zur Kontrolle der cDNA-Menge amplifiziert. Die Primer 10 und 13 wurden zur Generierung des Rc*RLP1*-Fragmentes genutzt (558 bp). In Abb. 9 ist das Ergebnis dieser Multiplex-PCR dargestellt. Sowohl in der Spur von YH4.5 als auch in der vom Wildtyp wurde das Rc*RLP1*-Fragment detektiert. Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Rc*RLP1* im Wildtyp-Isolat *strain*5 unter den verwendeten *in-vitro*-Bedingungen exprimiert wird. Durch die Plasmid-Integration wurde demnach die Expression der Rc*RLP1* in der REMI-Mutante nicht abgestellt. Leider konnte nur ein biologisches Replikat durchgeführt werden, da die REMI-Mutante YH4.5 verloren ging. Deshalb konnte nicht geklärt werden, wie sich die Expression quantitativ im Vergleich zu dem Wildtyp-Isolat verhielt.

3.2 Sequenzvergleich der *RLP1*-Allele von *Rhynchosporium*

Die REMI-Mutagenese wurde mit dem *Rhynchosporium*-Isolat *strain*5 durchgeführt. Alle weiteren Untersuchungen erfolgten aufgrund der geringen Sporulation und dem langsameren Wachstum von *strain*5 mit dem Isolat UK7. Durch den Austausch des Isolates musste zunächst überprüft werden, ob die Aminosäuresequenz des *Rc*RLP1-Protein in beiden Isolaten identisch ist. Diese wurde von der genomischen Sequenz abgeleitet.
Dafür wurden mehrere PCR mit genomischer DNA sowohl von *strain*5 als auch von UK7 durchgeführt. Für die PCR wurde der High Fidelity PCR Enzyme Mix von MBI Fermentas genutzt, da dieser Polymerasen mit 3' → 5' Exonuklease-Aktivität (*proof reading*-Aktivität) enthält (beispielsweise die *Pfu*-DNA-Polymerase). Die PCR-Primer wurden so gewählt, dass die Amplifikationsprodukte mindestens 50 bp überlappten und eine Größe von 1000 bp nicht überschritten. In Abb. 10 sind die Bindungsstellen der Primer dargestellt. Die PCR-Produkte wurden nach einer Zwischenklonierung in pCR2.1 (Invitrogen) sequenziert und vergleichend analysiert.

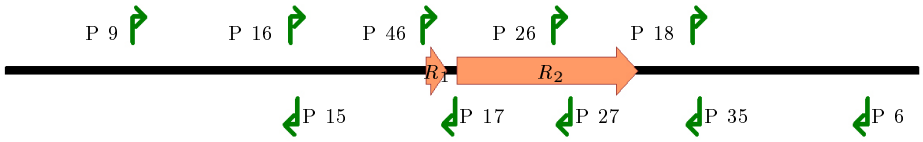


Abbildung 10: Abbildung 10: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen für den Sequenzvergleich der Wildtypisolate *strain*5 und UK7

Im Schema der genomischen DNA-Sequenz des Rc*RLP1*-Gens wurden die Primerbindungsstellen und deren Leserichtung mit grünen Pfeilen markiert. Für den Sequenzvergleich wurden die Primer-Paare Primer 9 und 15, Primer 16 und 17, Primer 46 und 27, Primer 26 und 35 und Primer 18 und 6 verwendet. Die Sequenzen der Primer sind im Anhang Z.1 aufgelistet.

In der 5'-Region des offenen Leserahmens der Rc*RLP1* konnten fünf Unterschiede in der DNA-Sequenz (Nukleotidunterschiede *strain*5→UK7 an Position -1272 T→C, -1041 A→G, -963 T→C, -835 A→G und -723 T→C vom Translationsstartcodon aus) aufgezeigt werden. In wieweit die Unterschiede zwischen den beiden Isolaten Einfluss auf die Expression des Genes ausüben, müssten Promotorstudien zeigen, in denen die entsprechenden Regionen des Genoms teilweise ausgetauscht werden.
Im offenen Leserahmen wurde ein Unterschied gefunden, der auch zu einem Aminosäure-Austausch führt (Nukleotidunterschied *strain*5→UK7 an Position 368 T→C; Aminosäure-Austausch A107V). Diese Aminosäure liegt am Anfang einer Transmembrandomäne und ist zudem nicht konserviert, wie aus dem Aminosäurevergleich verschiedener Rhomboid-ähnlicher Proteasen erkenntlich ist (Anhang Z.4.2). Valin und Alanin weisen die gleichen chemischen Eigenschaften (beide sind hydrophob) auf. Demzufolge hat die Variation wahrscheinlich keine Auswirkungen auf das Protein.

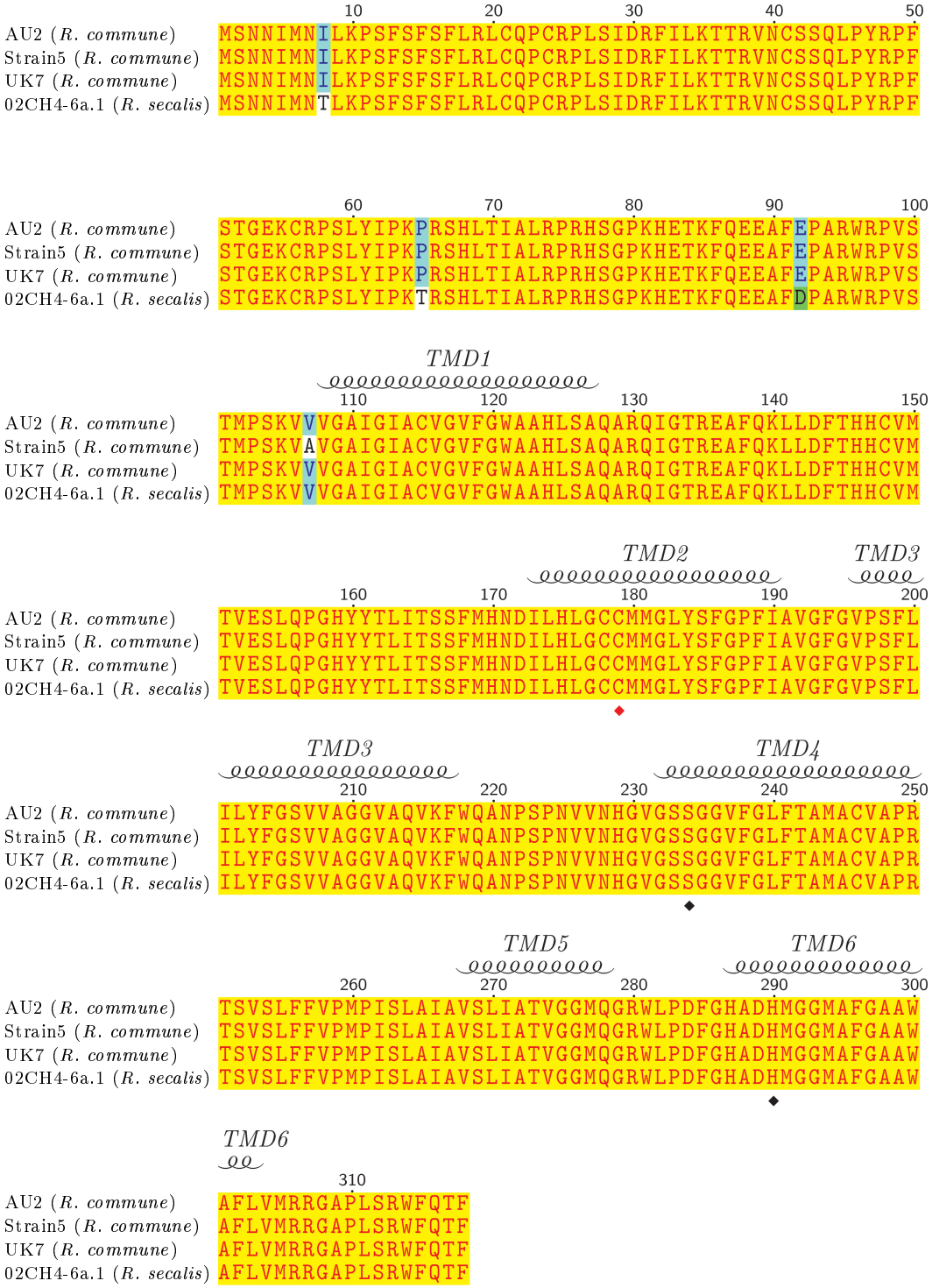


Abbildung 11: Abbildung 11: Vergleich der RLP1-Proteinsequenz verschiedener *Rhynchosporium*-Isolate

In diesem Proteinvergleich wurden die Proteinsequenzen der RLP1 genutzt, die von den Genomen von vier *Rhynchosporium*-Isolaten abgeleitet wurden. Wie bei allen anderen Proteinvergleichen wurden die putativ katalytisch aktiven Aminosäuren durch schwarze und das von dem konservierten Bereich der zweiten Transmembrandomäne abweichende Cystein C179 (siehe 3.8.2) durch eine rote Raute markiert. Die Positionen der Transmembrandomänen der RLP1 sind über dem Vergleich dargestellt. Sie entsprechen der Sekundärstruktur des Homologiemodells der RLP1 (siehe 3.8.3).

Im Bereich des Terminators konnten keine Sequenzunterschiede zwischen *strain*5 und UK7 aufgezeigt werden.
Zusätzlich konnte auf die Genomsequenz zweier weiterer *Rhynchosporium*-Isolate zugegriffen werden. Deshalb wurde die kodierende Sequenz von AU2 (*R. commune*) und 02CH4-6a.1 (*R. secalis*) in den Vergleich einbezogen. Bei diesen beiden Isolaten wurde keine Analyse des Promotor- und Terminatorbereiches durchgeführt. Mutationen im offenen Leserahmen führten bei diesen Allelen immer zu einem Aminosäureaustausch, weshalb im Folgenden ein Vergleich der Proteinsequenzen der vier Isolate dargestellt ist (Abb. 11). Aus dem Vergleich ist ersichtlich, dass sich alle Sequenzvariationen im N-Terminus des Proteins befinden und die Zusammensetzung aller Transmembrandomänen (siehe 3.8.3) erhalten bleibt.

3.3 Genstruktur

In früheren Arbeiten (Yuill, 2008) wurde ein offener Leserahmen von 651 bp angenommen. Ein Abgleich mit der NCBI-Datenbank ergab eine hohe Ähnlichkeit zu Rhomboid-ähnlichen Proteasen. Deshalb wurde das Gen *RLP1* genannt (engl. *Rhomboid-like protease*). Von diesem Leserahmen wurde die korrespondierende Aminosäuresequenz abgeleitet. Sie bestand aus 217 Aminosäuren. Andere Rhomboid-ähnliche Proteasen sind im Vergleich größer. Rhomboid1 aus *Drosophila melanogaster* (Akzessionsnummer (Akz.): NP_523883) besteht aus 355 Aminosäuren, PCP1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Akz.: NP_011615) aus 346 und selbst die prokaryotische Rhomboid-ähnliche Protease GlpG aus *Escherichia coli* (Akz.: AAA23890) ist mit 276 Aminosäuren fast 30% länger als *Rc*RLP1. Daher konnte man davon ausgehen, dass die von dem offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz nicht vollständig war. Aus diesem Grund wurde die Struktur des Gens mit cDNA vom *R.-commune*-Isolat UK7 aufgeklärt. Diese wurde mit dem SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech Laboratories) hergestellt. Die cDNA diente als Matrize für zwei PCR, von denen eine den 5'-, die andere den 3'-Bereich vom Leserahmen untersuchte. Hierbei musste bei beiden PCR das Signal durch jeweils eine nested PCR verstärkt werden. Die Abb. 12A stellt das Ergebnis der nested PCR auf das 5' - und das 3' Ende der cDNA dar. Die amplifizierten spezifischen Fragmente der cDNA wurden anschließend sequenziert und analysiert. Im 3'-Bereich ergaben sich bei 3 verschiedenen Sequenzierungen keine Abweichungen von der genomischen Sequenz. Durch den Vergleich der 4 Sequenzierungen des 5'-Bereiches der cDNA mit der genomischen DNA konnte ein 49 bp langes Intron identifiziert werden (Abb. 12B-C). Der so verlängerte Leserahmen (954 bp) kodiert für ein 318 Aminosäuren langes Protein, welches von der Größe vergleichbar mit anderen Rhomboid-ähnlichen Proteinen ist. Damit befindet sich die Integrationsstelle in der REMI-Mutante nur 90 bp vor dem Translationsstartcodon der Rc*RLP1*.
In *R. commune* wurden mehrere solcher kurzen Introns identifiziert (Rc*PFP1* 44 bp (S. Siersleben et al, unveröffentlicht), Rc*NIP1* 64 bp (van't Slot *et al.*, 2007)). Es konnte aber

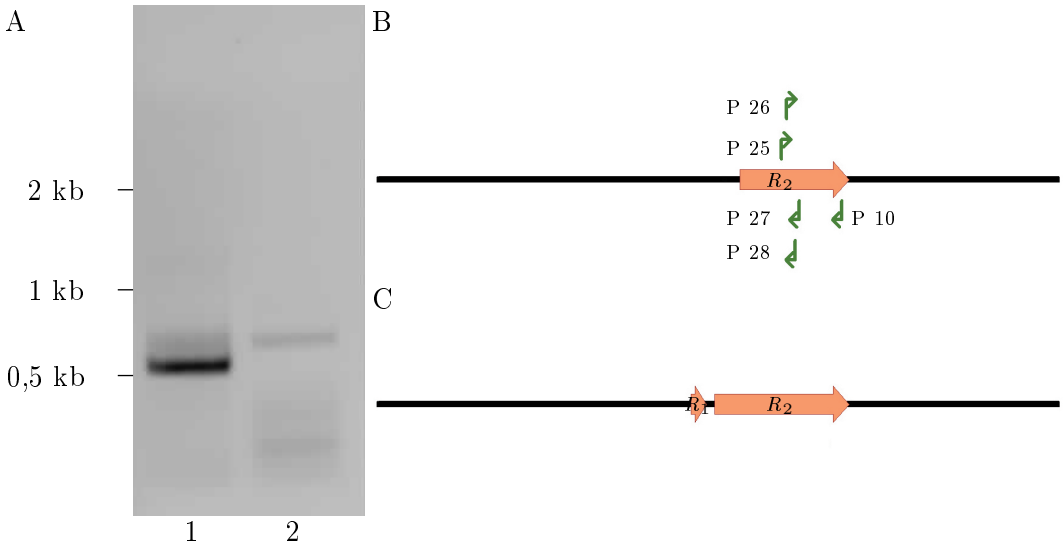


Abbildung 12: Abbildung 12: Aufklärung der Genstruktur von *Rc*RLP1

A) Ergebnis der PCR mit SMART™ RACE cDNA als Matrize
T_A = 55°C, t_s = 90 sec, 1 - Amplifikationsprodukt des 3'-Bereiches, 2 - Amplifikationsprodukt des 5'-Bereiches
B) Schematische Darstellung des *RLP1*-Gens vor Aufklärung der Genstruktur, C) Genstruktur nach der Aufklärung
R_1 - *RLP1* Exon 1, R_2 - *RLP1* Exon 2, P - Primer (Bindungsrichtung durch grüne Pfeile verdeutlicht)

auch ein größeres Intron nachgewiesen werden (Rc*HPK1* insgesamt 4 Introns von 108 bp, 74 bp, 65 bp und 45 bp (W. Knogge, unveröffentlicht)). Andere Pilze enthalten nahezu ebenso kurze Introns, wie die aufgezählten Gene von *R. commune*. In Ascomyceten beträgt die durchschnittliche Intronlänge von Genen mit einem einzigen Intron zum Beispiel bei *M. grisea* 129 bp, bei *A. fumigatus* 146 bp und bei *S. cerevisiae* 248 bp. Bei Basidiomyceten konnten kürzere durchschnittliche Intronlängen von Einzelintron-Genen nachgewiesen werden (*C. neoformans* 89 bp und *U. maydis* 123 bp) (McGuire *et al.*, 2009; Ivashchenko *et al.*, 2009). Ivashchenko *et al.* (2009) zeigten in Pilzen, dass bei Genen mit mehreren Introns diese kürzer sind als bei Genen mit nur einem oder zwei Introns. Diese These kann mit den oben aufgezählten Fällen allerdings nicht bestätigt werden, da die kürzesten Introns in Genen gefunden wurden, die nur ein einzelnes Intron enthalten. Jedoch müsste für eine solche Aussage erst ein umfangreicher Vergleich der cDNA-Datenbank mit der Genomsequenz erfolgen.

3.4 Expression von *Rc*RLP1

In den vorhergehenden Arbeiten wurde nicht untersucht, unter welchen Bedingungen und zu welchem Entwicklungszeitpunkt das Rc*RLP1*-Gen exprimiert wird. Zunächst wurde daher die Expression dieses im Wildtyp-Stamm UK7 wie in der Mutante YH4.5 (3.1.2) in Myzel aus Flüssigkulturen (*ex planta*) untersucht. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung des Pilzwachstums und der Genexpression während der Pilzentwicklung *in planta* mittels *real-time*-PCR. Hierzu wurden Primärblätter der hoch anfälligen Gerstensorte Ingrid, der moderat suszeptiblen Sorte Atlas und der resistenten Sorte Atlas 46 mit Sporen von UK7 (10^6 pro Blatt) inokuliert. Zu sechs Zeitpunkten nach Infektion (0, 1, 3, 6, 10 und 14 dpi) wurden jeweils 5 Blätter zur Extraktion von DNA und RNA geerntet. Die isolierte DNA diente zur Bestimmung der relativen Pilzbiomasse, die RNA zur cDNA-Synthese und anschließenden Ermittlung der relativen Genexpression. Zusätzlich wurden jeweils zwei Blätter für mikroskopische Untersuchungen zur Pilzentwicklung mit Trypanblau gefärbt.

3.4.1 Expression von Rc*RLP1* in *ex planta* gewachsenen *R. commune*-Kulturen

In Abschnitt 3.1.2 wurde bereits experimentell nachgewiesen, dass die Rc*RLP1* in *ex planta* kultiviertem Myzel von *strain*5 exprimiert ist. Da alle folgenden Untersuchungen mit dem Isolat UK7 durchgeführt wurden, musste die *ex planta*-Expression für dieses Isolat ebenfalls nachgewiesen werden. Das geschah analog zur Expressionsanalyse in *strain*5 mit Hilfe einer Multiplex-PCR (Abb. 13). Die Rc*RLP1* wird in UK7 unter diesen Bedingungen exprimiert. Da auch eine Expression im Isolat *strain*5 nachgewiesen wurde, wird das Gen wahrscheinlich Isolat-unabhängig transkribiert.

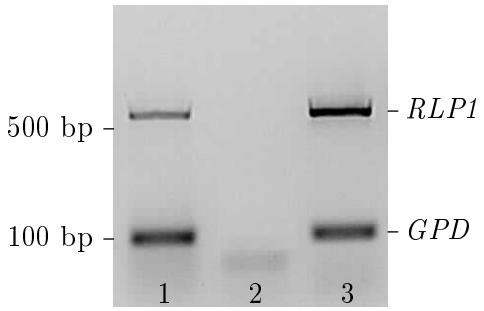


Abbildung 13: Abbildung 13: Analyse der Expression von Rc*RLP1* im Isolat UK7

Die Multiplex-PCR wurde mit cDNA von 14 d alten Myzelkulturen (UK7, Medium: FRIES No.3) als Matrize durchgeführt. Als Referenzgen wurde *GPD* mit den Primer 78 und 79 (109 bp) amplifiziert. Das Fragment der *RLP1* entstand durch die Primer 10 und 13 (558 bp). Das Verhältnis der Primer betrug 1:1:2:2 (Primer 78:79:10:13).
T_A = 57°C, t_s = 30 sec, Matrizen-DNA: 1 - cDNA von UK7, 2 - Wasserkontrolle, 3 - genomische DNA von UK7

3.4.2 Untersuchungen zum Referenzgen für Expressionsanalysen *in planta*

Um die Expression eines Genes quantitativ bestimmen zu können, ist ein konstitutiv exprimiertes Referenzgen notwendig. Hierfür werden oft Gene genutzt, die in den Primärstoffwechsel oder in elementaren Prozessen der Zelle involviert sind. Jedoch können sich auch die Expressionen solcher Gene in verschiedenen Zelltypen oder unter Stressbedingungen verändern (Bhatia *et al.*, 1994; Bereta & Bereta, 1995; Chang *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2010). Zur Auswahl eines konstitutiv exprimierten Referenzgens wurde zunächst die Expression von drei Kandidatengenen in *R. commune* während der Infektion untersucht. Diese Gene kodieren für eine Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GPD), Ubiquitin (UBI) und Aktin (AKT). Die Sequenzen für *AKT* und *UBI* stammen aus einer EST-Datenbank von *R. commune* (A. Navarro-Quesada, unveröffentlicht). Die *GPD*-Sequenz wurde nach Hybridisierung einer cDNA-Bank mit einer Sonde, die homolog zu GPD-Genen aus anderen filamentösen Pilzen ist, identifiziert (W. Knogge, unveröffentlicht). Die Expression dieser Gene wurde anhand eines konstitutiv exprimierten Genes der Gerste als Referenz normalisiert. Dafür wurde Aktin (Hv*AKT*, Akzessionsnummer: AY145451) verwendet. Es ist bekannt, dass Aktin in Säugern unter Stresssituationen wie Glukosemangel nicht in unveränderter Menge in der Zelle vorliegt (Howell & Tyhurst, 1979; Swanston-Flatt *et al.*, 1980; Snabes & Boyd, 1982). Pilzbefall könnte ebenso Stress in der Pflanze auslösen, welcher möglicherweise auch die Transkriptmenge von Hv*Akt* beeinflusst. Da aber der Pilz nur Kontakt zur Epidermis hat und für dieses Experiment ganze Blätter aufgearbeitet wurden, wurde angenommen, dass sich eine möglicherweise nicht konstitutive Expression in der Epidermisschicht vor dem Hintergrund der mRNA aus Mesophyllzellen relativiert. Bezieht man nun die Expression des zu untersuchenden Pilz-Referenzgens auf die Expression der Hv*AKT*, so erhält man im Falle einer konstitutiven Expression eine Parallele zur Grundlinie (Zeitachse). Deshalb ist es notwendig, neben der Bestimmung der Expression die Pilzmenge pro Gerstenblatt zu ermitteln. Die Expressionswerte wurden zum Pilzwachstum ins Verhältnis gesetzt und bilden die Expression relativ zur Pilzmasse. Aus diesem Kurvenverlauf kann eine transiente oder konstitutive Expression abgelesen werden (Abb. 14).

Es ist in Abb. 14C deutlich zu erkennen, dass die Graphen für *AKT* und *GPD* nahezu parallel zur Zeitachse verlaufen (bei beiden ist zum spätesten Zeitpunkt ein leichter Anstieg zu verzeichnen). Diese beiden Gene werden somit nahezu konstitutiv exprimiert (unter der Annahme einer konstitutiven Expression von Aktin in *H. vulgare*). Die Transkriptmenge von *UBI* steigt mit der Zeit der Infektion stark an und kann damit als konstitutiv exprimiertes Referenzgen ausgeschlossen werden.

Für die Expressionsanalysen ist nicht nur die Transkriptmenge des Referenzgens von Bedeutung sondern auch die Reproduzierbarkeit der Daten. Der Kurvenverlauf von *AKT* sieht sehr gut aus, aber die Primer produzierten ungünstigere Dissoziationskurven (einen höheren Anteil von Primer-Dimeren) in der *Real-Time*-PCR als die Primer für *GPD*. Deshalb wurde

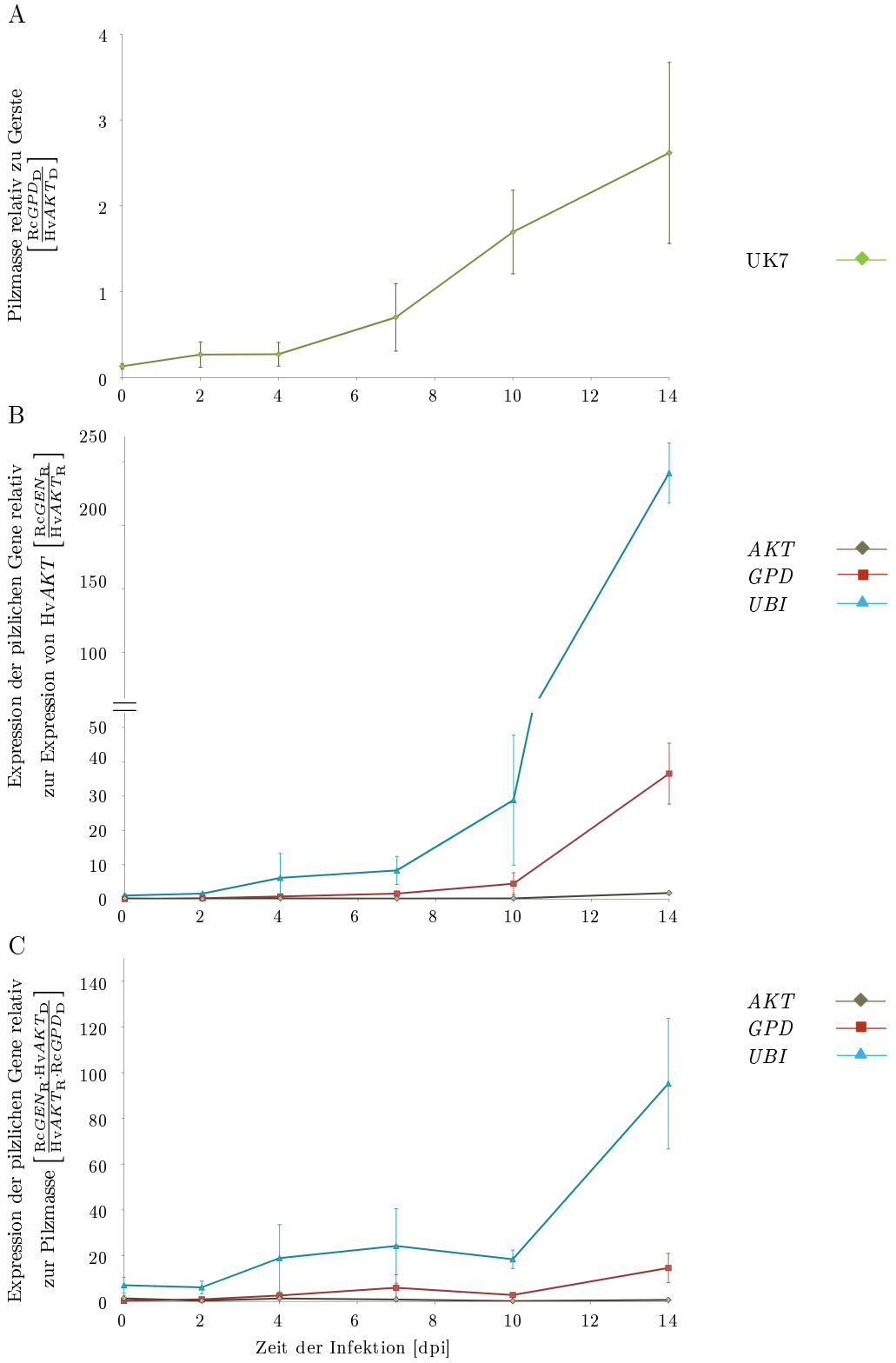

A
Pilzmasse relativ zu Gerste
$\left[\frac{\mathrm{Rc}GPD_{\mathrm{D}}}{\mathrm{Hv}AKT_{\mathrm{D}}}\right]$
UK7
B
Expression der pilzlichen Gene relativ
zur Expression von Hv*AKT* $\left[\frac{\mathrm{Rc}GEN_{\mathrm{R}}}{\mathrm{Hv}AKT_{\mathrm{R}}}\right]$
AKT
GPD
UBI
C
Expression der pilzlichen Gene relativ
zur Pilzmasse $\left[\frac{\mathrm{Rc}GEN_{\mathrm{R}}\cdot\mathrm{Hv}AKT_{\mathrm{D}}}{\mathrm{Hv}AKT_{\mathrm{R}}\cdot\mathrm{Rc}GPD_{\mathrm{D}}}\right]$
AKT
GPD
UBI
Zeit der Infektion [dpi]

Abbildung 14: Abbildung 14: Evaluierung der konstitutiven Expression von *AKT*, *GPD* und *UBI*

A - Dieses Diagramm zeigt das Wachstum von UK7 auf der Gerstensorte Ingrid. Hierfür wurde genomische DNA als Matrize der *real-time*-PCR verwendet. Die Gersten-DNA wurde mit Primer 107 und 108 für Hv*AKT* quantifiziert (115 bp). Die DNA-Menge des Pilzes wurde mit den Primer 78 und 79 für *GPD* (109 bp) ermittelt.
B - Die Teilabbildung beinhaltet die relative Expression der pilzlichen Gene *AKT*, *GPD* und *UBI* relativ zur Expression des Gerstengenes Hv*AKT*. Als Matrize für diese *real-time*-PCR diente cDNA. Hierfür wurden Primer 114 und 115 für *AKT* (160 bp) und Primer 112 und 113 für *UBI* (173 bp) genutzt. Die Primer für *GPD* entsprechen denen aus Teilabbildung A. Hv*AKT* wurde als Referenzgen für diese *real-time*-PCR verwendet (Primer 107 und 108, 115 bp).
C - Dieses Diagramm stellt die zusammenführende Kalkulation der Abb.en A und B dar. Dabei resultiert jeder Punkt aus der Dividende $\frac{\text{Wert}_A}{\text{Wert}_B}$. Hier kann die Expression relativ zum Pilzwachstum abgelesen werden. Eine Parallele zur Zeitachse bedeutet eine konstitutive Expression.
(n=3)

für die folgenden Expressionsanalysen *GPD* als Referenzgen genutzt.
Aus Material- und Zeitgründen wurde angenommen, dass die nahezu konstitutive Expression von *GPD* in dieser Interaktion (Ingrid und UK7) auch für andere Gerstensorten zutrifft (Atlas und Atlas 46).
Im Folgenden werden nun die Interaktionen des Gerstenpathogens *R. commune* mit den drei Gerstensorten Ingrid, Atlas und Atlas 46 beschrieben.

3.4.3 Phänotyp des *Rhynchosporium*-Isolats UK7 auf der Gerstensorte Ingrid

Die Gerstensorte Ingrid gilt als hoch suszeptibel gegenüber *R. commune*. Abb. 15 zeigt die Symptomentwicklung 14 Tage nach Inokulation (dpi) mit dem Isolat UK7. Die chlorotischen Bereiche mit nekrotischem Rand bildeten sich zwischen 10 und 14 dpi verstärkt an der Blattspitze zur Blattbasis hin aus.

A B



Abbildung 15: Abbildung 15: Symptombildung der Interaktion *H. vulgare* cv. Ingrid und *Rhynchosporium*-Isolat UK7

In A sind die Symptome der Pflanzen 14 Tage nach Inokulation zu sehen. B zeigt die mit 0,1% Tween20 besprühte Kontrollpflanzen.

Pilzwachstum während der Infektion der Gerstensorte Ingrid

Zur Bestimmung der Pilzbiomasse wurde die *real-time*-PCR unter Verwendung der genomischen DNA aus infizierten Pflanzen durchgeführt. Mit jeweils einer Reaktion wurde die Menge der Pflanzen- und die der Pilz-DNA bestimmt. Mit der Pflanzenmenge als Referenz konnte die Pilzmenge relativ zur Blattmasse kalkuliert werden (Abb. 16).

Auf der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid ist sehr deutlich das explosionsartige Wachstum von *R. commune* beginnend nach 3 dpi zu erkennen. Die Zunahme der Pilzmasse verlangsamt sich etwa 10 dpi, endet jedoch bis zum 21. Tag post Inokulation noch nicht in einem Plateau. Eine Analyse späterer Zeitpunkte war nicht mehr möglich, da die Isolierung genomischer DNA aus solch nekrotischem Gewebe kaum noch möglich war.

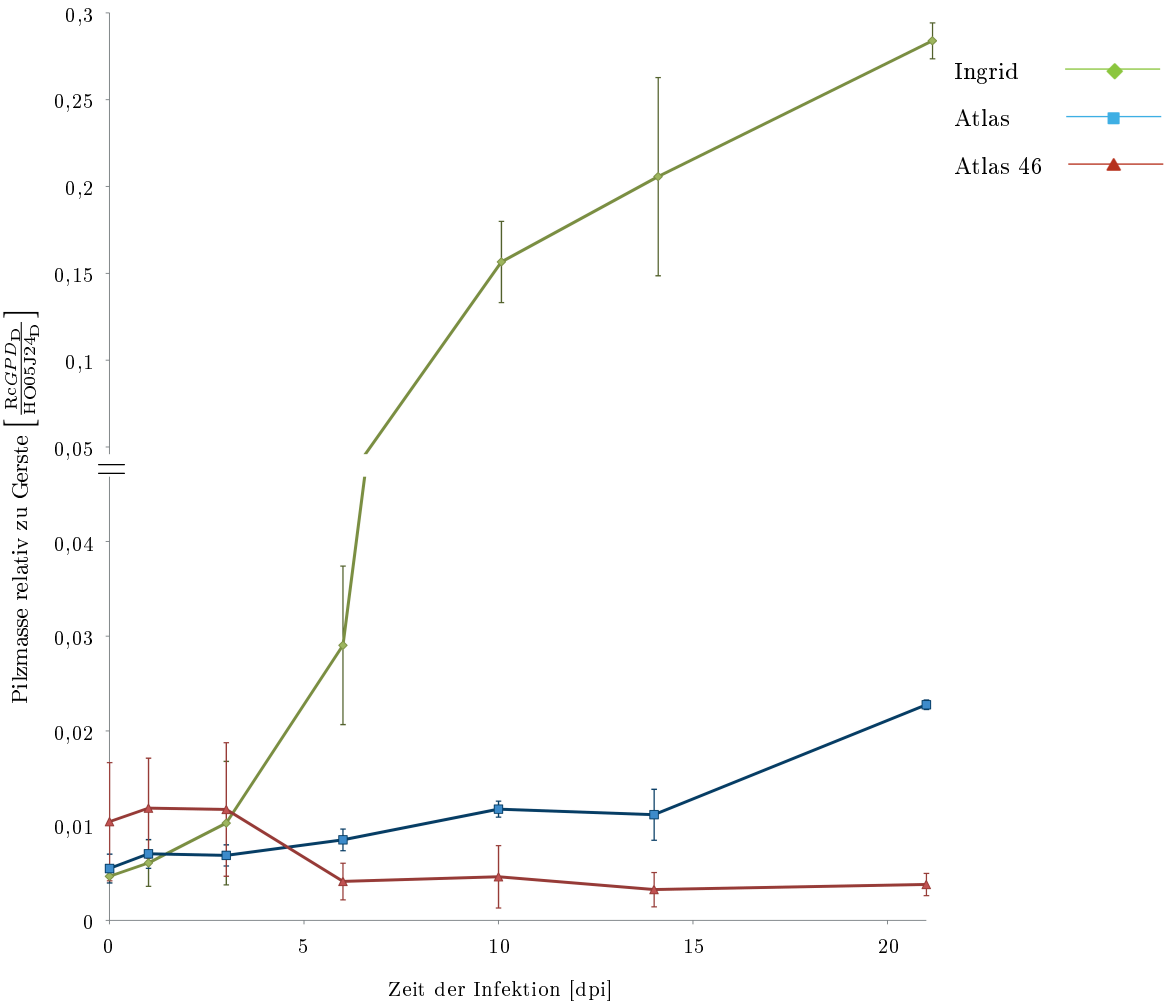


Abbildung 16: Abbildung 16: Wachstum von *R. commune* während der Infektion dreier unterschiedlicher Gerstensorten

Diese Abb. zeigt die Biomasse des *Rhynchosporium*-Isolates UK7 während der Infektion der Gerstensorten Ingrid, Atlas und Atlas 46. Die verschiedenen Pflanzensorten sind mit unterschiedlichen Farben markiert. Die Graphen entstanden nach *real-time*-PCR mit genomischer DNA als Matrize. Das Gerstengen HO05J24 (Akzessionsnummer: CD058235) wurde hierbei als Referenz gewählt: Primer 105 und 106 (114 bp). *R. commune* wurde mit den Primer 78 und 79 (109 bp) nachgewiesen (Rc*GPD*). Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl (2001). (n=3)

Aus den Mikroskopieaufnahmen (Abb. 17) ist ersichtlich, dass der starke Anstieg der Pilzbiomasse nach 3 dpi mit dem Penetrieren der Kutikula und dem Ausbilden der subkutikularen Hyphen gleichgesetzt werden kann. Zu dem Zeitpunkt der Stroma-Ausbildung nimmt ebenso die Pilzmasse weniger stark zu. Der leichte Anstieg der Pilzmasse zwischen 14 und 21 dpi kann mit dem weiteren Bilden und Auskeimen bereits exponierter Konidien zusammenhängen.

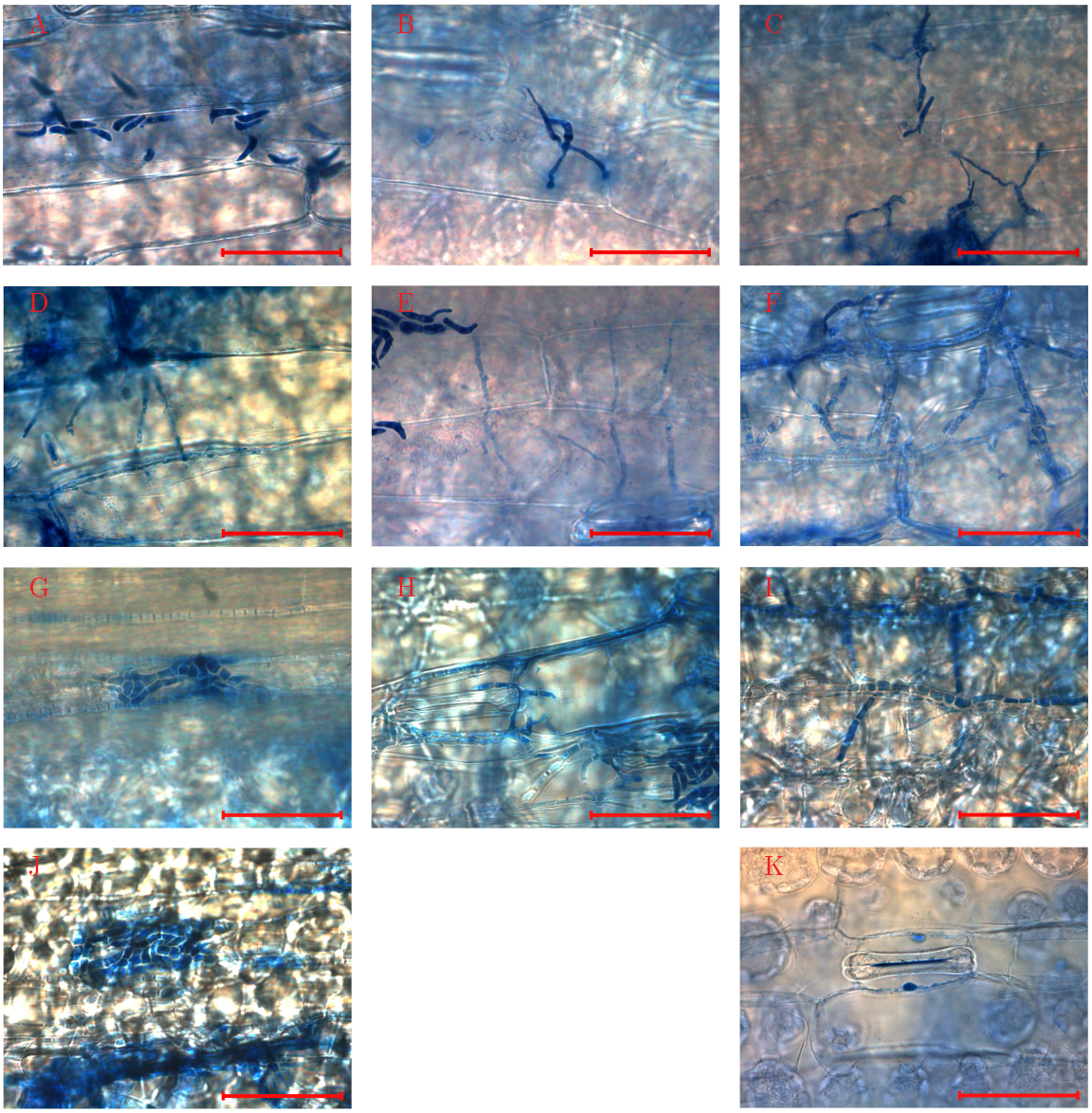


Abbildung 17: Abbildung 17: Entwicklung von *R. commune* während der Infektion der Gerstensorte Ingrid

Mikroskopie Trypan-Blau gefärbter Gerstenblätter (100 faches Objektiv): A) Konidien direkt nach Inokulation, B) Konidien mit Keimhyphen, an deren Enden sich Appressorium-ähnlicher Strukturen befinden (1 dpi), C und D) Keimhyphen penetrieren Kutikula und wachsen anschließend subkutikular über den antiklinen Zellwänden der Epidermiszellen (3 dpi), E) Leicht verzweigtes Hyphennetzwerk (6 dpi), F) Stark verzweigtes Hyphennetzwerk (10 dpi), G) Beginnende Stromabildung (10 dpi), H) Bildung neuer Konidien (10 dpi), I) Kurz septierte verdickte Hyphen mit Verzweigungen entlang der periklinen Zellwände (14 dpi), J) Stroma an nekrotischen Bereichen (21 dpi), K - uninfizierte Kontrolle
Der Maßstab entspricht 50 μm.

Expression *Rhynchosporium*-spezifischer Gene während der Infektion der Gerstensorte Ingrid

Mit Rc*GPD* als konstitutiv exprimiertem Referenzgen konnte die Transkriptmenge von Rc*RLP1* während der Interaktion von *R. commune* mit Gerste untersucht werden. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Expression weiterer Pilzgene bestimmt: Rc*PFP1* - kodiert einen möglichen Pathogenitätsfaktor (*putative function in pathogenicity*; S. Siersleben, unveröffentlicht), Rc*NIP1* und Rc*NIP2* - zwei Effektorgene (Wevelsiep *et al.*, 1991).

Die Expressionsmuster der vier Gene fallen sehr unterschiedlich aus (Abb. 18). Die Gene *RLP1* und *PFP1* zeigen eine nahezu konstitutive Expression. Diese stellt sich nach 24 Stunden zwischen einem und 10 % der Transkriptmenge von *GPD* ein. Kurz nach der Inokulation sind beide Gene stärker exprimiert (bei *RLP1* knapp 50 % und bei *PFP1* ca. 15 % der *GDP*-Expression). Im Vergleich zu den *NIP*-Genen und zu *GPD* sind die Gene *RLP1* und *PFP1* sehr schwach exprimiert. Die Transkriptlevel von *NIP1* und *NIP2* zeigen im Gegensatz zu *RLP1* einen transienten Verlauf mit einem Maximum 6 dpi von 100 % bzw. 170 % der Transkriptmenge von *GPD*.

Die Transkriptmengen der Gene *PFP1* und *RLP1* können Rückschlüsse auf niedrige Proteinkonzentrationen über die gesamte Infektionszeit zulassen. Proteine in niedrigen Konzentrationen können unter anderem regulatorische Funktionen ausführen. Wie für Effektorgene zu erwarten zeigen *NIP1* und *NIP2* hohe Expressionen in früher Pathogenesephase.

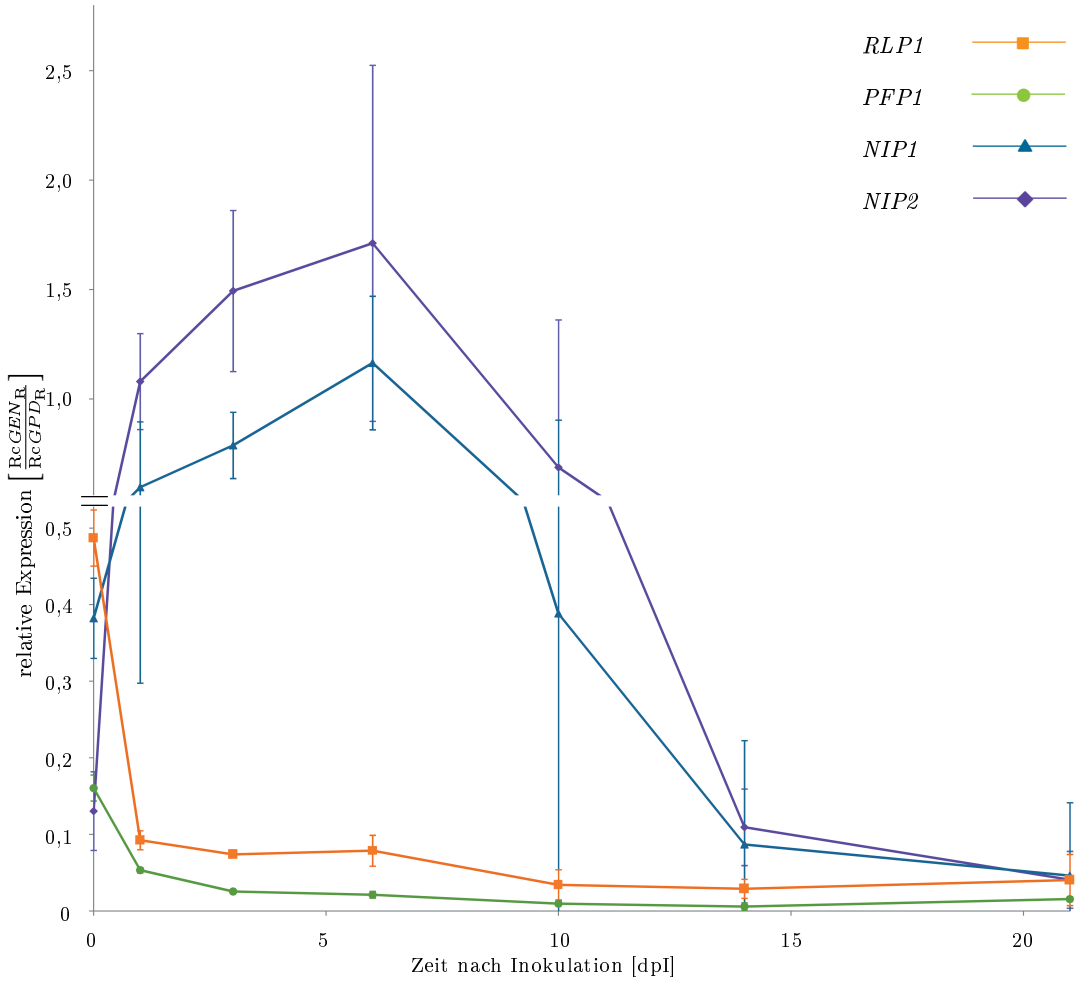


Abbildung 18: Abbildung 18: Expression von *RLP1*, *PFP1*, *NIP1* und *NIP2* während der Infektion der Gerstensorte Ingrid mit dem *Rhynchosporium*-Isolat UK7

Pflanzen der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid wurden mit dem Isolat UK7 von *R. commune* infiziert. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde die relative Transkriptmenge der Gene *RLP1*, *PFP1*, *NIP1* und *NIP2* mit *real-time*-PCR bestimmt. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet: Primer 28 und 109 (*RLP1*), Primer 110 und 111 (*PFP1*), Primer 118 und 119 (*NIP1*), Primer 116 und 117 (*NIP2*) und Primer 78 und 79 (*GPD*). In Ordinate (relative Expression) befindet sich an der Markierung (=) ein Umbruch im Maßstab.
(n=3)

3.4.4 Phänotyp des *Rhynchosporium*-Isolats UK7 auf der Gerstensorte Atlas

Die Gerstensorte Atlas ist eine mit moderater Suszeptibilität gegenüber *R. commune*. Die Abb. 19 zeigt die Symptome 21 Tage nach Inokulation mit dem Isolat UK7. Die chlorotischen und nekrotischen Symptome traten nicht großflächig auf wie bei der Infektion der Sorte Ingrid. Sie waren vielmehr auf kleinere Bereiche vorwiegend an den Blatträndern beschränkt.

A B

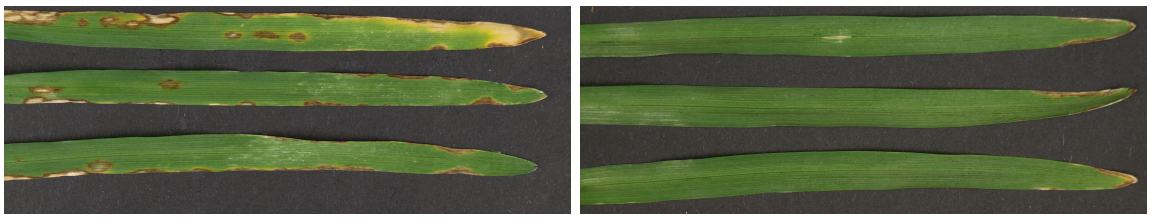


Abbildung 19: Abbildung 19: Symptombildung der Interaktion *H. vulgare* cv. Atlas und *Rhynchosporium*-Isolat UK7

In A sind die Symptome der Pflanzen 21 dpi zu sehen. B zeigt die mit 0,1% Tween20 besprühten Kontrollpflanzen.

Pilzwachstum während der Infektion von Atlas

Die relative Biomasse von *R. commune* wurde bei der Entwicklung von UK7 auf Atlas wie bei der Gerstensorte Ingrid bestimmt (Abb. 16). Im Unterschied zu Ingrid zeigt UK7 erst 14 Tage nach Inokulation von Atlas eine deutliche Zunahme der Pilzbiomasse. Eine explosionsartige Vermehrung wie auf Ingrid wurde in dem untersuchten Zeitraum nicht beobachtet. Möglich ist jedoch, dass ein starkes Wachstum des Pilzes erst später erfolgt. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass Atlas die Ausbreitung von UK7 unterdrückt.

Durch die mikroskopische Analyse der Interaktion von UK7 und Atlas konnte im Vergleich zu Ingrid eine verzögerte Entwicklung des Pilzes beobachtet werden (Abb. 20). Während auf Atlas 10 dpi subkutikular nur leicht verweigte Hyphen gefunden wurden, bildete der Pilz auf Ingrid bereits das Stroma aus. Erst 14 dpi wurde bei der Interaktion mit Atlas eine intensivere Verbreitung der Hyphen beobachtet (Abb. 20), was sich in der stärkeren Steigerung der Pilzbiomasse widerspiegelt (Abb. 16).

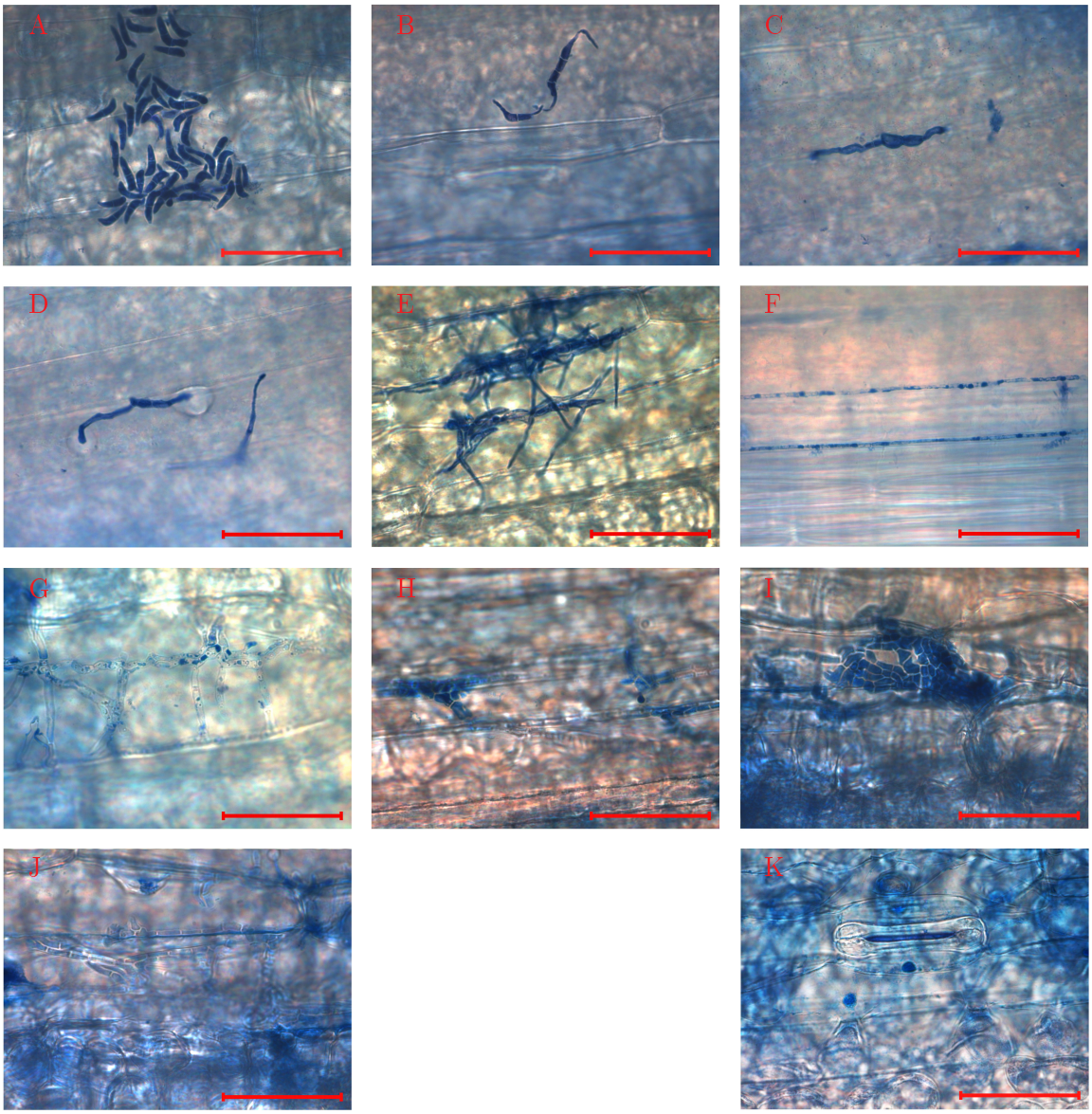


Abbildung 20: Abbildung 20: Entwicklung von *R. commune* während der Infektion der Gerstensorte Atlas

Mikroskopie Trypan-Blau gefärbter Gerstenblätter (100 faches Objektiv): A) Konidien direkt nach Inokulation, B) Konidien mit Keimhyphen (1 dpi), C) Konidien mit Keimhyphen, an deren Enden sich Appressorium-ähnlicher Strukturen befinden (3 dpi), D und E) Konidien mit Keimhyphen, an deren Enden sich Appressorium-ähnlicher Strukturen befinden, Hyphen penetrieren die Kutikula (6 dpi), F) Kaum verzweigtes subkutikulares Hyphenwachstum (10 dpi), G) Verzweigtes Hyphennetzwerk (14 dpi), H) An wenigen Stellen beginnende Stromabildung (14 dpi), I und J) Stromabildung hauptsächlich an Rändern der nekrotischen Bereiche (21 dpi), I) Kurz septierte verdickte Hyphen mit Verzweigungen entlang der periklinen Zellwände (14 dpi), J) Stroma an nekrotischen Bereichen (21 dpi), K - uninfizierte Kontrolle
Der Maßstab entspricht 50 μm.

Expression *Rhynchosporium*-spezifischer Gene während der Infektion von Atlas

Beim Vergleich der Infektion von Ingrid und Atlas konnte kaum Unterschied im Expressionsmuster von *RLP1*, *PFP1* und *NIP1* verzeichnet werden (Abb. 21). Lediglich die erhöhte Transkriptmenge von *RLP1* zu Beginn der Infektion von Ingrid gibt es auf Atlas nicht. Die ähnliche Expression von *RLP1* in der Infektion beider suszeptiblen Gerstensorten lässt die Vermutung zu, dass noch keine Bedingung gefunden wurde, bei der eine höhere Proteinmenge für den Pilz von Nutzen ist.

Das Expressionsmuster von *NIP2* zeigt den größten Unterschied der untersuchten Gene zur Interaktion von UK7 und Ingrid. Der zeitliche Verlauf der *NIP2*-Expression ist ähnlich geblieben. Die Transkriptmenge sank aber deutlich, sodass das Maximum (bei 6 dpi) 25 % der Transkriptmenge von *GPD* nicht übersteigt (Abb. 21). Ein möglicher Grund für den großen Unterschied der Expression von *NIP2* kann in der erhöhten basalen Resistenz der Gerstensorte Atlas liegen. Anscheinend unterdrückt die Pflanze die Etablierung des Infektionsschemas von *R. commune* bereits wenige Stunden post Inokulation

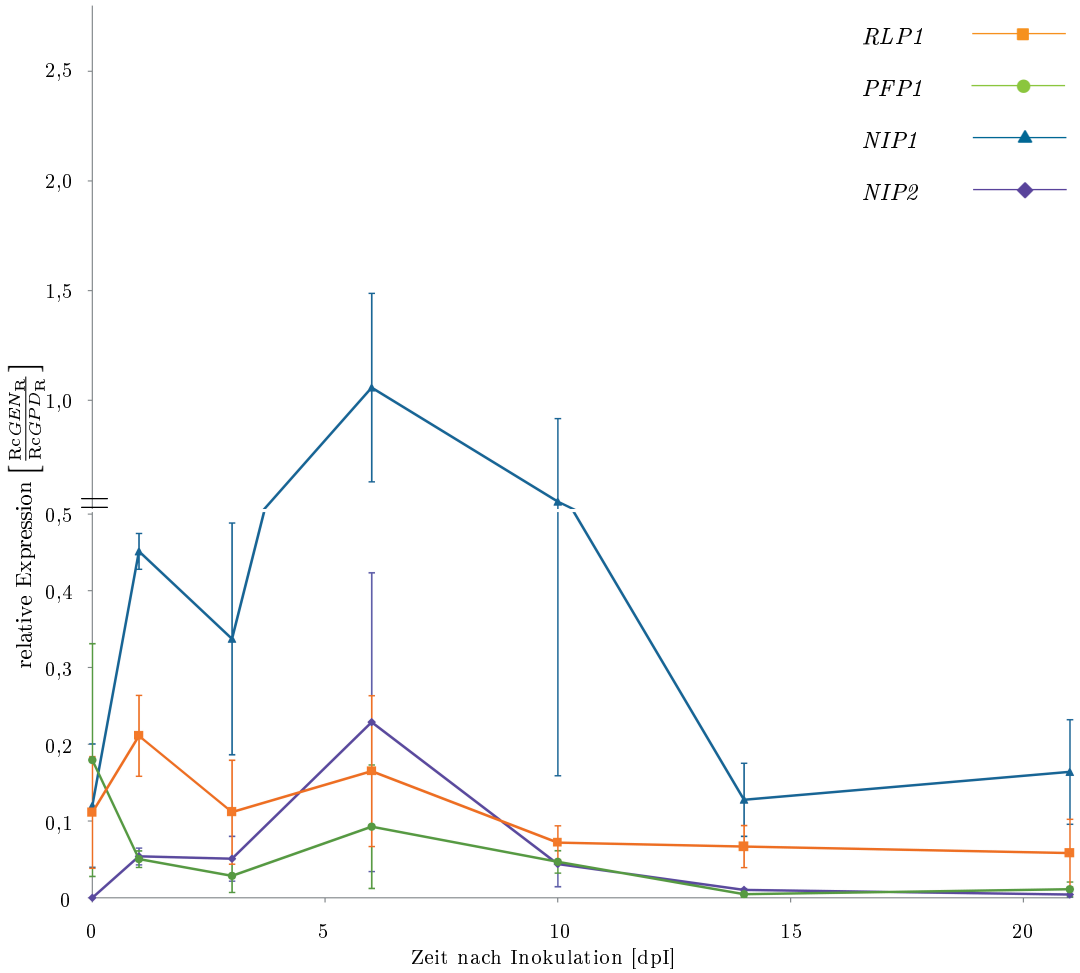


Abbildung 21: Abbildung 21: Expression von *RLP1*, *PFP1*, *NIP1* und *NIP2* während der Infektion der Gerstensorte Atlas mit dem *Rhynchosporium*-Isolat UK7

Pflanzen der suszeptiblen Gerstensorte Atlas wurden mit dem Isolat UK7 infiziert. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde die relative Transkriptmenge der Gene *RLP1*, *PFP1*, *NIP1* und *NIP2* *via real-time*-PCR bestimmt. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet: Primer 28 und 109 (*RLP1*), Primer 110 und 111 (*PFP1*), Primer 118 und 119 (*NIP1*), Primer 116 und 117 (*NIP2*) und Primer 78 und 79 (*GPD*). In der Ordinate (relative Expression) befindet sich an der Markierung (=) ein Umbruch im Maßstab.
(n=3)

3.4.5 Infektion der Gerstensorte Atlas 46 mit dem *Rhynchosporium*-Isolat UK7

Atlas 46 ist nahezu isogen zu Atlas. Diese Sorten unterscheiden sich fast ausschließlich im Vorhandensein des Resistenzgens *Rrs1* (Habgood & Hayes, 1971; Ali *et al.*, 1976). Das ist auch der Grund für die Resistenz von Atlas 46 gegenüber dem Isolat UK7, welches das entsprechende Avirulenzgen *NIP1* besitzt (Rohe *et al.*, 1995). Es sind keine *Rhynchosporium*-spezifischen Symptome auf den Primärblätter zu erkennen (Abb. 22).

A B

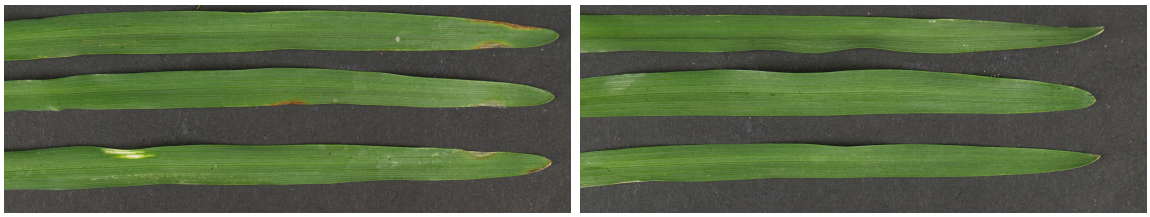


Abbildung 22: Abbildung 22: Symptombildung der Interaktion *H. vulgare* cv. Atlas 46 und *Rhynchosporium*-Isolat UK7

In A sind die Symptome der Pflanzen 21 Tage nach der Inokulation zu sehen. B zeigt die Kontrollpflanzen mit 0,1% Tween20 besprüht.

Entwicklung des Pilzes auf Atlas 46

Abb. 23 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der Interaktion von UK7 und Atlas 46 über den zeitlichen Verlauf von 21 Tagen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Konidien auskeimen und Appressorien-ähnliche Strukturen ausbilden, doch gelingt es den pilzlichen Hyphen augenscheinlich nicht die Kutikula zu durchdringen und sich subkutikular zu verbreiten. Das resultiert in der Resistenz der Sorte Atlas 46 gegenüber UK7 und spiegelt die nahezu konstante Pilzbiomasse über den gesamten Infektionszeitraum wider (Abb. 16).

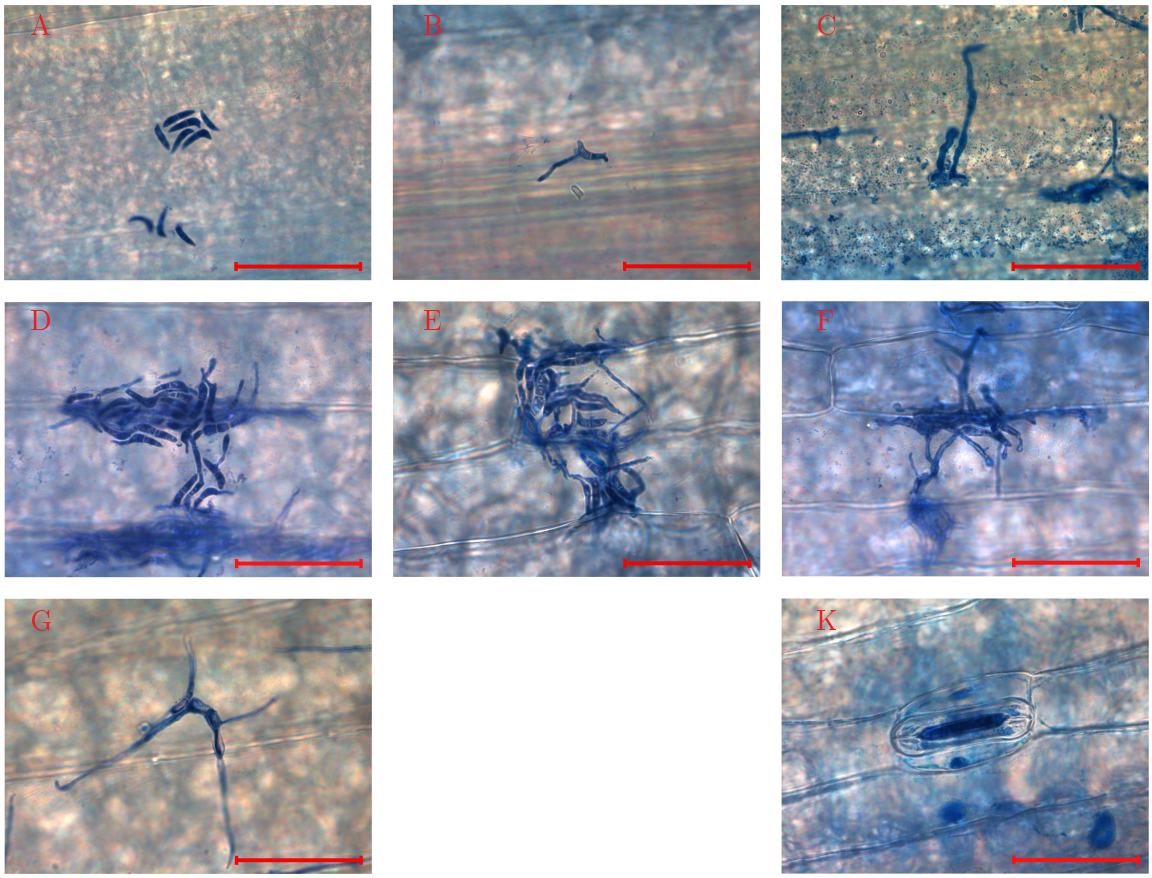


Abbildung 23: Abbildung 23: Entwicklung von *R. commune* während der Infektion der Gerstensorte Atlas 46

Mikroskopie Trypan-Blau gefärbter Gerstenblätter (100 faches Objektiv): A) Konidien direkt nach Inokulation, B-G) Konidien mit Keimhyphen, bei C, D und F sind Appressorien-ähnliche Strukturen zu erkennen (B - 1 dpi, C - 3 dpi, D - 6 dpi, E - 10 dpi, F - 14 dpi, G - 21 dpi), K - uninfizierte Kontrolle
Der Maßstab entspricht 50 μm.

Expressionsanalyse *Rhynchosporium*-spezifischer Gene während der Infektion von Atlas 46

Die Expressionsmuster der *RLP1* und *PFP1* sind im Vergleich zur Interaktion von UK7 und Atlas unverändert (Abb: 24). Das Transkript von *NIP2* bei der Infektion von Atlas 46 war im Gegensatz zu den bisher untersuchten Interaktionen kaum noch nachweisbar.

Die Expression des *NIP1*-Gens erreicht bereits nach einem Tag das Maximum von etwa 180 % des Expressionsniveaus von *GPD*, sinkt danach rapide ab und bleibt bis 14 dpi konstant knapp über 50 % des *GPD*-Expressionsniveaus (Abb. 24). Danach sinkt die Expression erneut, jedoch langsamer. Das Expressionslevel von *NIP1* ist im Vergleich zu denen der anderen untersuchten Gene sehr hoch. Mit der hohen Expression von *NIP1* versucht der Pilz anscheinend, die Resistenz der Gerste zu durchbrechen. NIP1 wird wahrscheinlich bereits zu Beginn der Infektion benötigt. Die relativ hohe Expression sechs bis 14 Tage nach Infektion kann durch eine verzögerte Auskeimung der Konidien (Lehnackers & Knogge, 1990) erklärt werden.

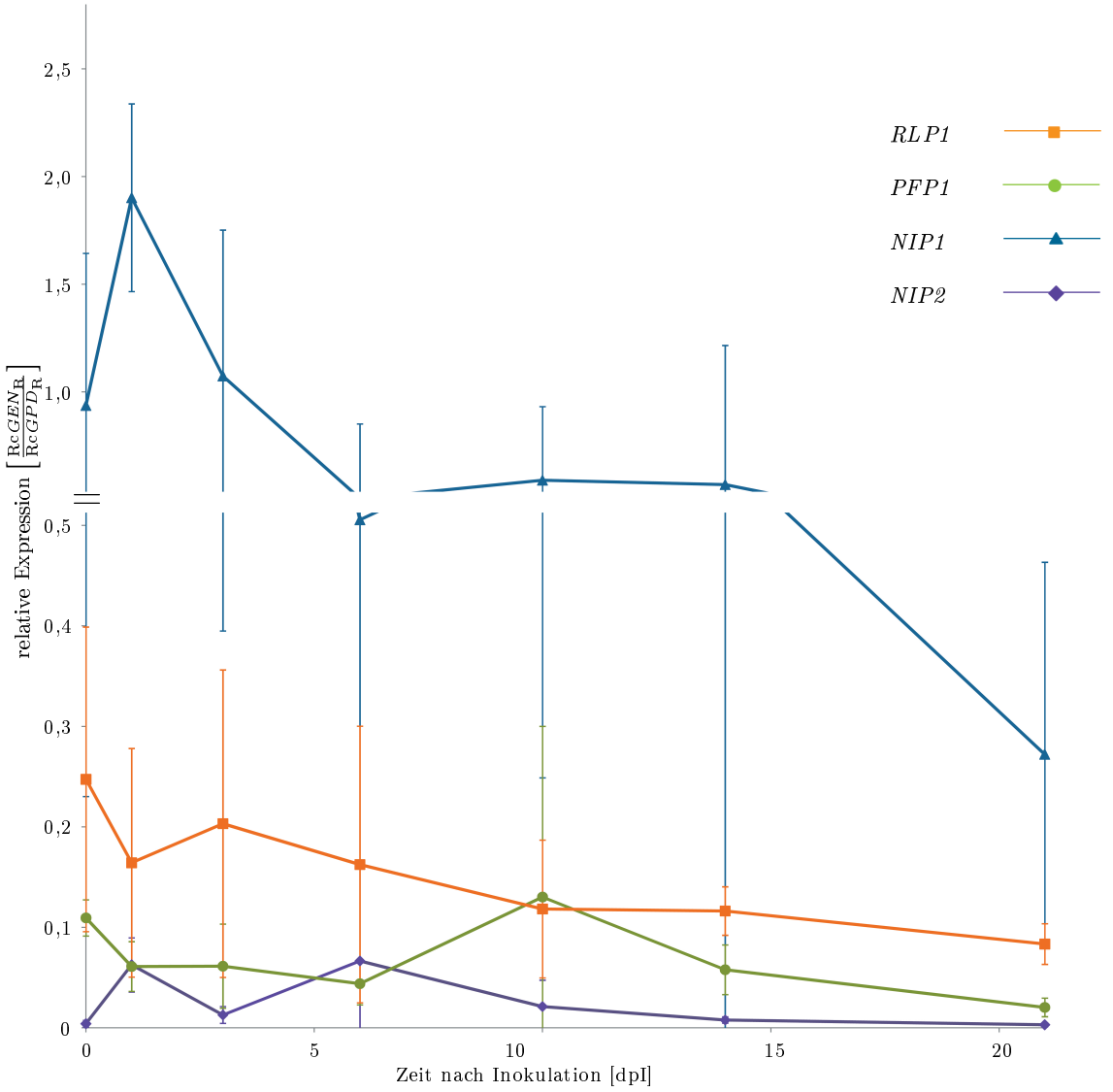


Abbildung 24: Abbildung 24: Expression von *RLP1*, *PFP1*, *NIP1* und *NIP2* während der Infektion der Gerstensorte Atlas 46 mit dem *Rhynchosporium*-Isolat UK7

Pflanzen der resistenten Gerstensorte Atlas 46 wurden mit dem Isolat UK7 infiziert. Zu den dargestellten Zeitpunkten wurde mit *real-time*-PCR die relative Transkriptmenge der Gene *RLP1*, *PFP1*, *NIP1* und *NIP2* bestimmt. Für die PCR wurden folgende Primer verwendet: Primer 28 und 109 (*RLP1*), Primer 110 und 111 (*PFP1*), Primer 118 und 119 (*NIP1*), Primer 116 und 117 (*NIP2*) und Primer 78 und 79 (*GPD*). In der Achse der relativen Expression befindet sich an der Markierung (=) ein Umbruch im Maßstab.
(n=3)

3.4.6 *In silico*-Analyse von Promotorelementen

Die zuvor beschriebenen Quantifizierungsexperimente zeigten eine schwache aber konstitutive Expression der *RLP1 in planta*. Eine Expression in *ex planta*-gewachsener Kulturen wurde nicht quantifiziert, aber die Transkriptmengen sind augenscheinlich ähnlich der von *GPD* (Abb. 9 und 13).
Die Expression eines Gens wird von dessen Promotor gesteuert. Bestimmte Sequenzmotive meist im 5'-Bereich der Transkriptsequenz werden von Transkriptionsfaktoren gebunden, wodurch die Transkription inhibiert, ermöglicht oder beschleunigt wird. Gut untersuchte Sequenzmotive sind zum Beispiel die TATA-Box, der Initiator und das *downstream*-Promotorelement (DPE). Diese werden oft zusammen mit den Motiven BRE (TFIIB *recognition element*) und MTE (*motif ten element*) als Kernpromotor bezeichnet, welcher aber selten alle fünf Sequenzmotive aufzeigt (Juven-Gershon & Kadonaga, 2010). Von diesen Elementen konnten eine TATA-Box, fünf Sequenzen eines Initiators und 10 Sequenzen des DPE im Promotorbereich der *RLP1 in silico* erkannt werden (Abb. 25). Etwa 24 % der menschlichen Gene werden unter anderem durch eine TATA-Box gesteuert. Deren Promotoren enthalten fast ausschließlich einen erhöhten A-T-Gehalt und gehören zu den stark regulierten Promotoren (Yang *et al.*, 2007). Der untersuchte Promotorbereich der *RLP1* weist einen A-T-Gehalt von 58,4 % auf. Die Tatsache, dass der Promotor eine TATA-Box und einen höheren A-T-Gehalt enthält, weist auf ein stark reguliertes Gen hin und nicht auf eine konstitutive Expression wie sie experimentell in den untersuchten Bedingungen nachgewiesen wurde (3.4).
Ein weiteres sehr gut untersuchtes Promotorelement ist die CCAAT-Box. Diese konnte ebenfalls im Promotor der *RLP1* identifiziert werden (Position -208, Abb. 25). Die CCAAT-Box befindet sich meist 50 bis 200 Nukleotide in 5'-Richtung des Transkriptionsstarts (Bucher, 1990), was auf die Position der erkannten CCAAT-Box im *RLP1*-Promotor zutrifft. Die Expression CCAAT-Box-enthaltender Gene wird unter anderem bei oxidativen Stress in *S. cerevisiae* und *Schizzosaccharomyces pombe* reguliert (Thön *et al.*, 2010). Die CCAAT-Box ist jedoch nicht das einzige Promotormotiv, welches im Promotorbereich der *RLP1 in silico* identifiziert wurde und in anderen Eukaryoten durch das Einwirken reaktiver Sauerstoffderivate durch Transkriptionsfaktoren aktiviert wird. Der Promotor weist zusätzlich eine Erkennungssequenz von NF-κB-Transkriptionsfaktoren und vier Sequenzmotive Zink-bindender $Zn(II)_2Cys_6$-Proteine auf (Abb. 25). NF-κB wird in Eukaryoten über verschiedene Reaktionswege je nach Konzentration der reaktiven Sauerstoffderivate aktiviert und bindet anschließend an das κB-Motiv, wodurch die Expression spezifischer Gene induziert wird (Gloire *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). Die $Zn(II)_2Cys_6$-Transkriptionsfaktoren binden an sehr variable und doch für den jeweiligen Stoffwechselweg spezifische Sequenzmotive. Zwei der vier identifizierten Elemente entsprechen exakt den konservierten Bindungssequenzen im Promotor der alternativen Oxidase (*AOD*) mehrerer Pilze (Chae *et al.*, 2007). Die Expression der *AOD1* in

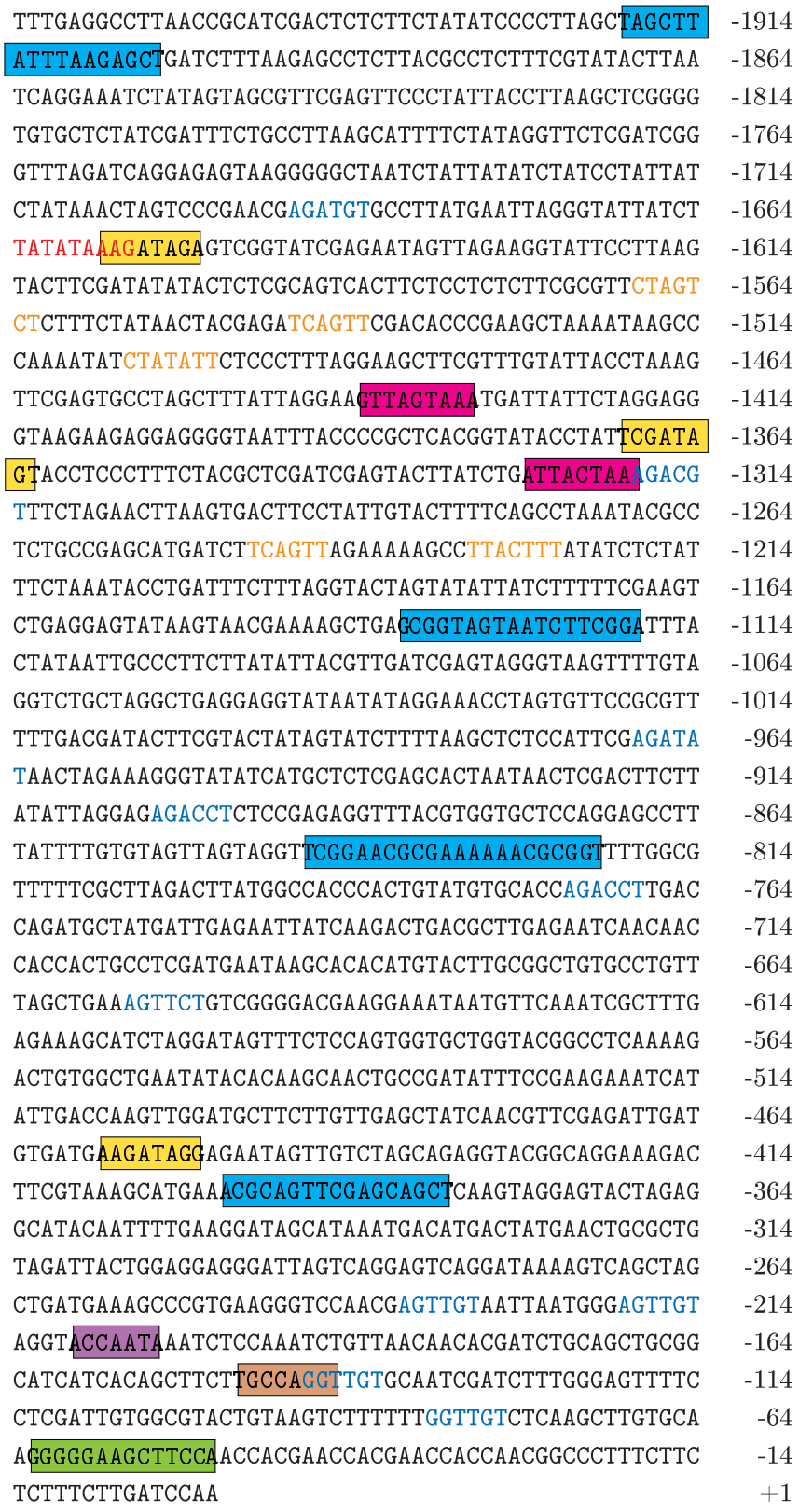


Abbildung 25: Abbildung 25: Sequenzmotive im Promotorbereich der Rc*RLP1*

In dieser Abb. ist die bekannte Sequenz in 5'-Richtung vom Transkriptionsstart beginnend mit dem ersten Nukleotid (A) der in 3.3 nachgewiesenen cDNA-Sequenz dargestellt. Für den Kernpromotor typische Elemente sind farbig geschrieben: TATA-Box - rot, Initiator - orange, DPE - blau. Alle anderen möglichen Motive, die mit bereits bekannten Promotorelementen übereinstimmen, wurden farbig hinterlegt: CCAAT-Box - violett, κB-Motiv - grün, GATA-Box - gelb, $Zn(II)_2Cys_6$-Protein-Erkennungsmotiv - blau, PacC-Bindungsmotiv - braun, ARE-Motiv - pink.

Neurospora crassa wird durch mitochondrial erzeugtes Wasserstoffperoxid maximiert (Chae *et al.*, 2007). Andere Bindungsmotive für $Zn(II)_2Cys_6$-Transkriptionsfaktoren, ähnlich den zwei identifizierten, spielen unter anderem in *A. nidulans* bei der sexuellen Vermehrung auf Glukose-armen Medium eine Rolle (Vienken *et al.*, 2005). Ein weiteres Promotorelement, das ARE-Motiv, konnte zweimal im Promotor der *RLP1* identifiziert werden. Dieses wird beispielsweise in Hefen nach oxidativen Stress von Transkriptionsfaktoren gebunden, was eine Expressionssteigerung der betroffenen Gene zur Folge hat (Kuge & Jones, 1994).
Weiterhin konnten drei Sequenzmotive ähnlich der GATA-Box und ein Sequenzabschnitt, der dem Bindungsmotiv des Transkriptionsfaktors PacC entspricht, identifiziert werden (Abb. 25). Die GATA-Box ist in die Nitratreduktion von Ascomyceten involviert (Rastogi *et al.*, 1997). Zusätzlich kann durch Induktion spezifischer Gene mit einer GATA-Box im Promotor in *S. cerevisiae* der *mating*-Typ gewechselt werden (Scazzocchio, 2000). Gene mit dem PacC-Bindemotiv werden durch den pH-Wert der Umgebung in Pilzen wie *A. nidulans* stark reguliert (Tilburn *et al.*, 1995).
Diese Analyse des Promotorbereiches der Rc*RLP1* deutet darauf hin, dass das Gen transient unter spezifischen Bedingungen reguliert wird, und nicht auf eine schwache konstitutive Expression (3.4.1). Die untersuchten Bedingungen führten nicht zu einer hohen Expression. Mehrere unterschiedliche Promotorelemente, die identisch zu solchen in Genen anderer Pilze sind, lassen eine mögliche Funktion des Proteins in der Abwehr reaktiver Sauerstoffderivate oder in der Erhaltung des Ionenhaushaltes bzw. pH-Wertes zu. Eine Funktion in der Pathogenabwehr wurde für die identifizierten Promotorelemente jedoch noch nicht beschrieben.

3.5 Deletion der Rc*RLP1*

Ein hilfreiches Mittel zur funktionellen Charakterisierung eines Gens ist die Analyse von Deletionsmutanten. Für die Deletion eines Gens wird ein Deletionskonstrukt bestehend aus drei Fragmenten generiert. Die äußeren sind homolog zu den das Gen flankierenden Sequenzen. Das mittlere Fragment kodiert einen Selektionsmarker, mit dem die Selektion der Transformanden möglich ist. Nachdem das Deletionskonstrukt in den Pilz transferriert wurde, wird die DNA entweder ektopisch an verschiedene Stellen im Genom integriert oder es findet durch die Sequenzhomologien des Konstrukts mit den zu deletierenden Genabschnitt eine homolge Rekombination statt. Das Resultat ist die Deletionsmutante.
Die Transformation von *R. commune* ist über die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation (ATMT) und über die Transformation von Protoplasten möglich. Für die Deletion der *RLP1* war bereits ein binäres Deletionskonstrukt (*RLP1* $_{\text{Del}}$-pPZPtk1, Abb. 26A, hergestellt von Dr. R. Horbach). Deshalb wurde zunächst die ATMT genutzt.

3.5.1 Das Thymidinkinase-Deletionssystem nach Gardiner & Howlett (2004)

Das Plasmid für die Deletion *RLP1* $_{\text{Del}}$-pPZPtk1 enthält zwei Thymidinkinasegene. Bei der ATMT von *R. commune* wird der komplette Bereich zwischen rechter und linker *border*-Sequenz in den Kern der Pilzzelle transferiert. Dort kann die T-DNA ektopisch in das Genom integrieren oder über Sequenzhomologien einen Teil des Genoms ersetzen. Sequenzhomologien bestehen bei dem Plasmid *RLP1* $_{\text{Del}}$-pPZPtk1 im Deletionskonstrukt in Form der 5'-UTR bzw. des 3'-Endes des zweiten Exons der *RLP1* mit 3'-UTR. Dadurch soll das erste sowie ein Teil des zweiten Exons der *RLP1* durch das Hygromyzin-B-Phosphotransferase-Gen ersetzt werden (homologe Rekombination). Die Thymidinkinasesequenzen werden nur bei einer ektopischen Integration ins Genom eingebaut. Transformanden mit ektopischer Integration produzieren somit das funktionelle Thymidinkinase-Enzym.
In Säugern sorgen Thymidinkinasen für die Umsetzung von Desoxythymidin zu Desoxythymidinmonophosphat und sind so für den Aufbau der DNA zuständig (Grivell & Jackson, 1968). In manchen Pilzen wie *N. crassa* ist jedoch keine Thymidinkinase kodiert (Grivell & Jackson, 1968). Deshalb kann das Thymindinkinasegen dazu genutzt werden, die Suche nach einer Deletionsmutante zu optimieren. Dabei werden die Transformanden Thymidinanalogen Substanzen wie Trifluorothymidin (TFT), Fluorodesoxyuridin (FdU) oder Ganciclovir ausgesetzt. Diese Substanzen sind nicht toxisch. Die Thymidinkinase phosphoryliert jedoch diese Thymidin-Analoga, welche daraufhin die Thymidilatsynthase hemmen (TFT und FdU) oder den Abbruch der DNA-Synthese hervorrufen (Ganciclovir, Daher *et al.*, 1990). Pilztransformanden, die die Thymidinkinase exprimieren, werden in Gegenwart solcher Thymidin-Analoga in ihrem Wachstum behindert.

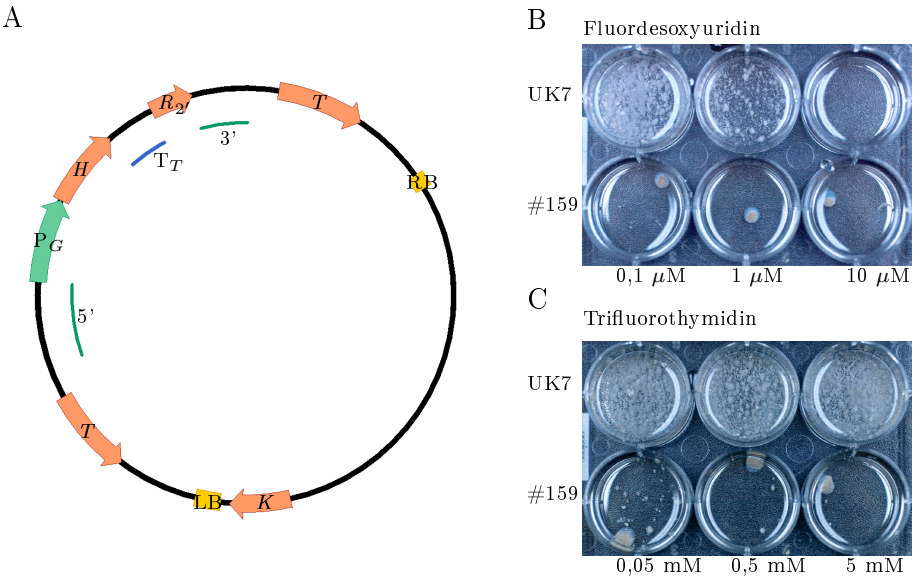


Abbildung 26: Abbildung 26: Etablierung des Thymidinkinase-Systems zur Vereinfachung der Transformanden-Selektion

A) Schematische Darstellung des Deletionsplasmids $RLP1_{\text{Del}}$-pPZPtk1: P_G - P_{AnGPD}, *H* - *HPT*, T_T - T_{AnTRPC}, 5' - 5'-UTR von Rc*RLP1*, 3' - 3'-UTR von Rc*RLP1*, $R_{2'}$ - Teil des 2. Exon der Rc*RLP1*, LB - linke *border*-Sequenz, RB - rechte *border*-Sequenz, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, *T* - Thymidinkinase-Gen des Herpes-simplex-Virus
B und C) Untersuchung des Wachstums in Medien mit Substrat-Analoga der Thymidinkinase: In diesen Abb.en ist das Wachstum von Pilzkolonien im Medium FRIES No. 3 mit steigender Konzentration des Substrates Fluorodesoxyuridin (B) und Trifluorothymidin (C) abgebildet. Für den Test wurden das Wildtyp-Isolat UK7 sowie 3 Transformanden aus der Transformation von *R. commune* mit $RLP1_{\text{Del}}$-pPZPtk1 überprüft (lediglich eine Transformande abgebildet). Es wurden wie auch später für die Selektion mit Pilz bewachsene Agar-Blöcke in das Medium überführt, sodass die genaue Pilzmenge nicht bestimmt werden konnte. Die Bilder entstanden 12 Tage nach Animpfen des Mediums.

Nach der Selektion durch Hygromyzin wurden alle Transformanden einer zweiten Selektion mit einem Thymidin-Analogen unterzogen. Zunächst sollten jedoch Wachstumstests zeigen, welche Substanz für *R. commune* am geeignetsten ist. Ganciclovir wurde aus diesem Test ausgeschlossen, da es bei *N. crassa* ab einer Konzentration von 0,4 mM erst eine Reduktion der Koloniengröße zeigt. Das Wachstum des Pilzes wird aber bei 4 mM noch nicht vollständig inhibiert (Sachs *et al.*, 1997). TFT und FdU wurden in den Konzentrationen analog zu Gardiner & Howlett (2004) eingesetzt (Abb. 26B). Dabei zeigte TFT bei einer Konzentration von 0,05 mM noch vereinzelte Sporenkeimung. Im Gegensatz dazu ist das Wachstum von Transformanden mit Thymidinkinase bereits bei einer Zugabe von 0,1 µM FdU vollständig gehemmt. Deshalb wurde FdU für die weitere Selektion verwendet.

	Gesamtzahl der Transformanden	Anteil [%]
Transformation	ca. 2550 / $5{\cdot}10^6$ Sporen	0,051 (± 0,003)
Hygromyzin-Effizienz	450 / 454	98,978 (± 0,780)
FdU-Vorselektion	454 / 2698	16,700 (± 3,842)
FdU-Effizienz	1 / 454	0,320 (± 0,555)

Tabelle 9: Tabelle 8: Kalkulation der Effizienzen der Transformation von *R. commune* mit dem Deletionskonstrukt *RLP1* $_{\text{Del}}$-pPZPtk1 (FdU - Fluorodesoxyuridin)
(n = 3)

Insgesamt wurden drei unabhängige Transformationen durchgeführt, bei denen zusammen 2698 Transformanden vereinzelt wurden. Diese wurden zunächst auf Lima-Bohnen-Agar mit Fluorodesoxyuridin selektiert. Von den 454 wachsenden Kolonien wurde aus kleinen mit Myzel bewachsenen Agarblöcken genomische DNA isoliert und *via* PCR auf homologe Rekombination untersucht. Die Anwendung der PCR zur Identifizierung der homologen Rekombination ist in Abschnitt 3.5.2 näher beschrieben. Die DNA-Isolierung schloss aufgrund des hohen Umsatzes einen Aufschluss des Pilzmaterials mit der Kugelmühle (große Scherkräfte, die die genomische DNA zum Teil zerstören) ein. Deshalb wurden die positiven Transformanden in FRIES Medium No. 03 angezogen und erneut mittels PCR untersucht. Dieses Mal erfolgte der Aufschluss des Materials im Mörser, wodurch die genomische DNA intakt blieb. Insgesamt konnte nur eine Transformande mit homologer Rekombination identifiziert werden.
Betrachtet man nun die Effizienz der Selektionen und der Deletion (Tab. 8), kann man bei der Selektion auf Hygromyzin-Resistenz durch die Hygromyzin-B-Phosphotransferase von einer nahezu 100 % Effizienz ausgehen. Bei der Selektion durch Fluorodesoxyuridin konnten über 80 % der Transformanden als negativ für homologe Rekombination ausgeschlossen werden. Trotzdem liegt die Effizienz des Thymidinkinase-Systems in diesem Fall bei unter 1 %. Die hohe Zahl an falsch positiven Transformanden kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann die Integration des Deletionskonstrukts in einen Bereich der genomischen DNA geschehen, der nahezu inaktiv ist und somit kaum exprimiert wird. Zum anderen kann eine Integration über sehr kurze Homologien eintreten (Schiestl *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2007), wodurch eventuell keines oder nur eines der Thymidinkinase-Gene integriert wird und somit die Expression der Thymidinkinase gar nicht oder kaum erfolgt. Die Effizienz des Thymidinkinase-Selektionssystems kann demnach auch von dem zu deletierenden DNA-Abschnitt bzw. der Größe des genutzten Plasmids abhängen.

3.5.2 Identifizierung eines homologen Rekombinationsereignisses

Alle Transformanden, die Wachstum auf FdU-haltigen Agar bis spätestens sieben Tagen nach Umsetzen der Kolonien zeigten, wurden *via* PCR auf die Integrationsart untersucht.

Dafür waren zwei PCR notwendig. Bei der ersten wurden die Primer zur Amplifikation der Hygromyzin-B-Phosphotransferase genutzt. Die PCR eines Teils der Transformanden ist in Abb. 27A dargestellt. Bei vier Transformanden (#32, #469, #578 und #686) konnte auch nach wiederholter PCR kein Amplifikationsprodukt wie beim untransformierten Wildtyp UK7 detektiert werden. Das könnte auf die schnelle Art der Isolierung der DNA zurückzuführen sein, da es hierbei oft zu Schäden an der DNA kommt. Es könnte aber auch an der Stabilität des Antibiotikums Hygromyzin liegen. Die Firma ROTH empfiehlt aufgrund der Instabilität des Antibiotikums einen Wechsel des Mediums nach 3 Tagen. Eine erneute Zugabe von Antibiotikum birgt die Gefahr von Kontaminationen und wurde deswegen nicht durchgeführt.

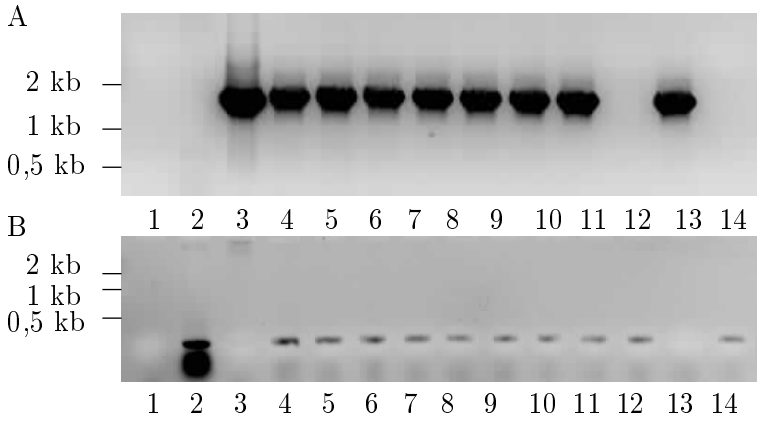


Abbildung 27: Abbildung 27: Analyse der Transformanden *via* PCR

A) Zum Nachweis intakter DNA und der Transformation wurde diese PCR mit den Primer 70 und 71 durchgeführt. Es entstand bei den positiv transformierten Kolonien sowie beim Deletionskonstrukt ein Fragment (2017 bp) des Hygromyzin-B-Phosphotransferase-Genes (*HPT*).
T_A = 55°C t_s = 2 min 30 sec
B) Zur Bestimmung der Integrationsart wurden die Primer 24 und 30 für diese PCR genutzt. Das Fragment (220 bp) entspricht dem Wildtyp-Allel. Bei der Kontrolle mit Deletionsplasmid als Matrize und bei der Transformande #744 wurde dieses Fragment nicht amplifiziert. Mit der extrahierten DNA der Transformande #744 mit beiden Aufschlussmethoden konnte dieses Fragment nicht detektiert werden.
T_A = 55°C t_s = 30 sec, Matrizen-DNA: 1 - keine, 2 - UK7, 3 - *RLP1* $_{\text{Del}}$-pPZPtk1, 4 - #1, 5 - #90, 6 - #159, 7 - #202, 8 - #277, 9 - #446, 10 - #501, 11 - #525, 12 - #578, 13 - #744, 14 - #686

In der zweiten PCR wurden die Transformanden auf die Integration überprüft. Die Primer binden zwischen den zwei *Kpn* I-Restriktionserkennungsstellen des Rc*RLP1*-Gens und demzufolge im durch die Resistenzkassette auszutauschenden Teil (Abb. 28A). Wird bei einer Transformande dieses Fragment nicht generiert, kann es sich um ein homologes Rekombinationsereignis handeln. Unter den 454 verbliebenen Transformanden konnte nur bei Transformande #744 dieses Fragment nicht generiert werden (Abb. 27B).
Mit der genomischen DNA der Mutante #744 wurde anschließend eine DNA-DNA-Hybridisierung durchgeführt, um die homologe Rekombination zu bestätigen. Die DNA wurde

mit der Restriktionsendonuklease *Xba* I behandelt. Das Wildtyp-Gen liegt auf einem *Xba*-I-Fragment von 3031 bp Länge (Abb. 28A). Im Falle einer homologen Rekombination wurde ein 675 bp großes DNA-Fragment gegen das 2766 bp großes Fragment der Hygromyzin-Resistenzkassette ausgetauscht. Dadurch enthält der durch die *Xba*-I-Erkennungssequenz flankierte Bereich 5122 bp. Als Kontrolle wurde das Deletionsplasmid mit *Xba* I behandelt, das ein ebenso großes Fragment aufweist. Als Sonde wurde ein Bereich des Rc*RLP1*-Gens verwendet, welches durch homologe Rekombination im Genom erhalten geblieben ist. In Abb. 28B ist das Ergebnis der DNA-DNA-Hybridisierung dargestellt. Die markierten Fragmente entsprechen der erwarteten Größe, wodurch die homologe Rekombination bestätigt ist.

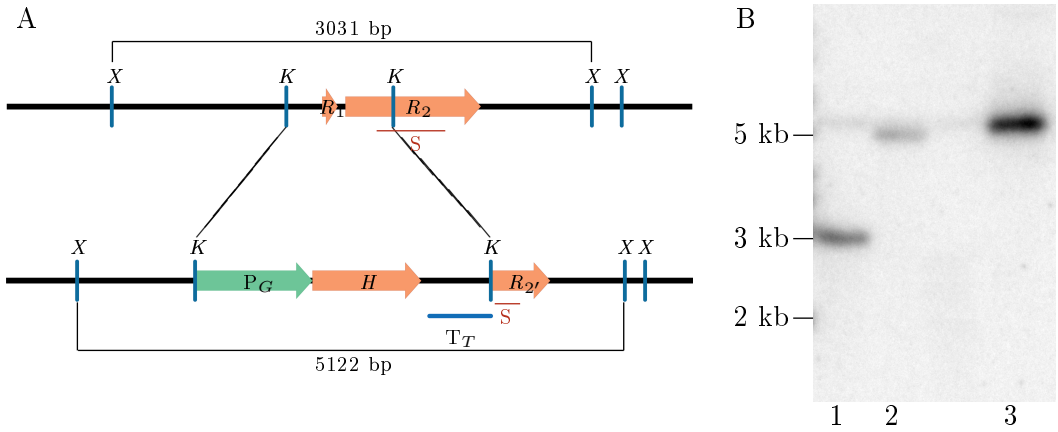


Abbildung 28: Abbildung 28: Bestätigung der homologen Rekombination in der Transformande #744

A) Schematische Abb. des Wildtyp-Allels und der Mutantensequenz: Im oberen Teil ist das Wildtyp-Allel mit den Restriktionserkennungsstellen von *Xba* I dargestellt. Die Restriktionsendonuklease generiert ein 3031 bp großes Fragment. Darunter ist die Situation nach einer homologen Rekombination abgebildet. Das Wildtyp-Fragment, welches durch die *Kpn* I-Erkennungssequenzen flankiert wird, wurde durch die Hygromyzin-B-Resistenzkassette ersetzt. Dadurch vergrößert sich das durch das Restriktionsenzym *Xba* I generierte Fragment auf 5122 bp. Die Sonde bindet bei beiden Allelen am Ende des zweiten Exons der *RLP1*, wie in dem Schema in rot dargestellt. R_1 - Exon 1 der *RLP1*, R_2 - Exon 2 der *RLP1*, $R_{2'}$ - 3'-Bereich des Exon 2 der *RLP1*, P_G - Promoter des Genes An*GDP*, *H* - *HPT*, T_T - Terminator des Genes An*TRPC*, *K* - Restriktionserkennungsstelle von *Kpn* I, *X* - Restriktionserkennungsstelle von *Xba* I, S - Sonde)
B) Diese Abb. zeigt das Ergebnis der DNA-DNA-Hybridisierung. Es sind die Fragmente des Wildtyp-Allels und nach homologer Rekombination zu erkennen.
Genutzte DNA: 1 - UK7, 2 - #744, 3 - *RLP1* $_{\text{Del}}$-pPZPtk1

3.5.3 Expression von *RLP1* in der Deletionsmutante #744

Wie in Abb. 28A dargestellt, wurde zur Herstellung der Deletionsmutante die genuin vorkommenden *Kpn*-I-Restriktionserkennungsstellen verwendet. Dadurch enthält die Transformande #744 einen großen Teil des zweiten Exons der *RLP1*. Nach *in silico*-Analyse der Sequenz besteht die Möglichkeit eines offenen Leserahmens, der fünf Transmembrandomä-

nen des Rhomboid-ähnlichen Proteins enthält. Daher könnte ein Protein in der Transformande entstehen, das der RLP1 bis auf den N-terminal deletierten Bereich identisch ist. Aufgrund eines fehlenden Antikörpers, der die RLP1 als Epitop erkennt, sollte eine Analyse der Transkriptmenge von *RLP1* in der Transformande #744 Klarheit über die Möglichkeit eines N-terminal verkürzten Proteins geben. Dazu wurde cDNA der Transformande #744 für eine Multiplex-PCR eingesetzt. Es wurden Primer für jeweils ein Fragment der *GPD* und der *RLP1* genutzt. In Abb. 29 ist das Resultat dieser PCR zu sehen. Es wurden drei biologische Wiederholungen durchgeführt. Trotzdem ist mit der cDNA von der Transformande #744 deutlich eine Expression bei der *RLP1* zu erkennen. Demzufolge entsteht ein Transkript der verkürzten *RLP1*. Das N-terminal verkürzte Protein wird höchstwahrscheinlich nicht korrekt subzellulär transportiert. Zusätzlich lassen sich keine Aussagen über die Orientierung in der Membran sowie die Aktivität treffen. Deshalb sollte eine neue Mutante generiert werden, in der der komplette offene Leserahmen der *RLP1* deletiert ist. Die Transformande 744 wird aufgrund der Expression in allen weiteren Experimenten als UK7-RLP_{trunc} (trunc für engl. *truncated*) bezeichnet.

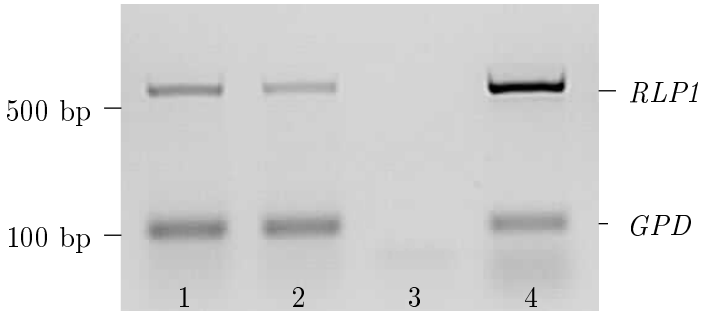


Abbildung 29: Abbildung 29: *RLP1*-Transkriptanalyse in der Mutante UK7-$RLP1_{trunc}$

Für die Untersuchung der Expression des *RLP1*-Genes in der Transformande #744 (UK7-$RLP1_{trunc}$) wurde eine Multiplex-PCR mit cDNA (von 14 Tage alten in FRIES No. 03 gewachsenen Myzel) als Matrize genutzt. Das Kontrollgen *GPD* wurde mit den Primer 78 und 79 (109 bp) amplifiziert und zeigt die intakte cDNA. Für den Nachweis der *RLP1* wurden die Primer 10 und 13 (558 bp)verwendet.
T_A = 57℃, t_s = 30 sec, Matrizen-DNA: 1 - cDNA von UK7, 2 - cDNA der Mutante #744, 3 - keine, 4 - genomische DNA von UK7

3.5.4 Generierung der Deletionsmutante UK7Δ*RLP1*

Für die zweite homologe Rekombination wurde die Methode der *fusion*-PCR mit anschließendem Transfer des Deletionskonstrukts in *R. commune* über Protoplasten gewählt. Der Grund hierfür war der Wegfall der zeitaufwendigen Konstruktion des Deletionsplasmids für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation. Die *fusion*-PCR hingegen kann in zwei Schritten vervollständigt und das Amplifikationsprodukt in ausreichender Menge direkt für die

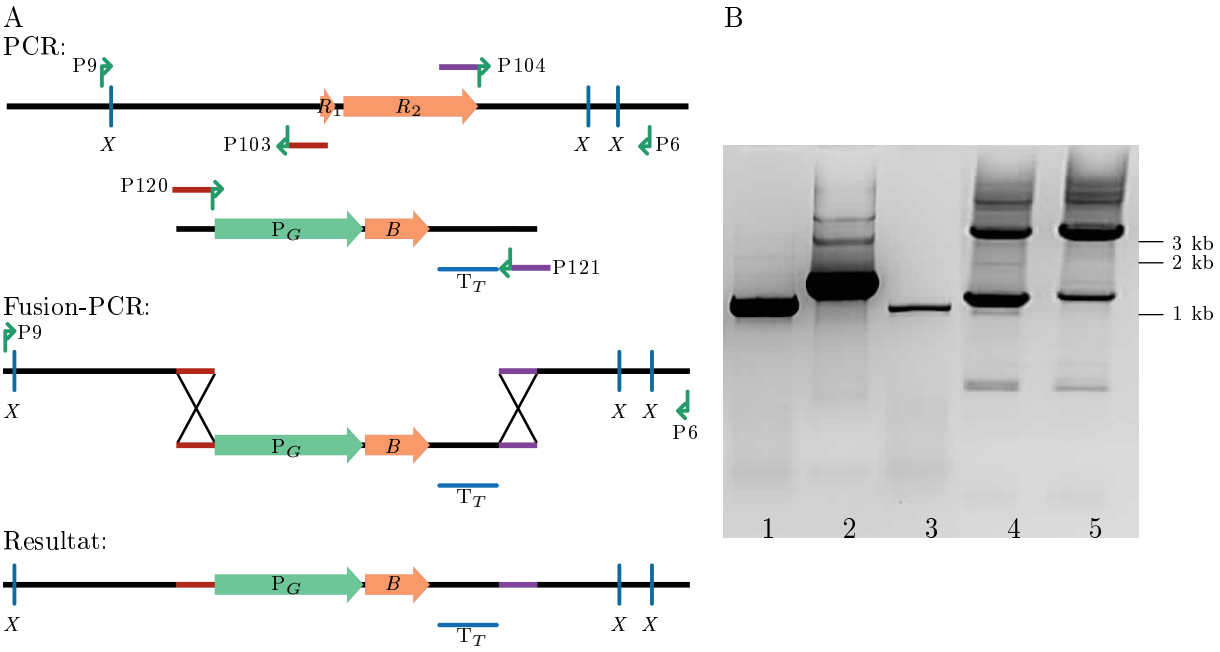


Abbildung 30: Abbildung 30: Deletionskonstrukt *via fusion*-PCR

A) Schematische Abb. der *fusion*-PCR: Die *Rhynchosporium*-spezifischen Fragmente, mit den Primer 9 und 103 und Primer 104 und 6 amplifiziert, flankieren den kompletten Leserahmen des *RLP1*-Genes. Mit dem Primer 120 und 121 wurde die Phleomyzin-Resistenzkassette für die *fusion*-PCR bereitgestellt. Die Primer 103 und 120 sowie die Primer 104 und 121 enthalten komplementäre Sequenzen, wodurch die Anlagerung der PCR-Fragmente in der anschließenden *fusion*-PCR ermöglicht wird. Diese Sequenzen sind in diesem Schema rot bzw. violett dargestellt. Durch die Primer 9 und 6 kann mit den vorher beschriebenen Fragmenten als Matrize das komplette Deletionskonstrukt erhalten werden, indem sich die einzelnen PCR-Fragmente während der *fusion*-PCR ähnlich den Primer an einander lagern. R_1 - Exon 1 der *RLP1*, R_2 - Exon 2 der *RLP1*, P_G - Promoter des Genes An*GDP*, *B* - Phleomyzinresistenzkassette, T_T - Terminator des Genes An*TRPC*, *X* - Restriktionserkennungsstelle von *Xba* I
B) Ergebnis der *fusion*-PCR: 1 - Primer 9 und 103 mit genomischer DNA des Isolates UK7 als Matrize (1220 bp), 2 - Primer 120 und 121 mit dem Plasmid pAB8-1 als Matrize (1672 bp), 3 - Primer 104 und 6 mit genomischer DNA des Isolates UK7 als Matrize (1119 bp), 4 und 5 - *fusion*-PCR mit Primer 9 und 6 und den PCR-Fragmenten der Spuren 1-3 in zwei unterschiedlichen Verhältnissen zur Phleomyzin-Resistenzkassette (1:1:1 und 1:3:1, 3972 bp), T_A - 57°C t_s - bei 1-3 2 min und bei 4 und 5 4,5 min

Transformation von Protoplasten eingesetzt werden.

Für die *fusion*-PCR sind im ersten Schritt drei einzelne PCR notwendig (Abb. 30A). Zwei Amplifikationsprodukte enthalten die Sequenzen, die den offenen Leserahmen der *RLP1* im Genom von *R. commune* flankieren. Das dritte Fragment enthält die Resistenzkassette für Phleomyzin. Die Primer, mit denen die Fragmente verbunden werden sollen, wurden in Richtung des anderen Fragmentes mit einer spezifischen Sequenz verlängert (Abb. 30A). Im zweiten Schritt ist die Fusion der Fragmente möglich. Hierbei lagern sich während der Primer-Anlagerungsphase die drei Fragmente an den verlängerten komplementären Sequenzen zusammen. Das gesamte Fusionskonstrukt kann in dieser PCR mit den zwei äußeren Primern komplett durch die Anlagerung der drei Fragmente amplifiziert werden. Abb. 30B zeigt die erfolgreiche Umsetzung dieser Methode. Bei der Amplifizierung des Fusionskonstruktes

werden sehr oft Fragmente unterschiedlicher Länge sichtbar. Das Fragment der erwarteten Größe wurde extrahiert und erneut vervielfältigt. Das durch *fusion*-PCR erhaltene Produkt wurde durch Sequenzierung verifiziert.
Pro Transformation von Protoplasten wurden 20 μg des Fusionskonstruktes verwendet. Insgesamt wurden wie bei der zuvor beschriebenen homologen Rekombination drei unabhängige Transformationen durchgeführt. Da die Ausbeute an Transformanden bei der Transformation von Protoplasten geringer ist als bei der ATMT, wurden alle erhaltenen Transformanden vereinzelt und analysiert. Bei dem Transfer des Fusionskonstruktes stand kein zweites Selektionssystem zur Verfügung, weshalb alle Transformanden als mögliche Deletionen geprüft werden mussten. Insgesamt wurden 363 Transformanden vereinzelt. Die Analyse der Transformanden wurde *via* PCR durchgeführt. Zunächst wurden die Primer 14 und 17 zur Identifizierung der Deletion verwendet. Diese Primer binden im offenen Leserahmen der *RLP1* und sollten daher bei einer homologen Rekombination zu keinem Amplifikationsprodukt führen. Dies war nur bei der DNA aus drei Transformanden (#1-49, #1-52 und #3-33) der Fall. Zum positiven Nachweis der homologen Rekombination wurden drei weitere PCR durchgeführt. Zunächst wurde eine PCR zur Amplifikation des *NIP3*-Genes durchgeführt. Diese zeigte, dass die genutzte genomische DNA intakt war. Die zweite PCR konnte die Anwesenheit des Phleomyzin-Resistenzgens bestätigen. Die dritte PCR wurde nicht erneut mit dem Primer 14 und 17 durchgeführt, sondern mit den Primer 16 und 12. Dieses Primer-Paar bindet außerhalb des offenen Leserahmens der *RLP1*. Bei genomischer DNA des Wildtyps generieren diese Primer ein Fragment von 1878 bp Länge. Im Falle einer homologen Rekombination vergrößert sich das Fragment aufgrund der Resistenzkassette auf 2352 bp. Bei den Transformanden #1-49, #1-52 und #3-33 konnte mit dieser PCR kein Amplifikationsprodukt erhalten werden (Abb. 31). Die Abwesenheit des 1878 bp-Fragments bestätigt die Deletion der *RLP1* in den Mutanten. Möglicherweise konnte aufgrund der gewählten Synthesezeit das größere Fragment nicht generiert werden. Bei der Transformande #2-45, bei welcher zuvor bereits die ektopischer Integration nachgewiesen werden konnte, wurde das Wildtyp-Fragment wie bei UK7 amplifiziert. Die Transformanden #1-49, #1-52 und #3-33 werden von hier an als UK7Δ*RLP1* bezeichnet. Für die weiteren Experimente wurde aus Zeitgründen nur #3-33 als Deletionsmutante weiter analysiert.

3.5.5 Überprüfung der *RLP1*-Expression in der Deletionsmutante UK7Δ*RLP1*

Wie bei der Transformande UK7-$RLP1_{trunc}$ wurde bei der Deletionsmutante UK7Δ*RLP1* die Expression des *RLP1*-Genes in drei unabhängigen Experimenten überprüft. Dies geschah wiederum mit der Methode der Multiplex-PCR, wie in 3.5.3 beschrieben. Das Ergebnis ist in Abb. 32 dargestellt und stimmt mit allen Wiederholungen überein. Es ist zu erkennen, dass in UK7 und UK7-$RLP1_{trunc}$ das Fragment der *RLP1* amplifiziert werden konnte. In der cDNA der UK7Δ*RLP1*-Mutante konnte dagegen kein *RLP1*-Transkript nachgewiesen

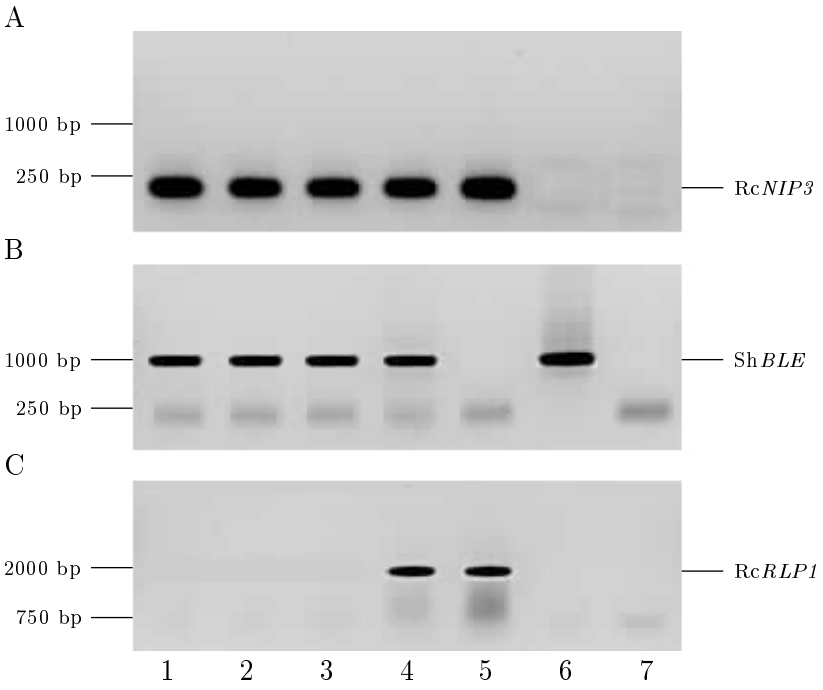


Abbildung 31: Abbildung 31: Nachweis der Deletion in den Transformanden #1-49, #1-52 und #3-33

A) Zur Amplifikation des Rc*NIP3*-Genes wurden die Primer 122 und 123 (128 bp) genutzt.
B) Zum Nachweis der Transformation wurde eine PCR mit Primer 47 und 124 (977 bp) durchgeführt. Diese amplifiziert einen Teil der Phleomyzin-Resistenzkassette (Sh*BLE*).
C) Die Primer 16 und 12 amplifizieren beim Wildtyp UK7 ein 1878 bp großes Fragment der Rc*RLP1*. Im Falle einer Deletion ist dieses 2352 bp groß.
Verwendete Matrize: 1 - genomische DNA von #1-49, 2 - genomische DNA von #1-52, 3 - genomische DNA von #3-33, 4 - genomische DNA von #2-45, 5 - genomische DNA von UK7, 6 - Fragment der Fusion-PCR, 7 - Wasser, T_A - 55°C t_s - 90 sec

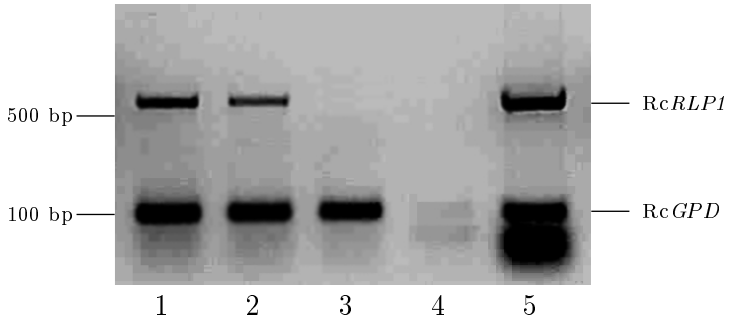


Abbildung 32: Abbildung 32: Rc*RLP1*-Expression in UK7Δ*RLP1*

Diese Multiplex-PCR wurde mit cDNA von 14 d alten Myzelkulturen (Medium: FRIES No.3) als Matrize durchgeführt. Als Referenzgen wurde Rc*GPD* mit den Primer 78 und 79 (109 bp) amplifiziert. Das Fragment der Rc*RLP1* entstand durch die Primer 10 und 13 (558 bp). Das Verhältnis der Primer betrug 1:1:2:2 (Primer 78:79:10:13).
T_A = 57°C, t_s = 30 sec, 1 - cDNA von UK7, 2 - cDNA von UK7-$RLP1_{trunc}$, 3 - cDNA von UK7Δ*RLP1*, 4 - Wasserkontrolle, 5 - genomische DNA von UK7

werden, was aufgrund der Deletion erwartet wurde.

3.6 Phänotypanalyse von UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1*

3.6.1 Wachstum von UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* *in planta*

Zur Überprüfung der Frage, ob die Insertion im Promotorbereich die Apathogenität der Mutante YH4.5 auslöste (Yuill, 2008), erfolgte die Charakterisierung der Deletionsmutanten UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* *in planta*. Die Symptome der Inokulation der drei Gerstensorten Ingrid, Atlas und Atlas 46 sind in Abb. 33 dokumentiert.

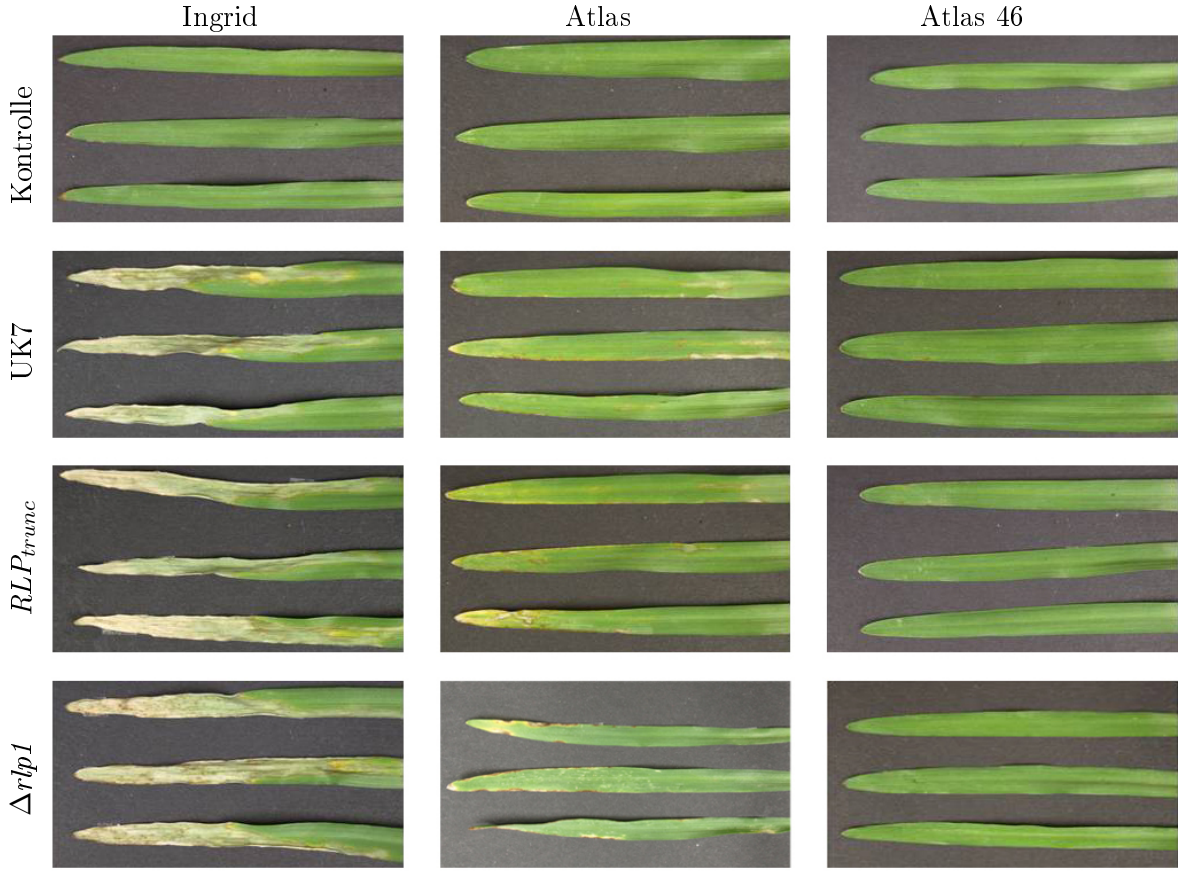


Abbildung 33: Abbildung 33: Inokulation der Gerstensorten Ingrid, Atlas und Atlas 46 mit UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1*

Es wurden 10^6 Sporen pro Primärblatt ausgebracht und nach 14 (bei Ingrid) bzw. 21 Tagen (bei Atlas und Atlas 46) nach Inokulation fotografiert. Drei Wiederholungen ergaben die gleichen Symptome. (n=3)

Die Symptomentwicklung auf den Primärblättern von Ingrid und Atlas wiesen keine Unterschiede zwischen UK7 und den beiden Mutanten auf. Durch die Inokulation der Gerstensorte Atlas 46 konnte gezeigt werden, dass die Genommutationen in UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* keinen Einfluss auf die Resistenz der Gerstensorte haben. Es wurden keine Symptome auf den Blättern von Atlas 46 gefunden.

Da bisher keine Korrelation zwischen Symptomgröße und Pilzwachstum nachgewiesen wurde, ist es möglich, dass der Verlust des *RLP1*-Gens trotz der Wildtyp-ähnlichen Symptomentwicklung das Wachstum des Pilzes *in planta* beeinträchtigen bzw. verändern kann. Aus diesem Grund wurden infizierte Primärblätter der Sorte Ingrid mit Trypanblau gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht (Abb. 35-37). Die Entwicklung des Wildtyp-Isolates UK7 wurde bereits in Abschnitt 3.4.3 beschrieben und entspricht der Entwicklung von UK7 in diesem Experiment (Abb. 35):

- Keimung nach 24 Stunden nach Inokulation
- Penetration der Kutikula circa 2 - 4 dpi
- Wachstum der Hyphen zwischen Kutikula und Epidermis und späteres Bilden von Netzwerken
- Stromaentwicklung etwa 10 - 14 dpi

Ebenso wurden jeweils fünf Blätter zur Isolierung genomischer DNA für die Bestimmung der Pilzbiomasse *via real-time*-PCR geerntet. Da die Mikroskopie keinen Unterschied zwischen UK7, UK7-$RLP1_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* aufzeigte, wurde die *real-time*-PCR nur mit UK7 und UK7-$RLP1_{trunc}$ durchgeführt (Abb. 34). Es ist zu erkennen, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Wachstum der beiden Pilzstämme UK7 und UK7-$RLP1_{trunc}$ gibt. Aufgrund der Mikroskopiebilder kann angenommen werden, dass UK7Δ*RLP1* sich in seiner Entwicklung wie UK7-$RLP1_{trunc}$ verhält.
Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist, dass die *RLP1* keinen Einfluss auf die Pathogenität oder Virulenz von *R. commune* auf Gerste hat.

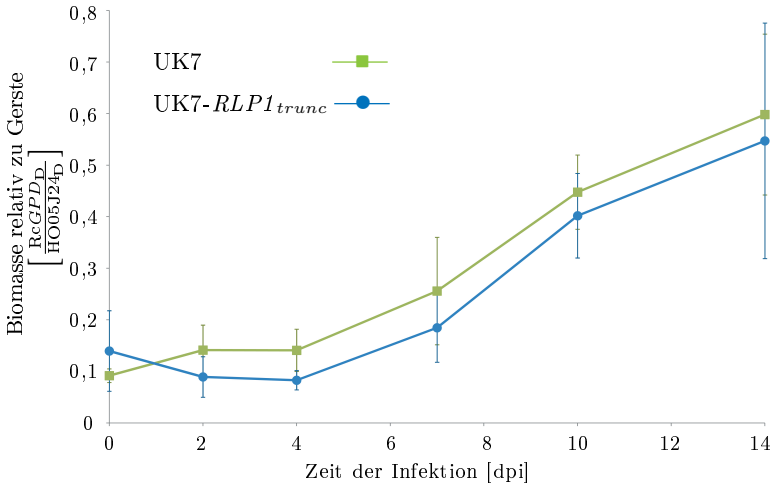


Abbildung 34: Abbildung 34: Pilzliche Biomasse nach Inokulation der Gerstensorte Ingrid mit UK7 und UK7-$RLP1_{trunc}$

In der *real-time*-PCR wurde das Gerstengen HO05J24 als Referenz (Primer 105 und 106, 114 bp) und *GPD* als *Rhynchosporium*-spezifisches Gen (Primer 78 und 79, 109 bp) mit genomischer DNA infizierter Gerstenblätter (Ingrid) amplifiziert. Die Auswertung erfolgte nach Pfaffl (2001). (n=3)

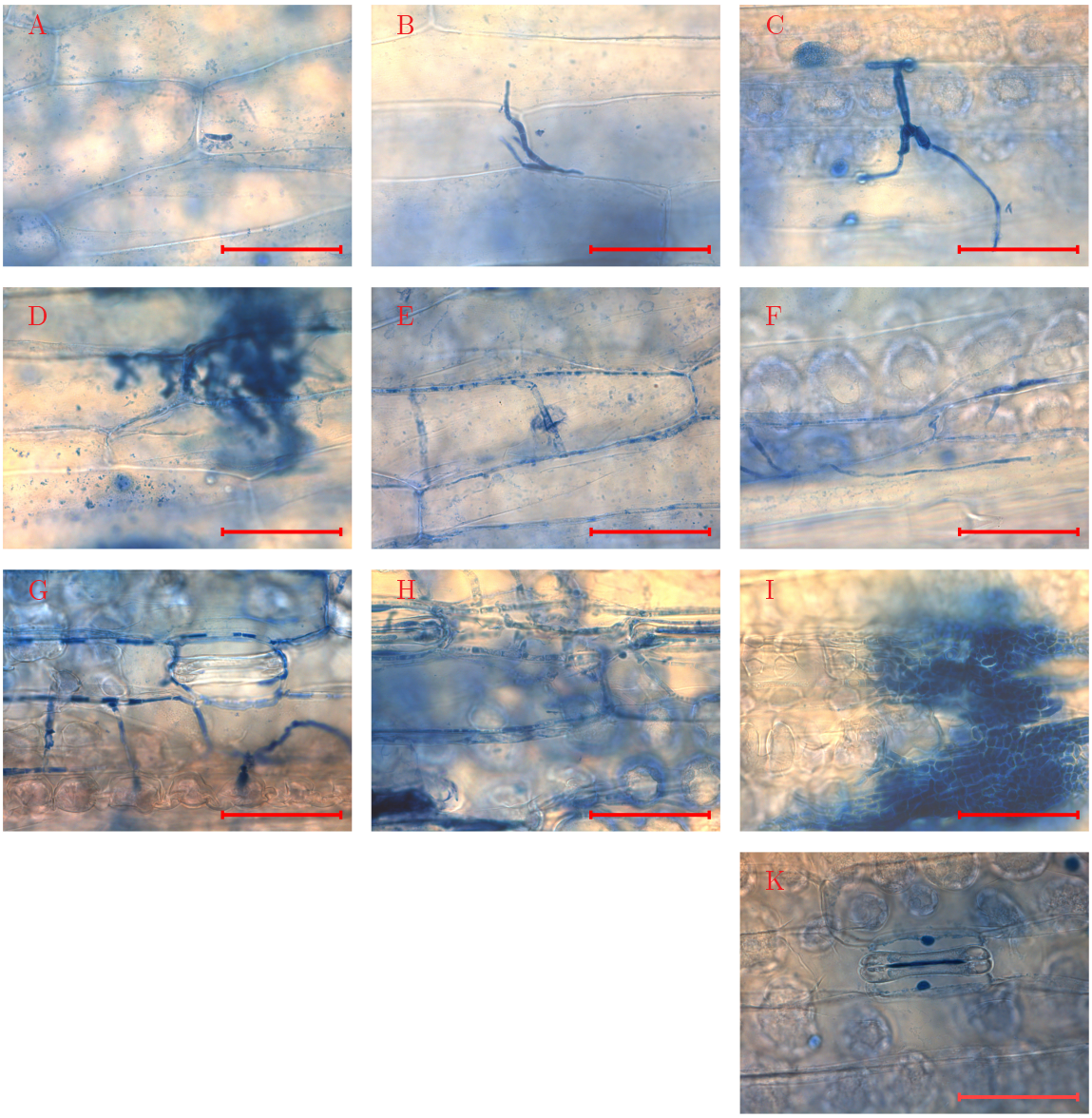


Abbildung 35: Abbildung 35: Entwicklung des Isolates UK7 während der Infektion der Gerstensorte Ingrid

Diese Bilder entstanden durch Lichtmikroskopie von mit Trypan-Blau gefärbten Blättern mit einem 100 fachen Objektiv. Der Maßstab entspricht 50 μm.
A - Konidie (0 dpi), B - Konidie mit Keimhyphe (2 dpi), C und D - Keimhyphen mit Appressorien-ähnlichen Strukturen und Anfänge subkutikularen Wachstums (4 dpi), E und F - Verzweigtes Hyphennetzwerk oberhalb der antiklinen Zellwände (7 dpi), G - Verzweigungen entlang der periklinen Zellwände (10 dpi), H und I - Stromaentwicklung (14 dpi), K - uninfizierte Kontrolle

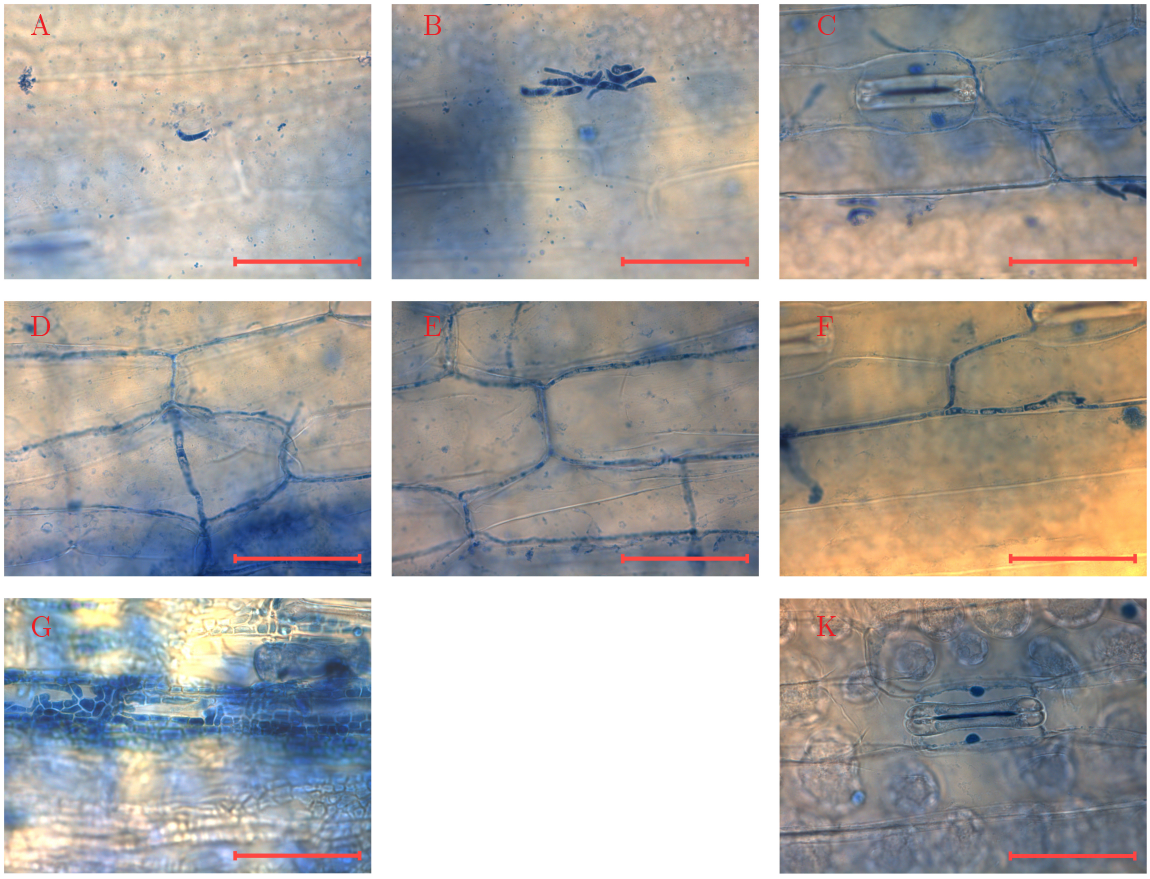


Abbildung 36: Abbildung 36: Entwicklung der Mutante UK7-$RLP1_{trunc}$ während der Infektion der Gerstensorte Ingrid

Diese Bilder entstanden durch Lichtmikroskopie von mit Trypan-Blau gefärbten Blättern mit einem 100 fachen Objektiv. Der Maßstab entspricht 50 μm.
A - Konidie (0 dpi), B - Ausgekeimte Konidien (2 dpi), C- Subkutikulares Wachstum der Pilzhyphen (4 dpi), D und E - Verzweigtes Hyphennetzwerk oberhalb der antiklinen Zellwände (7 dpi), F - Konidienbildung (10 dpi), G - Stromabildung (14 dpi), K - uninfizierte Kontrolle

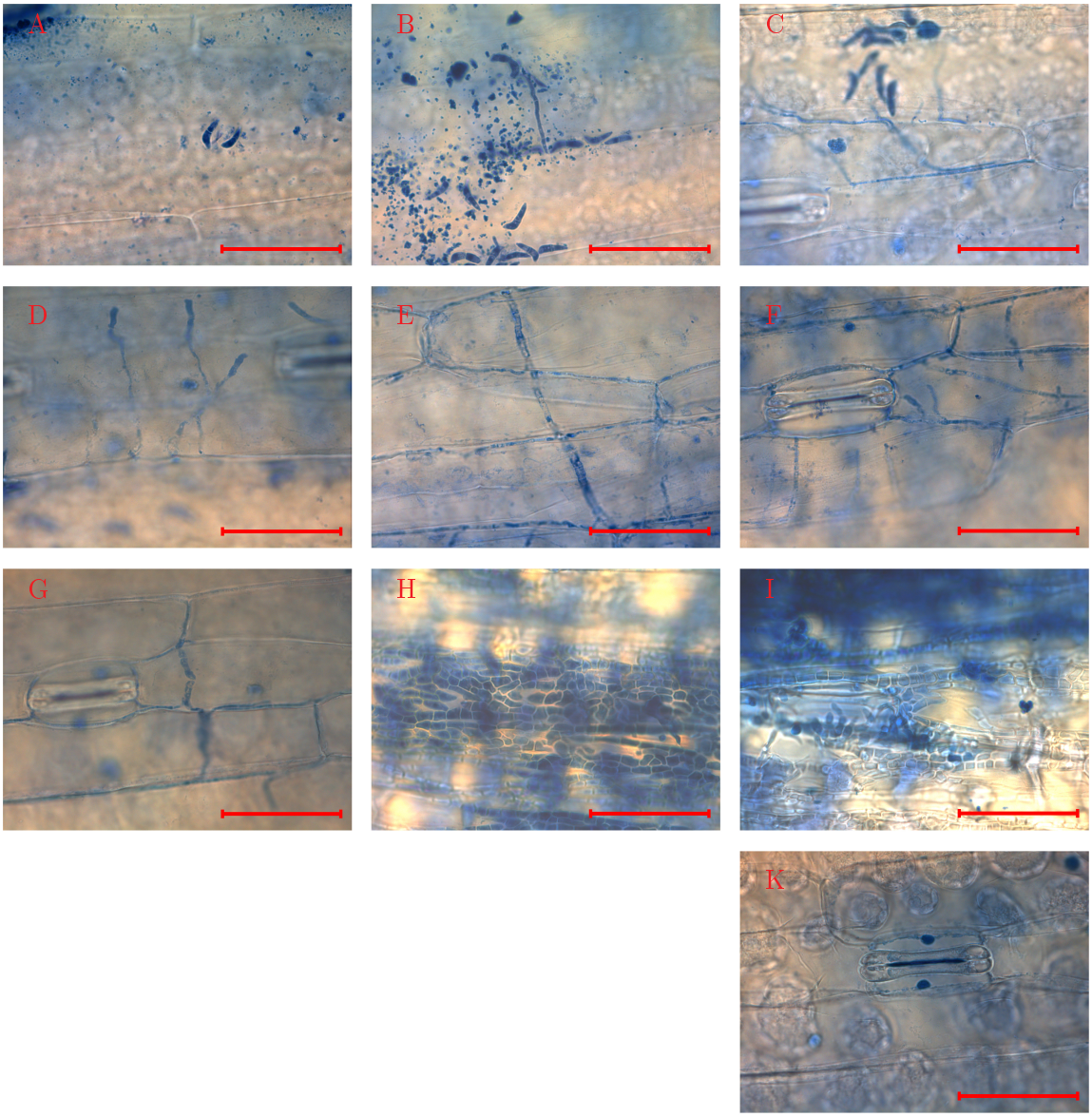


Abbildung 37: Abbildung 37: Entwicklung der Deletionsmutante UK7Δ*RLP1* während der Infektion der Gerstensorte Ingrid

Diese Bilder entstanden durch Lichtmikroskopie von mit Trypan-Blau gefärbten Blättern mit einem 100 fachen Objektiv. Der Maßstab entspricht 50 μm.
A - Konidien (0 dpi), B - Konidien mit Keimhyphen (2 dpi), C und D - Penetration der Kutikula und subkutikulares Wachstum (4 dpi), E und F - Reich verzweigtes Hyphennetzwerk (7 dpi), G - Reich verzweigtes Hyphennetzwerk (10 dpi), H und I - Stroma (14 dpi), K - uninfizierte Kontrolle

3.6.2 Untersuchungen zur Keimfähigkeit und Sporenbildung von UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1*

Da die Deletion der Rc*RLP1* keinen Einfluss auf das Wachstum von *Rhynchosporium in planta* hat, war die Frage, ob das *ex planta*-Wachstum durch die Deletion beeinträchtigt wird. Deshalb wurden Keimfähigkeit, Wachstumsgeschwindigkeit und Sporenbildung untersucht.

Für die Keimfähigkeit wurden 100 Sporen auf Lima-Bohnen-Agar ausgebracht. Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt, welche der Anzahl der keimfähigen Sporen entspricht (Abb. 38A). Es konnte kein Unterschied zwischen den drei untersuchten Pilzen nachgewiesen werden. Demzufolge keimen die Sporen von UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* gleich häufig aus.

Weiterhin wurden Sporen auf mit Lima-Bohnen-Agar behafteten Objektträgern ein bis zwei Tage inkubiert und unter einem Lichtmikroskop die Anzahl der Keimschläuche analysiert (Abb. 38B). Die Zahl der Keimhyphen pro Spore nimmt zwar von 24 Stunden bis 48 Stunden nach Ansetzen des Experimentes zu. Jedoch ist kein Unterschied zwischen UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* zu erkennen.

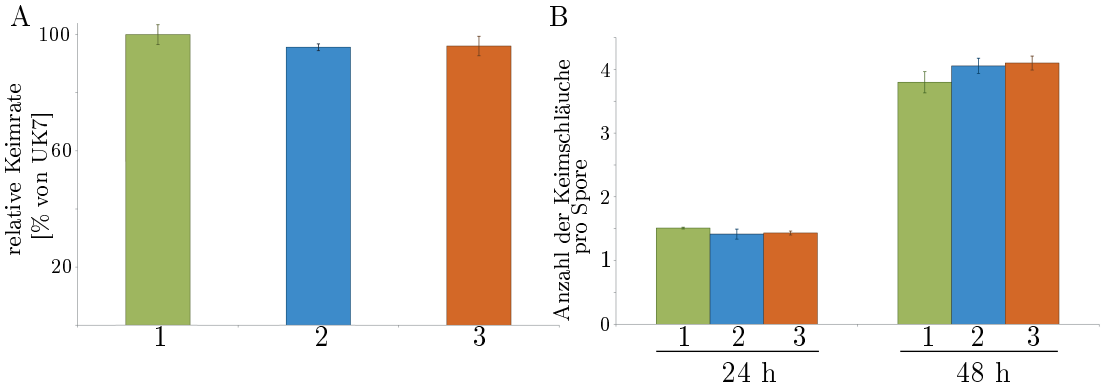


Abbildung 38: Abbildung 38: Analyse der Keimung und der Keimschlauchbildung von UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1*

A) Relative Keimrate gemessen an UK7: Für die Keimfähigkeit wurde 100 Sporen auf Lima-Bohnen-Agar ausgebracht und nach 14 Tagen Wachstum bei 17°C die Anzahl der Kolonien ausgezählt. Diese Zahl entspricht der Anzahl der keimfähigen Sporen. Die Werte jedes biologischen Replikates bestehen aus jeweils 6 technischen Wiederholungen. Das Wildtyp-Isolat UK7 wurde in der Darstellung auf 100 % gesetzt.

B) Anzahl der Keimschläuche pro Spore: Für dieses Experiment wurden Sporen auf mit Lima-Bohnen-Medium-behafteten Objektträgern aufgetragen und bis zu 48 h bei 17°C inkubiert. Nach 24 und 48 h wurde die Anzahl der Keimschläuche pro Spore an einem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden pro biologischem Experiment aus 100 Sporen der Mittelwert gebildet.

1 - UK7, 2 - UK7-*RLP1*$_{trunc}$, 3 - UK7Δ*RLP1*; (n=3)

Zur Untersuchung der Sporenbildung wurden zwei Wochen alte Kulturen von UK7, UK7-*RLP1*$_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* angelegt. Nach 14 Tagen wurden die neugebildeten Sporen nach der Maracas-Methode (2.3.4) vom Myzel getrennt und quantifiziert (Abb. 39). Die

Sporenanzahl zur Initiation der Kultur wurde von 5.000 bis 100.000 gewählt. Das von 5.000 Sporen ausgehende Myzel bedeckt selbst nach 14 Tagen Inkubation nicht vollständig die Agar-Platte, die nach Ausbringung von 50.000 Sporen nach der gleichen Behandlung mit Myzel bedeckt ist.

Aus der Abb. geht hervor, dass bei einer Ausgangsmenge von 5.000 Sporen weniger Sporen nach 14 Tagen Inkubation gebildet werden als mit jeder der anderen Ausgangsmengen. Verglichen mit dem Wildtyp-Isolat UK7 zeigt nur UK7Δ*RLP1* eine geringere Sporenproduktion bei einer Ausgangsmenge von 5.000 bis 50.000 Sporen. Bei einer Ausgangsmenge von 100.000 Sporen ist dieser Effekt jedoch nicht mehr vorhanden. Die Mutante UK7-$RLP1_{trunc}$ zeigt ebenfalls leichte Unterschiede verglichen zum Wildtyp. Diese korrelieren aber nicht mit den Unterschieden von UK7Δ*RLP1* zu UK7. Zusätzlich konnte bei keiner Mutante bei allen Ausgangsmengen eine Signifikanz nachgewiesen werden. Die hohe Varianz des Experimentes rührt von der Isolierungsmethode und nicht von der biologischen Abweichung her. Durch die Verwendung der Maracas-Methode wurde jedoch die Standardvarianz im Vergleich zur herkömmlichen Isolierungsmethode stark vermindert. Schlussfolgernd aus diesen Experimenten kann eine Funktion der RLP1 in der Bildung und Auskeimung der Konidien ausgeschlossen werden.

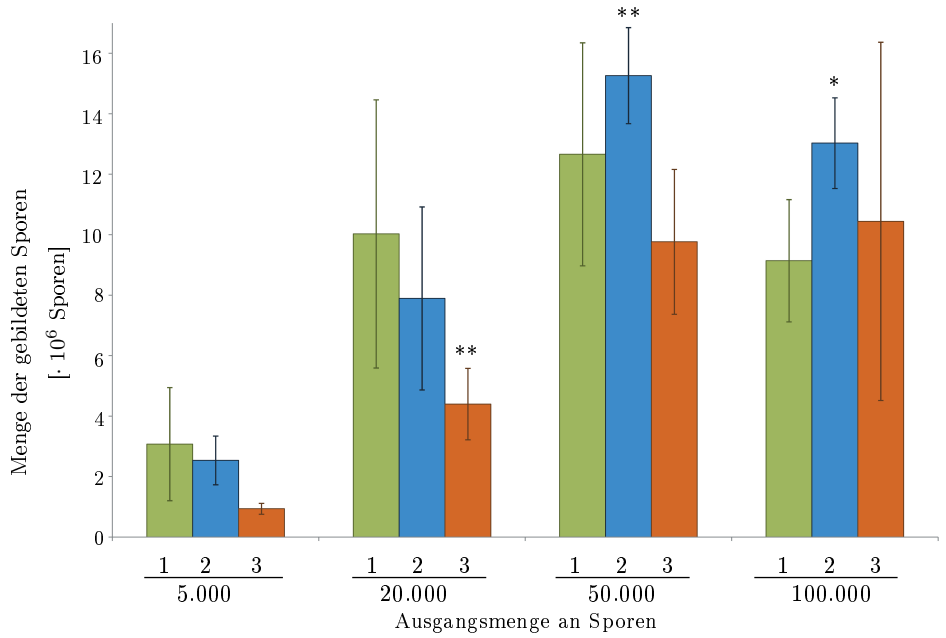


Abbildung 39: Abbildung 39: Sporulationsanalyse von UK7, UK7-$RLP1_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1*

Zur Untersuchung der Sporenbildung wurde Lima-Bohnen-Agar mit der gleichen Anzahl an Sporen von UK7, UK7-$RLP1_{trunc}$ und UK7Δ*RLP1* 14 Tage bei 17°C inkubiert. Anschließend wurden die neugebildeten Sporen nach der Maracas-Methode isoliert und die Konzentration der Sporen mit einer Zählkammer bestimmt. Pro biologischen Replikat wurden 4 technische Wiederholungen durchgeführt.

1 - UK7, 2 - UK7-$RLP1_{trunc}$, 3 - UK7Δ*RLP1*, * - $p<0{,}01$, ** - $p<0{,}05$; (n=3)

3.6.3 Mikroskopischer Vergleich von *ex planta* gewachsener UK7-, UK7-*RLP1*$_{trunc}$- und UK7Δ*RLP1*-Kulturen

R. commune bildet in Flüssigkultur ein submerses (am Boden der Kultur) und ein emerses Myzel (an der Oberfläche der Flüssigkeit) aus. Das Myzel an der Oberfläche wird erst einige Tage nach Animpfen der Kultur gebildet (bei ca. 1100 Sporen pro cm^2 Oberfläche nach etwa sieben Tagen).

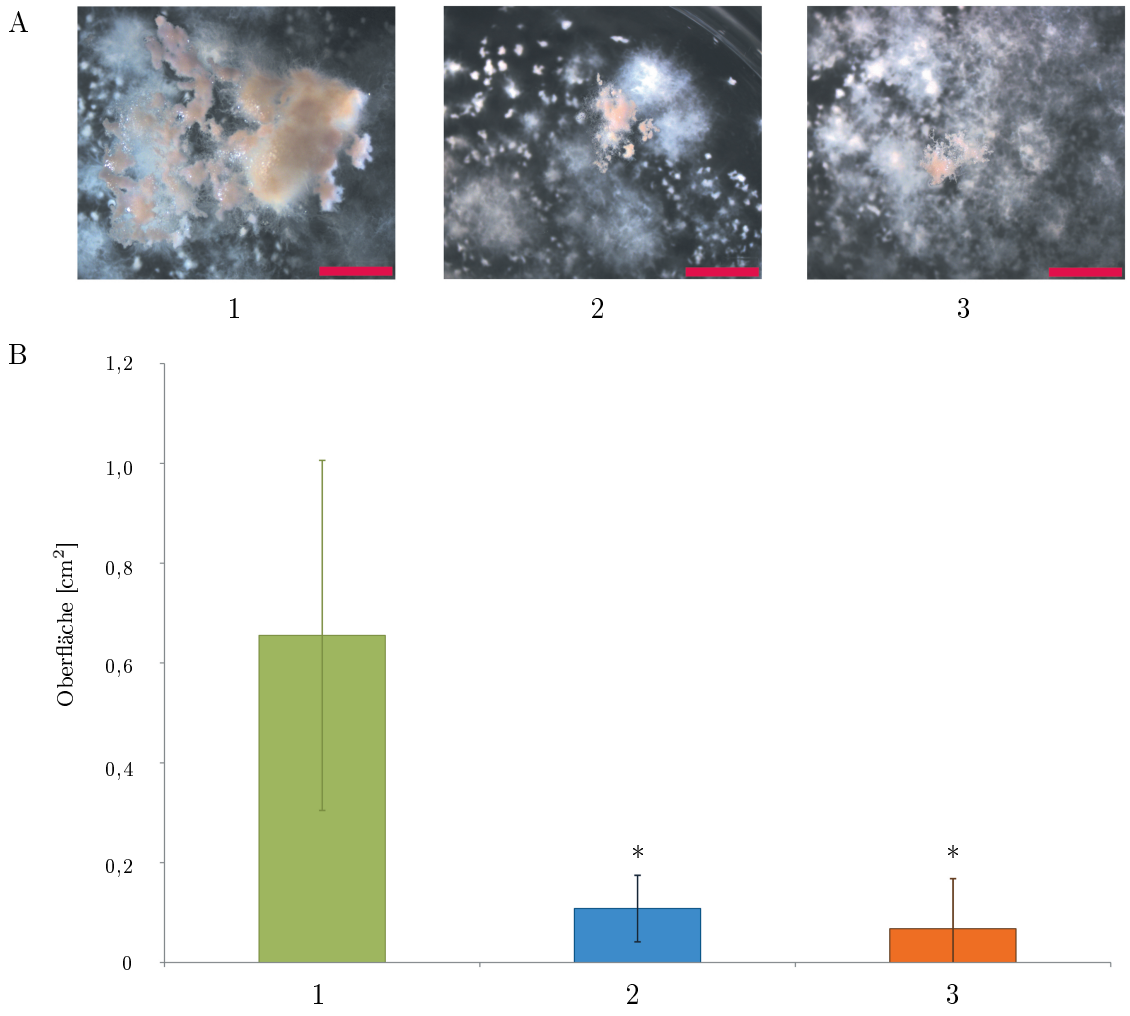


Abbildung 40: Abbildung 40: Flächenbestimmung des Myzels an der Oberfläche des Mediums

A) Fotographische Darstellung jeweils eines repräsentativen emersen Myzels bei 10 facher Vergößerung. Der rote Balken entspricht 0,3 cm. B) Die Ausmessung der Fläche geschah mit AxioVision LE. * - p<0,05
1 - UK7, 2 - UK7-*RLP1*$_{trunc}$, 3 - UK7Δ*RLP1*, (14 dpi, n=3)

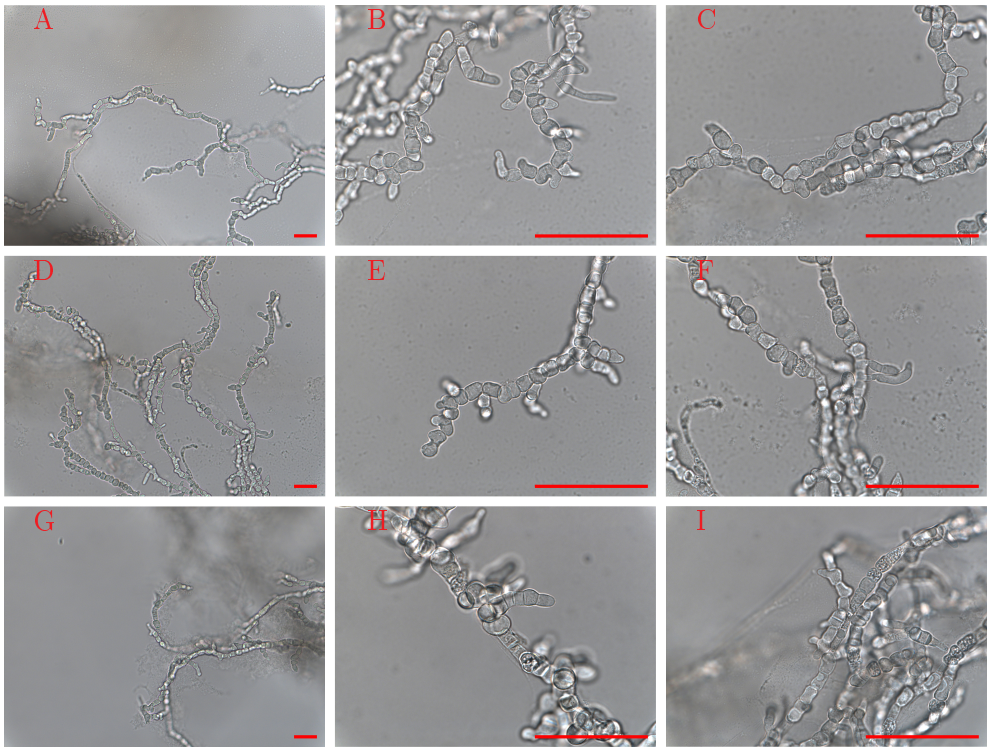


Abbildung 41: Abbildung 41: Mikroskopie des emersen Myzels von UK7, UK7-*RLP1 trunc* und UK7Δ*RLP1*

Das mikroskopierte Myzel auf der Flüssigkeitsoberfläche entsprach dem aus Abb. 40. Es sind zwei Vergrößerungen dargestellt: Die jeweils linken Bilder sind Aufnahmen mit 40 fachem Objektiv. Die mittleren und die rechten Bilder entstanden mit 100 fachem Objektiv. Der Maßstab entspricht jeweils 50 μm.
A, B und C - UK7, D, E und F - UK7-*RLP1 trunc*, G, H und I - UK7Δ*RLP1*

Beim Vergleich der Pilzstämme UK7, UK7-*RLP1 trunc* und UK7Δ*RLP1* zeigten die Strukturen der beiden Myzeltypen keinen makroskopisch sichtbaren Unterschied. Einzig das emerse Myzel war in der Größe des „Teppichs“ verschieden. Anders als beim Wildtyp UK7 bildeten die Mutanten UK7-*RLP1 trunc* und UK7Δ*RLP1* 10 Tage nach Beimpfen des Mediums noch kein Myzel an der Oberfläche. Erst 14 Tage nach Beimpfen konnte emerses Myzel bei den Mutanten UK7-*RLP1 trunc* und UK7Δ*RLP1* beobachtet werden (Abb. 40A). Die Fläche des Myzels an der Mediumoberfläche wurde unter Verwendung der Software AxioVision LE (Carl Zeiss) quantifiziert (Abb. 40B). Man kann deutlich sehen, dass die Fläche des Myzels der beiden Mutanten kleiner ist als die des Wildtypes UK7. Dies konnte ebenfalls mit dem T-Test als signifikant bestätigt werden. Genauere Untersuchungen des emersen Myzels folgten durch Mikroskopie (Abb. 41). Das Myzel besteht aus sehr kurz septierten Hyphen, die keine einheitliche Linie bilden, sondern eher aufgedunsen aussehen. Die Hyphen wachsen in alle Richtungen, auch in die Luft. Dennoch konnte im Aufbau der Hyphen mikroskopisch kein Unterschied zwischen UK7 und den Mutanten beobachtet werden.

3.7 Stammbaumanalysen nach Lemberg & Freeman (2007)

Die phänotypische Analyse der Deletionsmutante konnte keine Hinweise auf die Funktion des Proteins RLP1 und dessen Aktivität geben. Deshalb wurde die Aminosäuresequenz der RLP1 von der Nukleotidsequenz abgeleitet und in Anlehnung an die Klassifizierung von Lemberg & Freeman (2007) mit bekannten Rhomboid-ähnlichen Proteinen verglichen. Zunächst musste eine Eingruppierung in die Rhomboid-ähnlichen Proteasen, die iRhom oder die inaktiven Rhomboid-Homologen erfolgen.
Die inaktiven Rhomboid-Homologen bilden phylogenetisch keine Einheit. An den Positionen der katalytisch aktiven Aminosäuren sind kein Serin bzw. Histidin konserviert und der Ähnlichkeitsgrad ist geringer als der der iRhom und Rhomboid-ähnlichen Proteasen (Lemberg & Freeman, 2007). Die RLP1 enthält die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin. Außerdem zeigt sie die höchste Ähnlichkeit zu den Rhomboid-ähnlichen Proteasen. Deshalb gehört die RLP1 nicht zu den inaktiven Rhomboid-Homologen.

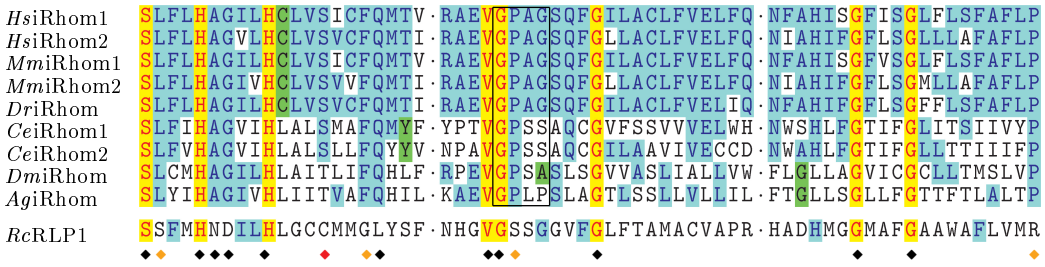


Abbildung 42: Abbildung 42: Aminosäurevergleich durch Lemberg & Freeman (2007) definierter iRhom mit der *Rc*RLP1

Für diesen Vergleich wurden die hochkonservierten Bereiche der iRhom und *Rc*RLP1 genutzt, die Lemberg & Freeman (2007) für eine Klassifizierung zur Gruppe der iRhom ausreichte. Es wurden drei Regionen der Proteine verglichen, die durch Punkte von einander getrennt dargestellt sind. Die Regionen beinhalten die Transmembrandomänen zwei, vier und sechs. Die Aminosäuren, die in allen iRhoms identisch sind, wurden mit Rauten markiert. Schwarze Rauten entsprechen Aminosäuren, die ebenfalls in den aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen an diesen Positionen auftauchen können, jedoch nicht zu den hoch konservierten Aminosäuren zählen. Mit gelben Rauten wurden die Aminosäuren markiert, die nur in iRhom konserviert sind. Das Motiv GPxx, welches bei den aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen dem GxSx-Motiv entspricht, ist schwarz eingerahmt. Das Cystein an Position 179 der RLP1 ist mit einer roten Raute gekennzeichnet.

Die iRhom sind durch einen höheren Konservierungsgrad geprägt. Ihnen fehlt im Vergleich zu den Rhomboid-ähnlichen Proteasen neben dem hochkonservierten Asparagin in der zweiten Transmembrandomäne meist mindestens eine der katalytisch aktiven Aminosäuren (Ausnahmen: *Ce*iRhom1 und *Ce*iRhom2). An der Position des hochkonservierten Asparagins ist entweder ein Serin oder ein Threonin kodiert (Lemberg & Freeman, 2007). Das katalytische Serin sowie das Histidin sind in der RLP1 vorhanden. Weiterhin enthalten die iRhom vier hochkonservierte Aminosäuren, welche in aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen und der

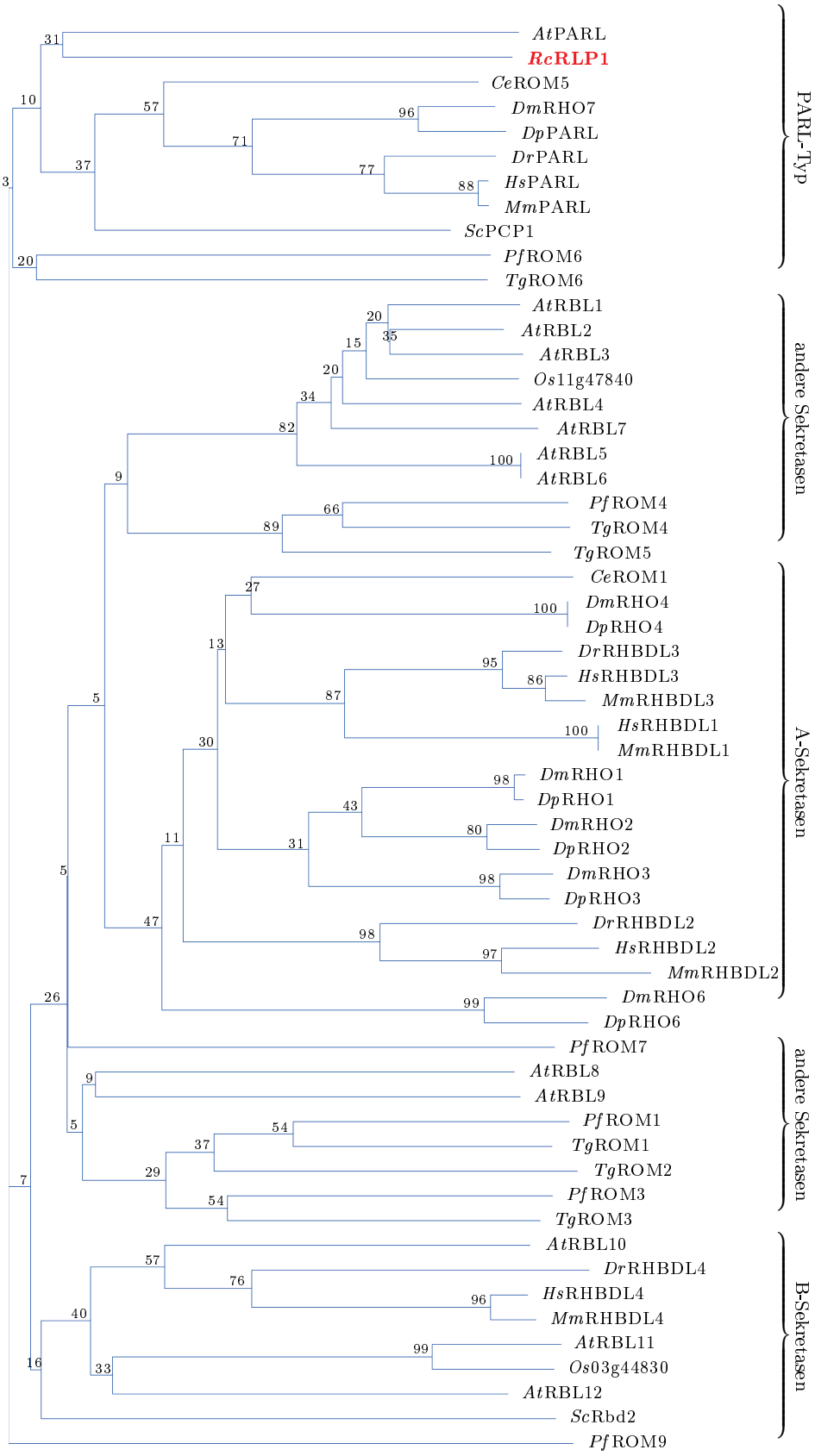

AtPARL
RcRLP1
CeROM5
DmRHO7
DpPARL
DrPARL
HsPARL
MmPARL
ScPCP1
PfROM6
TgROM6
AtRBL1
AtRBL2
AtRBL3
Os11g47840
AtRBL4
AtRBL7
AtRBL5
AtRBL6
PfROM4
TgROM4
TgROM5
CeROM1
DmRHO4
DpRHO4
DrRHBDL3
HsRHBDL3
MmRHBDL3
HsRHBDL1
MmRHBDL1
DmRHO1
DpRHO1
DmRHO2
DpRHO2
DmRHO3
DpRHO3
DrRHBDL2
HsRHBDL2
MmRHBDL2
DmRHO6
DpRHO6
PfROM7
AtRBL8
AtRBL9
PfROM1
TgROM1
TgROM2
PfROM3
TgROM3
AtRBL10
DrRHBDL4
HsRHBDL4
MmRHBDL4
AtRBL11
Os03g44830
AtRBL12
ScRbd2
PfROM9
PARL-Typ
andere Sekretasen
A-Sekretasen
andere Sekretasen
B-Sekretasen

Abbildung 43: Abbildung 43: Phylogramm nach Lemberg & Freeman (2007)

Die Stammbaumanalyse wurde angelehnt an Lemberg & Freeman (2007) mit dem Unterschied der Software (hier MEGA4.0) durchgeführt. Es sind Rhomboid-ähnliche Proteasen aus *A. thaliana* (*At*), *Caenorhabditis elegans* (*Ce*), *D. melanogaster* (*Dm*), *Drosophila pseudoobscura* (*Dp*), *Danio rerio* (*Dr*), *Homo sapiens* (*Hs*), *Mus musculus* (*Mm*), *S. cerevisiae* (*Sc*), *Plasmodium falciparum* (*Pf*) und *Toxoplasma gondii* (*Tg*) enthalten. Der Verwandtschaftsgrad (Sequenzhomolgie) ist an den Verzweigungen dargestellt. Die Klassifizierung (Sekretasen des A- bzw. B-Typs, Sekretasen anderer Typen und PARL-Typ-Proteasen) nach Lemberg & Freeman (2007) ist mit geschwungenen Klammern markiert. Die *Rc*RLP1 ist rot hervorgehoben.

*Rc*RLP1 fehlen (Abb. 42). Das impliziert, dass die RLP1 nicht zu den inaktiven Proteinen dieser Klasse gezählt werden kann.
Ein Aminosäurevergleich der RLP1 mit Rhomboid-ähnlichen Proteasen zeigte, dass die RLP1 den PARL-Typ-Proteasen am ähnlichsten ist. Die Gruppe des PARL-Typs weist eine Vielzahl von Charakteristika auf, die auch im Aminosäurevergleich (siehe Anhang Z.4.2) zu beobachten sind. Zu diesen Charakteristika gehören das Vorhandensein der katalytischen Dyade und ein hoher Ähnlichkeitsgrad der Aminosäuresequenz. Zusätzlich fehlt ein Arginin im zweiten *Loop* und ein Glutamat am C-terminalen Ende der dritten Transmembrandomäne (Koonin *et al.*, 2003; Lemberg & Freeman, 2007). Alle diese Eigenschaften treffen auch auf das RLP1-Protein zu. Die Zugehörigkeit zu den PARL-Typ-Proteasen ist auch aus dem Phylogramm (Abb. 43) ersichtlich, das auf der Grundlage des Aminosäurevergleichs erstellt wurde.

3.8 Struktur des RLP1-Proteins

3.8.1 Prognose der Transmembranbereiche

Transmembrandomänen haben eine charakteristische Aminosäurezusammensetzung, die anhand von sogenannten TMMH-Algorithmen erkannt werden können. Dies ist bei polytopischen Membranproteinen, also Proteine mit mehreren Transmembrandomänen, relativ unpräzise. Deshalb wurde mit verschiedenen TMMH-Algorithmen kalkuliert, wieviele Transmembrandomänen RLP1 enthält. Diese Vorgehensweise wird von mehreren Arbeitsgruppen empfohlen und kommt der realen Struktur nahe (Nilsson *et al.*, 2000; Friedmann *et al.*, 2004). Als Ergebnis der algorithmischen Analyse (Tab. 9) konnten nur mit zwei Programmen (Phobius Prediction und MEMSAT3) sechs Transmembrandomänen vorhergesagt werden. Drei Programme (TMHMM, TMpred und „DAS“) schlugen fünf Transmembrandomänen in der Sekundärstruktur der RLP1 vor. Keines der unabhängigen Programme sagte sieben membrandurchspannende Domänen voraus.

Programm	Position der Transmembrandomänen [As]					
	1	2	3	4	5	6
TMHMM	106-125		189-211	226-248	255-277	287-304
Phobius prediction	106-124	173-192	199-218	230-348	255-275	287-305
TMpred	107-123		186-204	230-249	255-277	290-306
„DAS“	106-121		187-209	236-246	255-274	297-303
MEMSAT3	103-126	169-192	199-219	226-250	255-279	283-306

Tabelle 10: Tabelle 9: Vorhersage der Transmembrandomänen von *Rc*RLP1

Lemberg & Freeman (2007) überprüften andere Rhomboid-ähnliche Proteasen des PARL-Typs auf Anzahl und Lage der Transmembrandomänen mit den Programmen TMHMM und TMpred, die auch in der oben genannten Analyse verwendet wurden. TMpred erkannte bei fünf Proteasen sieben und bei drei Proteasen sechs Transmembrandomänen. TMHMM erkannte die Transmembrandomänen schlechter, bei vier Proteasen sechs, bei drei Proteasen vier und bei *Tg*ROM6 keine. Für eine exakte Bestimmung der Sekundärstruktur bzw. der Anzahl der Transmembrandomänen ist eine Röntgenkristallstruktur des Proteins notwendig.

3.8.2 Aminosäurevergleich der *Rc*RLP1 mit anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen

Zur Analyse wesentlicher Unterschiede in Struktur bzw. Zusammensetzung der Proteasen wurde ein Aminosäurevergleich einiger gut untersuchter Rhomboid-ähnlicher Proteasen mit der RLP1 durchgeführt. Der Vergleich enthielt sowohl Rhomboid-ähnliche Proteasen des PARL-Typs (*At*PARL, *Dm*RHO7, *Hs*PARL, *Pf*ROM6 und *Sc*PCP1p) als auch Proteasen, die am sekretorischen Stoffwechsel mitwirken (*At*RBL1, *Dm*RHO1, *Hs*RHBDL2, *Pf*ROM1 und *Sc*RBL2). Zusätzlich wurden zwei prokaryotische Rhomboid-ähnliche Proteasen mit in den Vergleich einbezogen (*Ec*GlpG und *Ps*AarA). Der Aminosäurevergleich ist aufgrund des mehrseitigen Umfangs in Anhang Z.4.2 abgebildet.
Die zwei Rhomboid-ähnlichen Proteasen aus *P. falciparum* fallen der Aminosäureanzahl wegen heraus. Die mitochondriale *Pf*ROM6 ist im Vergleich zu allen anderen Proteasen am N-Terminus extrem verlängert. Im Gegensatz dazu besitzt die *Pf*ROM1 einen verkürzten N-Terminus. Die erste Transmembranhelix der *Pf*ROM1 müsste demnach zum C-Terminus hin verlagert sein. Alle anderen dargestellten Rhomboid-ähnlichen Proteasen bestehen aus einer ähnlichen Anzahl von Aminosäuren (262 - 379).
In die Abb. des Aminosäurevergleiches sind die Positionen der Transmembranbereiche der *Ec*GlpG eingezeichnet. Die Struktur von *Ec*GlpG wurde durch mehrere Arbeitsgruppen kristallografisch aufgeklärt (Wang *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006; Ben-Shem *et al.*, 2007), wodurch die Transmembranbereiche genau bekannt sind. Diese stimmen in etwa mit den prognosti-

zierten Transmembrandomänen der *Rc*RLP1 überein. Auch die Transmembranhelices, die nach Lemberg & Freeman (2007) durch TMMH-Algorithmen vorhergesagt wurden, entsprechen fast den Transmembranbereichen von *Ec*GlpG.
Auffällig ist der Konservierungsgrad innerhalb der Transmembranbereiche. Während sich die Aminosäurenabfolge in der ersten und fünften Transmembrandomäne kaum ähneln, sind die Aminosäuren der zweiten, vierten und sechsten Transmembranhelix über die gesamten Proteasen am höchsten konserviert. Bei Transmembranregion vier und sechs erscheint die Konservierung um die katalytisch aktiven Aminosäuren plausibel. In Transmembrandomäne zwei hingegen sind zwei Aminosäuren identisch in allen aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen: das erste Histidin (H) und das Asparagin (N). Das zweite Histidin der zweiten Transmembranregion ist ebenfalls in fast allen aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen enthalten. Die Intermembranbereiche, die *Loop*s, sind weitestgehend sehr variabel wie der N- und C-Terminus auch.
Die *Rc*RLP1 enthält den genannten Konservierungsgrad aller Rhomboid-ähnlichen Proteasen. Jedoch ist die Position 179 sehr auffällig. Denn diese ist in allen anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen als das Asparagin hochkonserviert. An dieser Position ist in der RLP1 ein Cystein kodiert. Nach der Definition einer aktiven Rhomboid-ähnlichen Protease nach Lemberg & Freeman (2007) muss diese Position als Asparagin konserviert sein. Die Umgebung um das hochkonservierte Asparagin ist stark hydrophob. Die Aminosäure, welche C-terminal an das Asparagin angrenzt, ist bei vielen Sekretasen und Proteasen des PARL-Typs ein Methionin. Bei der RLP1 grenzt ebenfalls ein Methionin an das Cystein, aber die direkte Umgebung des Cysteins besteht ausschließlich aus schwefelhaltigen Aminosäuren: -C178-C179-M180-M181-. Eine so stark schwefelhaltige Region konnte in keiner anderen aktiven Rhomboid-ähnlichen Protease und in keiner iRhom beobachtet werden.

3.8.3 Homologiemodell der RLP1

Da während der Anfertigung dieser Arbeit die Aufklärung der Struktur mittels Röntgenkristallographie zeitlich nicht eingeplant wurde, sollten trotzdem Annäherungen an die native Struktur durch ein Homologiemodell erhalten werden.
Die Modellierung der RLP1-Struktur wurde von Dr. W. Brandt (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle) durchgeführt. Eine Voraussetzung zur Erstellung eines Homologiemodells ist eine möglichst hohe Sequenzhomologie (>30 %) zu einem Matrizenprotein mit bereits bekannter Struktur. Mit der Software BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) konnten keine Strukturen in der PDB-Proteindatenbank gefunden werden, die eine ausreichende Homologie zur RLP1 aufwiesen. Deshalb wurde zunächst eine Sekundärstrukturvorhersage unter anderem mit PSIPRED PREDICTION (Jones, 1999; Bryson *et al.*, 2005) durchgeführt. Es ergaben sich daraus, wie zu erwarten, vorwiegend helikale Strukturen.
Die RLP1 wurde den Rhomboid-ähnlichen Proteasen zugeordnet. Deshalb wurde in der PDB-Proteindatenbank nach Strukturen dieser Enzymklasse gesucht. Von den dort veröf-

fentlichten Röntgenkristallstrukturen waren zu der Zeit des Erstellens des Homologiemodells sechs zugänglich (PDB-Code: 2nr9, 1vg5, 2ic8, 2irv, 2nrf und 2o71). Diese Proteine zeigten ein sehr ähnliches Sekundärstrukturprofil, so dass eine gewisse Chance bestand ein relevantes Modell zu entwickeln.
Das Protein mit der besten Auflösung von 2,1 Å war *Ec*GlpG (PDB-Code: 2ic8, Wang *et al.*, 2006), das als Matrize für die Modellierung genutzt wurde. Eine Sequenzidentität von 14,2 % zu *Ec*GlpG ist für eine Homologiemodellierung nicht ausreichend, aber zusammen mit dem ähnlichen Sekundärstrukturprofil wurde die Modellierung durchgeführt. Die graphische Auswertung des berechneten Modells im Vergleich zum Matrizenprotein GlpG ist in Abb. 44A/B dargestellt. Hierbei wurde der N-Terminus der RLP1 aus der Darstellung entfernt, da die Röntgenstruktur der GlpG nur aus den sechs Kerntransmembrandomänen besteht. Trotz der geringen Sequenzidentität zeigt das Strukturmodell einen nahezu identischen Verlauf wie das Matrizenprotein. Dies weist darauf hin, dass das Modell trotz sehr geringer Homologie zur Matrize im Wesentlichen einer nativen Faltung entsprechen könnte.

TMD	Position	Aminosäureanzahl
+1	24 - 78	55
1	108 -127	20
2	173 - 190	18
3	196 - 217	22
4	234 - 250	17
5	268 - 278	11
6	287 - 303	17

Tabelle 11: Tabelle 10: Transmembranbereiche in der Modellstruktur von RLP1

Auflistung der durch das Modellieren der RLP1-Struktur identifizierten Transmembranhelices inklusive Position im Protein und Helixlänge

Bei Rhomboid-ähnlichen Proteasen sind die Transmembrandomänen sehr hoch konserviert. Die *Loop*s hingegen sind bis auf einige wenige Aminosäuren variabel ebenso wie der N- und C-Terminus der Proteasen (Koonin textitet al., 2003; Lemberg & Freeman, 2007). Deshalb konnten die Transmembranbereiche fast exakt denen von GlpG angeglichen werden (außer die N-terminale Hälfte der fünften Transmembrandomäne). Die *Loop*s unterscheiden sich stark.
Fügt man nun zum Kernbereich der RLP1 die modellierte N-terminale Domäne hinzu, erhält man die Abb. 44C. Daraus ist ersichtlich, dass diese wie eine Transmembrandomäne aus einer Helix besteht und weit in den Transmembranbereich hineinlangt. Womöglich besteht der N-Terminus aus einer weiteren Transmembranregion. Die Transmembranbereiche konnten, wie in Tab. 10 gelistet, der RLP1 entsprechend dem Modell zugeordnet werden. Die Transmembrandomäne fünf ist mit 11 Aminosäuren sehr kurz. Betrachtet man die N-terminal

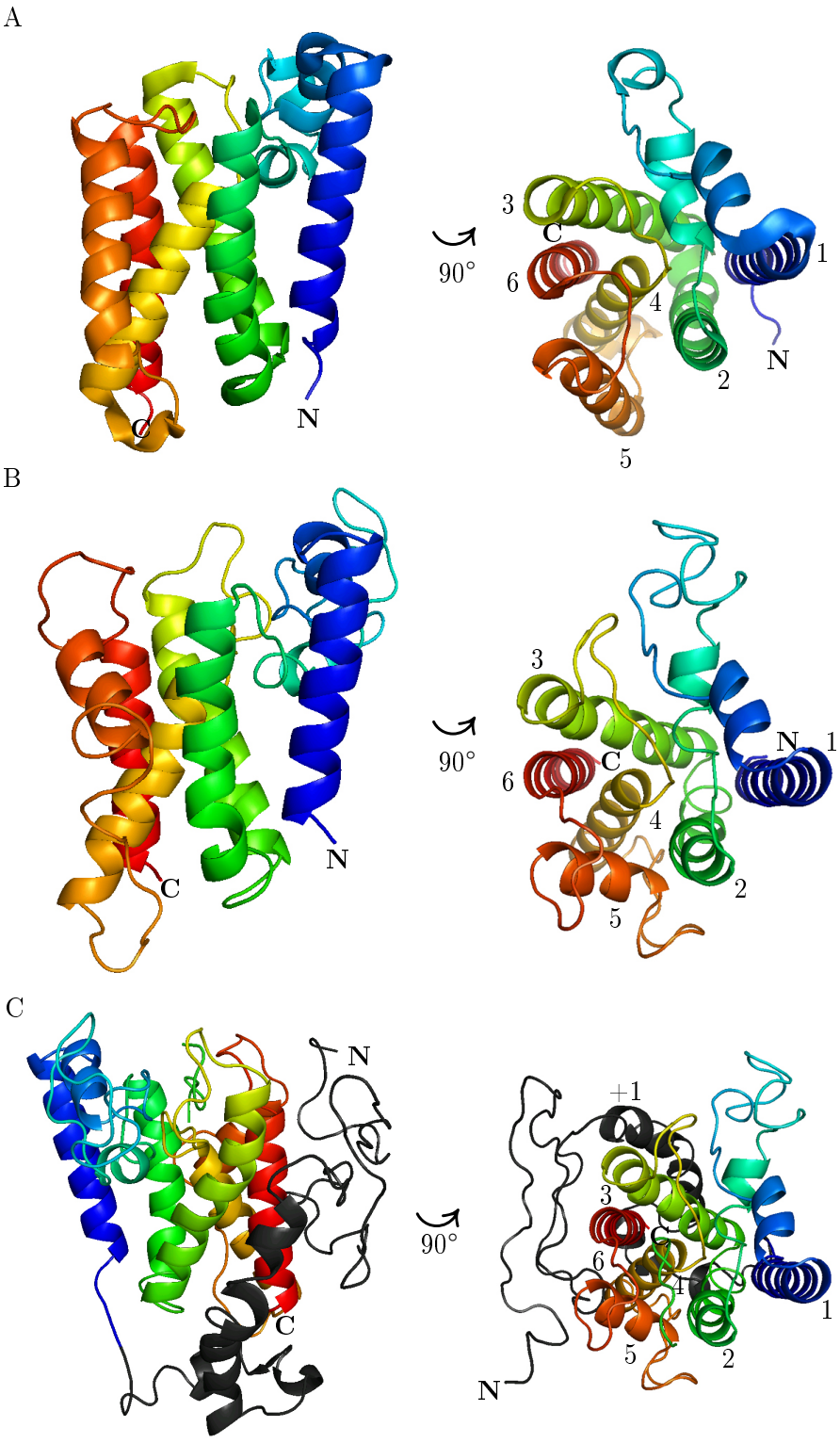
Aminosäure		*Rc*RLP1	*Ec*GlpG	*Sc*PCP1	*Hs*PARL
Methionin	Gesamtzahl	13	13	11	10
	Oberflächen exponiert	9	7	n.b.	n.b.
Cystein	Gesamtzahl	9	1	3	7
	Oberflächen exponiert	5	0	n.b.	n.b.

Tabelle 12: Tabelle 11: Anzahl schwefelhaltiger Aminosäuren in ausgewählten Rhomboid-ähnlichen Proteasen

gelegenen Aminosäuren, so ist denkbar, dass sie nicht wie in dem Modell bei Aminosäure 268 beginnt sondern eher bei Aminosäure 262: -I_{262}SLAIAVSLIATVGGMQ$_{278}$-. Dies würde einer Länge von 17 entsprechen. Verglichen mit den TMMH-Algorithmen (Tab. 9) ist diese Variante wahrscheinlicher. Im Allgemeinen stimmen die mit TMMH-Algorithmen bestimmten Transmembranbereiche fast exakt mit denen in der Modellstruktur überein.
Der Aminosäuresequenzvergleich der RLP1 und GlpG zeigte, dass die RLP1 mit neun Cysteinen verglichen mit der GlpG (ein Cystein) sehr Cystein-reich ist. Andere mitochondriale Rhomboid-ähnliche Proteasen enthalten ebenso mehr Cysteine als die GlpG (PCP1 aus *S. cerevisiae* - 3 Cysteine, PARL aus *Homo sapiens* - 7 Cysteine; Tab. 11). Im Oberflächenmodell (Abb. 45) ist zusätzlich zu erkennen, dass fünf der neun Cysteine der RLP1 an der Oberfläche des Proteins der Umgebung präsentiert werden. Das Cystein der GlpG ist nicht im Oberflächenmodell zu sehen.
Die Anzahl der Methionine der beiden verglichenen Rhomboid-ähnlichen Proteasen ist identisch (jeweils 13). Jedoch sind bei der RLP1 neun und bei der GlpG nur sieben der 13 Methionine an der Oberfläche der Umgebung ausgesetzt (Abb. 45, Tab. 11). Bei beiden Modellen ist auffällig, dass die Methionine an der Oberfläche an den Seiten zu finden sind, an denen die katalyisch aktiven Aminosäuren (Serin und Histidin) Zugang zur Oberfläche haben. Bei der RLP1 sind an der Oberfläche zusätzlich zwei Cysteine (C178, C179) in unmittelbarer Nähe des Serins (S234).

Abbildung 44: Abbildung 44: Vergleich der Modellstruktur von *Rc*RLP1 mit der Struktur der *Ec*GlpG

Zum besseren Vergleich mit der *Ec*GlpG-Struktur wurden die ersten 103 Aminosäuren von der Sequenz der *Rc*RLP1 weggelassen. Demzufolge ist nur die Kernstruktur zu erkennen. Die Strukturen sind in den Farben des Regenbogens dargestellt. Der N-Terminus ist blau gefärbt. Bis zum C-Terminus gehen die Farben bis zu rot über. Links ist die Ansicht in der Membranebene gezeigt, rechts nach einer Drehung um 90° die Aufsicht. Die Transmembrandomänen sind vom N-Terminus zum C-Terminus in der Aufsicht durchnummeriert. Die vollständige Modellstruktur der *Rc*RLP1 (C) enthält die gesamte Aminosäuresequenz. Die graue Struktur entspricht dem Modell des N-Terminus, also den N-terminalen 103 Aminosäuren. Links ist die Rückansicht in Membranebene im Vergleich zu (A) und (B) gezeigt und rechts die Aufsicht. Die mögliche N-terminale membrandurchspannende Domäne wurde mit +1 gekennzeichnet.
A - Röntgenkristallstruktur der *Ec*GlpG, B - Modell der *Rc*RLP1, bei dem die N-terminalen 103 Aminosäuren abgeschnitten wurden, C - vollständiges Modell der *Rc*RLP1; Darstellungsart: Richardson-Diagramm


A
C
N
90°
3
C
6
4
1
N
2
5
B
C
N
90°
3
C
N
1
6
4
2
5
C
N
90°
+1
3
6
4
1
5
2
N

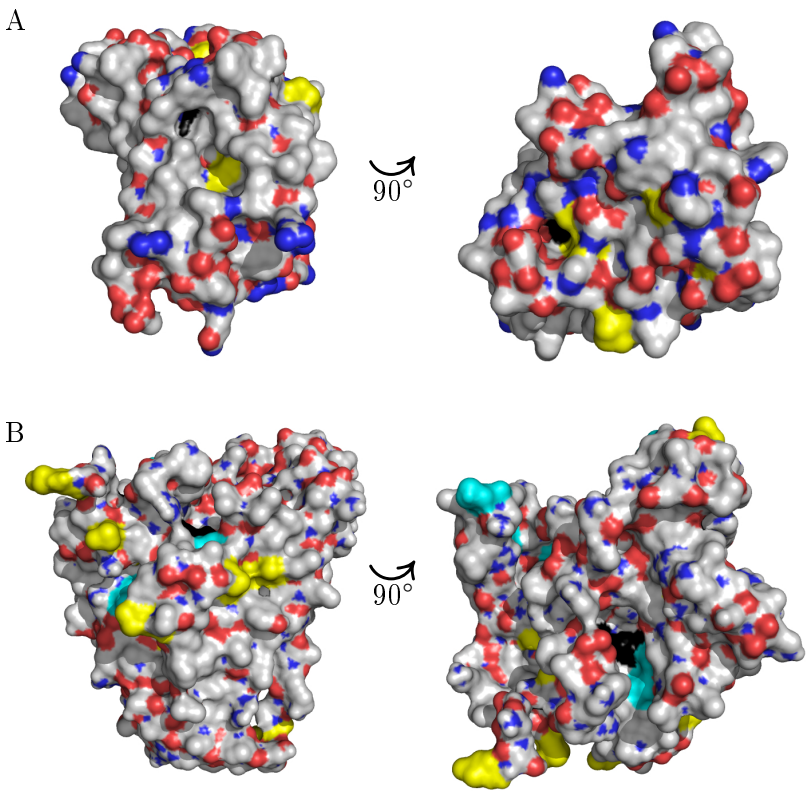


Abbildung 45: Abbildung 45: Oberflächenmodell der RLP1 und der GlpG

Bei diesem Oberflächenmodell ist links die Ansicht in der Membranebene und rechts die Aufsicht gezeigt. Rot sind Sauerstoffatome, blau Stickstoffatome markiert. Alle anderen Atome sind weiß. Die Aminosäure Methionin ist vollständig in gelb dargestellt. Die Cysteine sind cyan. Schwarz wurden die katalytisch aktiven Aminosäuren Serin und Histidin markiert.
A - Röntgenkristallstruktur der *Ec*GlpG, B - Modell der *Rc*RLP1; Darstellungsart: Oberflächenmodell

3.8.4 Analyse des aktiven Zentrums

Die modellierte Struktur konnte einen Einblick in das mögliche aktive Zentrum der RLP1 geben. Die aktiven Zentren von GlpG und RLP1 sind in Abb. 46 graphisch dargestellt.
Die Bindungstasche für das Substrat ist in beiden Strukturen in Aufbau und Ladung sehr ähnlich (Abb. 46A). Die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin erscheinen in der Struktur bei beiden Proteine an der gleichen Stelle (bei GlpG S201 und H254, RLP1 S234 und H290). Ebenso sind die Aminosäuren, welche die katalytisch aktiven Aminosäuren umgeben und hoch konserviert sind, gleich positioniert. Lediglich ein Histidin (bei GlpG H145, RLP1 H170) ist leicht verschoben. Das Cystein an Position 179 der RLP1 zeigt wie das hochkonservierte Asparagin N154 der GlpG in die gleiche Richtung. Aufgrund der sehr starken Ähnlichkeit der aktiven Zentren zwischen der Röntgenkristallstruktur der GlpG und dem Modell der RLP1 entspricht höchstwahrscheinlich zumindest dieser Teil der Struktur der

nativen Faltung. Sichere Daten kann man jedoch nur mit einer Röntgenkristallstruktur von RLP1 erhalten.

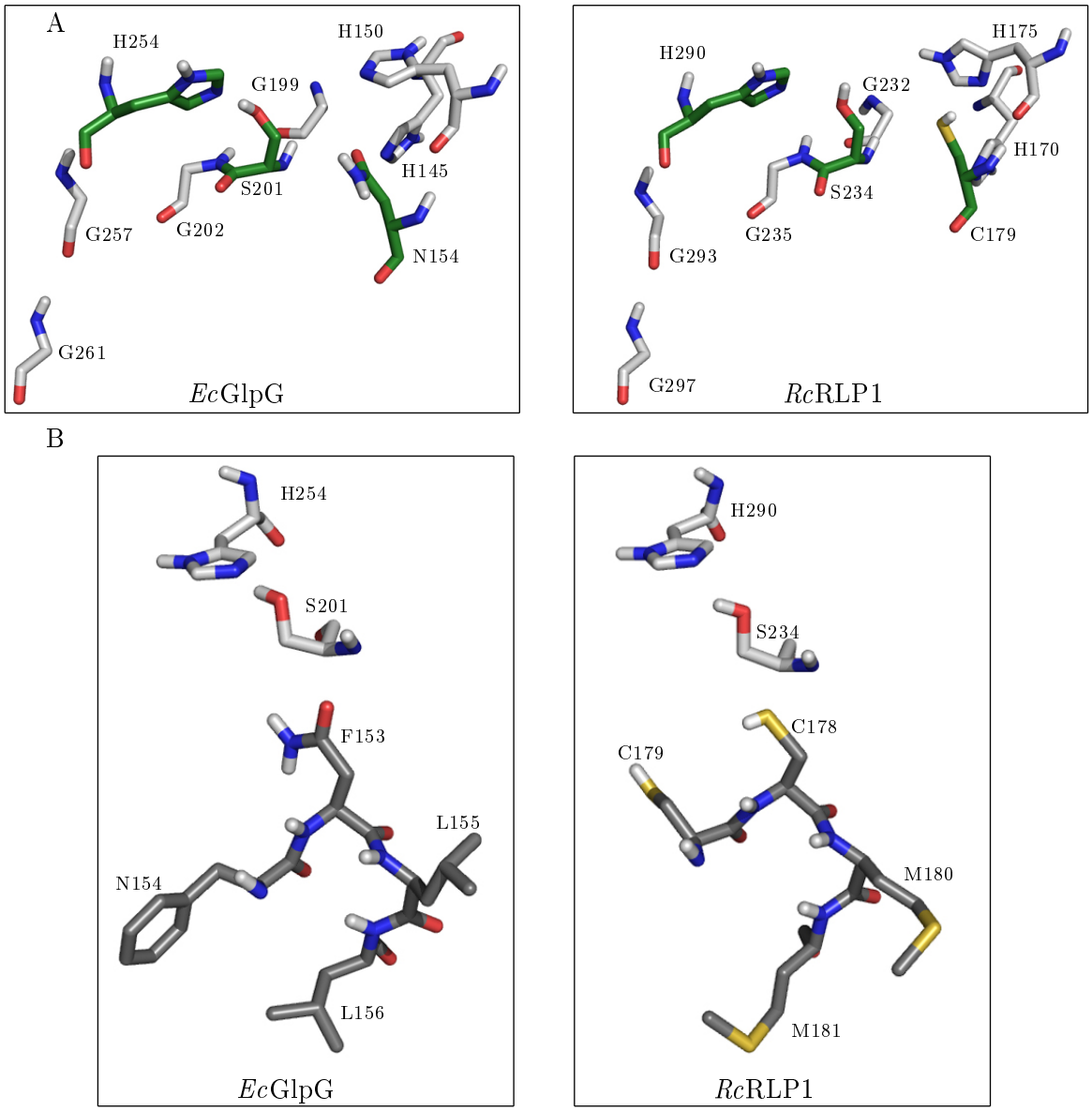


Abbildung 46: Abbildung 46: Vergrößerte Strukturansicht der *Ec*GlpG und *Rc*RLP1 im aktiven Zentrum

Einzelne Aminosäuren der in Abb. 44 bereits gezeigten Strukturen sind vergrößert dargestellt. In Teilabbildung A wurde der Fokus auf die katalytisch aktiven Aminosäuren und das hoch konservierte Asparagin bzw. das untypische Cystein gelegt. Diese Aminosäuren sind grün markiert. Zusätzlich wurden die am stärksten konservierten Aminosäuren in der Umgebung der eben genannten in grau einbezogen. Teilabbildung B zeigt das hoch konservierte Asparagin bzw. das Cystein mit den in der Primärstruktur direkt angrenzenden Aminosäuren in dunkelgrau. In hellgrau wurden dazu die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin abgebildet. Abgesehen von den Kohlenstoffatomen folgen alle anderen dem folgenden Farbcode: Wasserstoff - weiß, Sauerstoff - rot, Stickstoff - blau, Schwefel - gelb.
Darstellungsart: Aminosäuren im Stäbchenmodell

3.8.5 Kristallisierung der RLP1

Da noch viele die Struktur von RLP1 betreffende Fragen offen sind, könnte die Röntgenkristallstruktur der RLP1 Klarheit schaffen. So könnte man unter anderem die genaue Lage der Transmembrandomänen bestimmen. Zusätzlich könnte die Struktur der weniger konservierten *Loop*s sowie die des N-Terminus gelöst werden. Am interessantesten wäre aber eine kristallografische Analyse des aktiven Zentrum, um weitere Hinweise zur Aktivität der RLP1 und zum Reaktionsmechanismus sowie zur Funktion der RLP1 besonders in Hinsicht auf das Cystein 179 zu erhalten.
Aufgrund der bereits kristallisierten *Ec*GlpG kann man sich experimentell an den Publikationen von beispielsweise Wang *et al.* (2006) und Wu *et al.* (2006) orientieren. Diese Gruppen verwendeten einen N-terminalen His-Tag zur heterologen Expression in *E. coli* und zur anschließender Reinigung der Protease.
Die RLP1 sollte in einem ähnlichen System (in *E. coli*) heterolog exprimiert und über Ni-NTA gereinigt werden. Hierfür war ein Expressionskonstrukt notwendig, welches möglichst eine hohe Expressionsrate und viel Protein lieferte. Wichtig dabei ist, dass die Codons der *RLP1* häufig genug vom exprimierenden Organismus genutzt werden. In verschiedenen Spezies stehen unterschiedlich häufig tRNA mit Anticodons von Aminosäuren, die durch mehrere Codon kodiert werden können, zur Verfügung (Fredrick & Ibba, 2010). Daher musste zunächst mit dem Programm "graphical codon usage analyser 2.0"die Codon-Wahrscheinlichkeit der cDNA-Sequenz der *RLP1* untersucht werden. Die Häufigkeit der meisten in der Sequenz der *RLP1* enthaltenen Codons lag in einem Bereich, der für eine heterologe Expression nicht problematisch ist. Nur vier Codons wurden als grenzwertig eingestuft. Alle vier kodieren für Leucin (L45, L69, L125 und L155). Falls die heterologe Expression keinen ausreichenden Ertrag liefert, sollte eine Mutagenese dieser vier Leucin-Codons angeschlossen werden.
Es standen zwei Ausgangsvektoren zur Verfügung, mit denen einfach ein His-Tag N- bzw. C-terminal an das gewünschte Protein verknüpft werden konnte. Der Vektor pET-28b wurde für die N-terminale Fusion und der Vektor pET-41a für die C-terminale Fusion genutzt. Die Plasmide His-Rc$RLP1_{c}$-pET28 und Rc$RLP1_{c}$-His-pET41 zur heterologen Überexpression ist in Abb. 47 dargestellt.
Zur Expression standen zwei Zelllinien zur Verfügung. Der *Escherichia*-Stamm BL21-Gold unterlässt sämtliche Expression im uninduzierten Zustand. Jedoch kann es zu einem geringen Expressionsniveau kommen. Der Stamm BL21-Gold(DE3) erlaubt eine sehr hohe Expression, solange das Protein keine toxischen Eigenschaften gegenüber dem Stamm aufweist. Die Plasmide wurden in beide Stämme transferiert. Die positiven Transformanden zur Generierung von Proteinkristallen wurden für zukünftige Untersuchungen bereitgestellt.

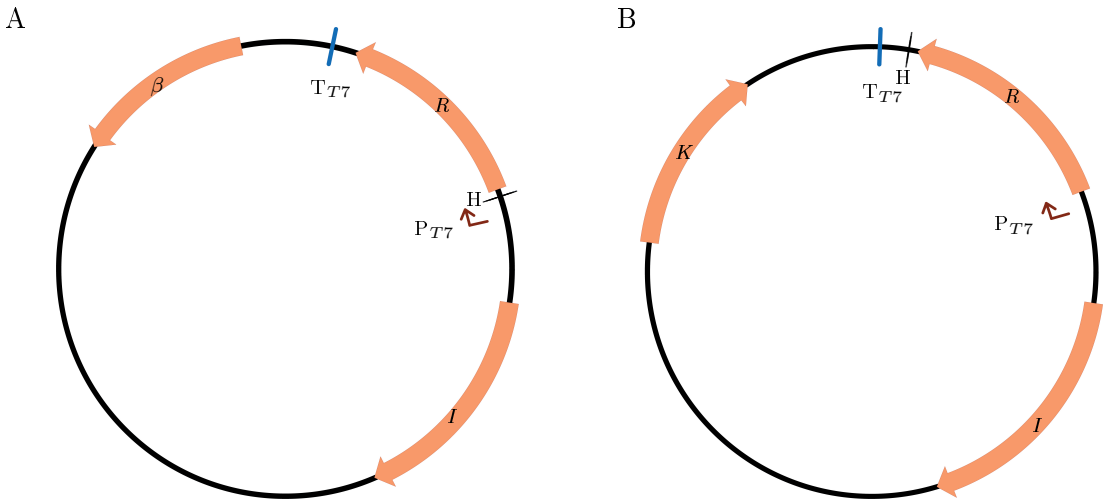


Abbildung 47: Abbildung 47: Schematische Darstellung der Plasmide His-Rc*RLP1*$_c$-pET28 und Rc*RLP1*$_c$-His-pET41

A - Schema von Plasmid His-Rc*RLP1*$_c$-pET28, B - Schema des Vektors Rc*RLP1*$_c$-His-pET41
β - Gen der β-Laktamase zur Ampicillinresistenz, *K* - Kanamyzin-Resistenzgen, P$_{T7}$ - T7-Promotor gefolgt vom Operator, *R* - cDNA-Sequenz der Rc*RLP1*, H - His Tag in Leserichtung zur Rc*RLP1*, T$_{T7}$ - T7-Terminator, *I* - Gen des Repressorproteins LacI

3.9 Aktivitätsanalysen in *E. coli*

Die Aktivität eines Enzyms weist man idealerweise in der Spezies nach, in der das Enzym produziert wird, also im genuinen Organismus. Da das genuine Substrat der RLP1 unbekannt ist, müsste man für einen Aktivitätsnachweis in *Rhynchosporium* ein Substrat mit Signalpeptid künstlich generieren, was zeitintensiv und schwierig zu realisieren ist. Deshalb wurde ein für Rhomboid-ähnliche Proteasen schon bestehendes System in *E. coli* genutzt: die Komplementation der GlpG-Deletionsmutante (Maegawa *et al.*, 2005). Ein Fusionsprotein, bestehend aus einer N-terminalen β-Laktamase, der Transmembrandomäne der Laktosepermease und eines C-terminalen Maltose-bindenden Proteins, wird von GlpG prozessiert (Abb. 63). Dieses Fusionsprotein kann als mögliches Substrat für die RLP1 in Betracht gezogen werden. Denn es wurde schon gezeigt, dass verschiedene Rhomboid-ähnliche Proteasen in der Lage sind dieses Substrat zu prozessieren (Urban & Freeman, 2003; Urban & Wolfe, 2005; Strisovski *et al.*, 2009). Deshalb sollte die GlpG-Deletionsmutante mit der *RLP1* komplementiert und anschließend die Prozessierung des Fusionsproteins als künstliches Substrat analysiert werden.

3.9.1 Komplementation von GW170Δ*GLPG* mit Rc*RLP1*

Für die Komplementationsstudien wurde sowohl der *E. coli*-Wildtypstamm GW170 als auch die *Ec*GlpG-Deletionsmutante, GW170Δ*GLPG*, mit dem Plasmid (pGW88), welches das

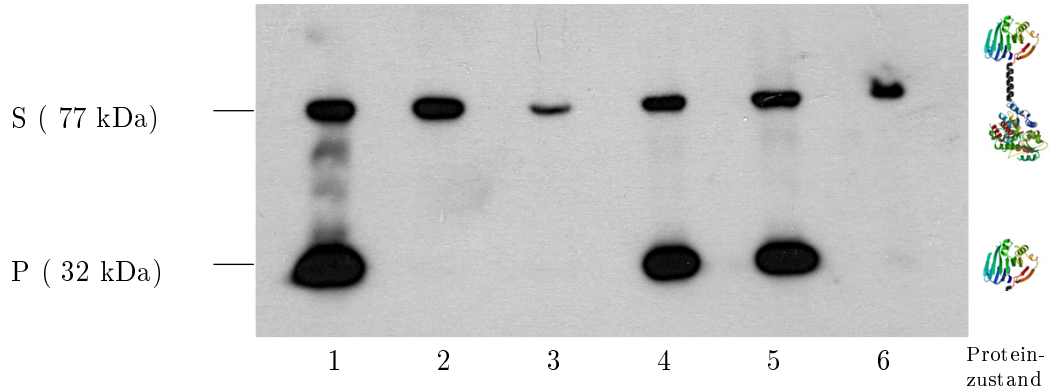


Abbildung 48: Abbildung 48: Immunodetektion des Fusionsprotein β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein mit anti-β-Laktamase-Antikörper

Die *E.-coli*-Zellen wurden 30 min induziert und in Probenpuffer lysiert. Jeweils 5 μL der Proben wurden auf dem SDS-Gel separiert. Die Immunodetektion erfolgte zunächst mit dem anti-β-Laktamase-Antikörper aus dem Hasen und anschließend mit einem anti-Hase-Antikörper aus der Ziege. Alle genutzten Transformanden enthielten das Plasmid mit der Sequenz des künstlichen Fusionsproteins β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein.
1 - GW170, 2 - GW170Δ*GLPG*, 3 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$-pBBR1MCS5, 4 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179N-pBBR1MCS5, 5 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179A-pBBR1MCS5, 6 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C178A-pBBR1MCS5, S - unprozessiertes Fusionsprotein (Substrat), P - Spaltprodukt

Gen des künstlichen Substrats unter Kontrolle des LacZ-Promotors enthält, transformiert. Der Wildtyp-Stamm GW170 ist in der Lage, das künstliche Substrat (702 Aminosäuren, ca. 77 kDa) zu prozessieren, wodurch die β-Laktamase (293 Aminosäuren, ca. 32 kDa) ins Periplasma der Zelle freigesetzt wird. Das konnte anhand eines Immunonachweis mit einem anti-β-Laktamase-Antikörper aus dem Hasen nachgewiesen werden (Abb. 48). Die *GLPG*-Deletionsmutante, GW170Δ*GLPG*, produziert kein Produkt und kann somit keine β-Laktamase ins Periplasma entlassen. Das 32 kDa große Protein konnte nicht im Immunonachweis detektiert werden. Nun stellt sich die Frage, ob die *Rc*RLP1 die *GLPG*-Deletion komplementieren kann.
Für die Komplementation wurde ein Plasmid generiert, welches die cDNA-Sequenz der *RLP1* mit einem mit IPTG induzierbaren Promotor enthält (Abb. 49). Das Konstrukt wurde in GW170Δ*GLPG* transferiert und anschließend nach Induktion ein Immunonachweis angefertigt (Abb. 48). Die Komplemtation mit der *RLP1* zeigt keine Produktbildung, was in einer Bande bei ca. 32 kDa resultieren würde. Zur Kontrolle wurde die Expression mit Hilfe einer RT-PCR überprüft. Abb. 50 zeigt das Ergebnis der Multiplex-PCR. Es ist deutlich zu sehen, dass in den induzierten Zellen, welche das Konstrukt der Rc*RLP1* enthalten, diese exprimiert also höchstwahrscheinlich auch das Protein produziert wurde. Demzufolge ist die *Rc*RLP1 nicht in der Lage, das künstlich konstruierte Substrat β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein zu prozessieren.

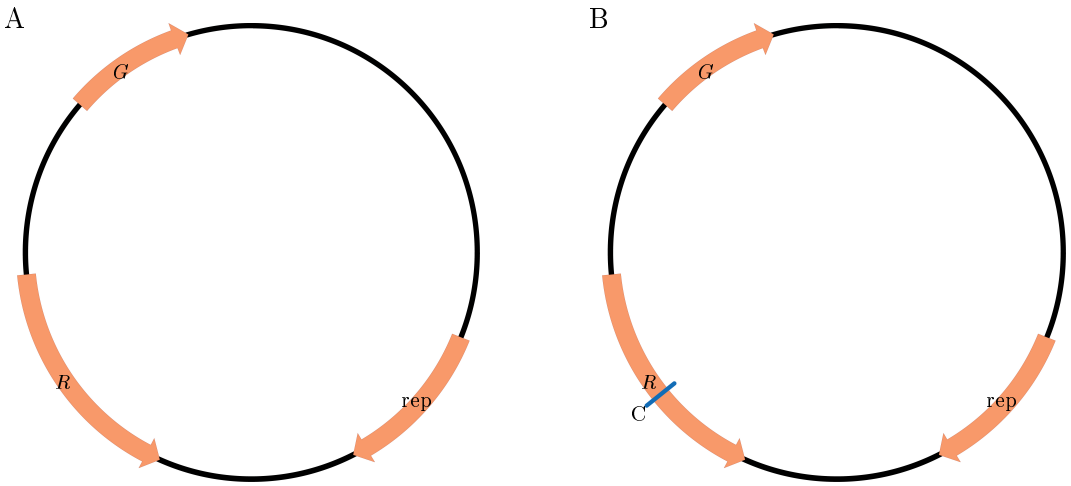


Abbildung 49: Abbildung 49: Schema der Expressionsvektoren der Rc*RLP1* zur Komplementation in *E. coli*

A - Rc*RLP1*$_c$-pBBR1MCS5, B - Position der Mutationen der Rc*RLP1* in den Vektoren Rc*RLP1*$_c$C179N-pBBR1MCS5, Rc*RLP1*$_c$C179A-pBBR1MCS5 und Rc*RLP1*$_c$C178A-pBBR1MCS5
G - Gentamyzinadenylyltransferase, *R* - cDNA-Sequenz der Rc*RLP1*, C - ungefähre Position der Cysteincodons für Aminosäure C178 und C179, rep - Replikationsursprung

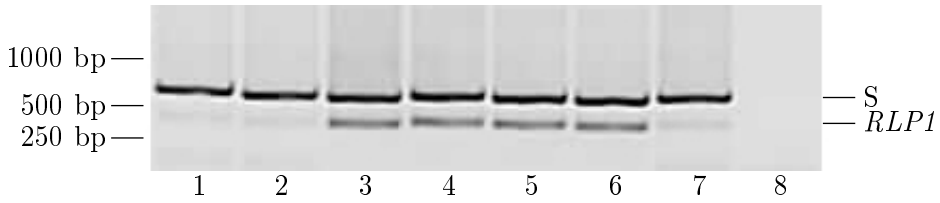


Abbildung 50: Abbildung 50: Expressionsanalyse der Komplementation von GW170Δ*GLPG*

Für die Multiplex-PCR wurde cDNA der gleichen Kulturen genutzt, welche für die Immunodetektion in Abb. 48 verwendet wurden. Als Kontrollfragment wurde die cDNA des künstlichen Substrates mit den Primer 91 und 92 (651 bp) amplifiziert. Die Rc*RLP1*-Expression wurde mit dem Primer-Paar 23 und 28 (362 bp) nachgewiesen.
1 - GW170, 2 - GW170Δ*GLPG*, 3 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$-pBBR1MCS5, 4 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179N-pBBR1MCS5, 5 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179A-pBBR1MCS5, 6 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C178A-pBBR1MCS5, 7 - pGW88 (Plasmid des künstlichen Substrates), 8 - Wasserkontrolle, S - Substrat

3.9.2 Aktivierung der RLP1 durch Punktmutation

Ein gravierender Unterschied zwischen der GlpG und der RLP1 liegt, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, in dem Cystein an Position 179 der RLP1 und dessen schwefelhaltiger Umgebung. Möglicherweise kann dieses Cystein die Prozessierung des künstlichen Substrates verhindern. Zum Nachweis der möglichen Inhibierung durch das Cystein, wurde in der RLP1 die Situation ähnlich der in GlpG geschaffen. Das Cystein wurde mit Hilfe von der genuinen Sequenz abweichender Primer zu einem Asparagin mutiert (Plasmid: Rc*RLP1*$_c$C179N-pBBR1MCS5). Da die GlpG auch aktiv ist, wenn das hochkonservierte Asparagin N154 zu einem Alanin mutiert wird, wurde zusätzlich ein Konstrukt generiert, welches in der Rc*RLP1* eine Punktmutation des Cysteins C179 zu einem Alanin enthält (Plasmid: Rc*RLP1*$_c$C179A-pBBR1MCS5). Nach dem Transfer in GW170Δ*GLPG* und anschließender Induktion mit IPTG wurde ebenfalls der Immunonachweis erbracht (Abb. 48). Man kann sehen, dass sowohl die C179N- als auch die C179A-Mutation eine Produktbildung zur Folge hat; dass heißt, durch die Punktmutation des C179 wird die RLP1 gegenüber dem künstlichen Substrat aktiv.
Ob die schwefelhaltige Umgebung dieser Position einen Einfluss auf die Aktivität gegenüber dem Substrat β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein oder nur das Cystein an Position 179 wurde mit einer Punktmutation in Cystein 178 experimentell überprüft. Das dafür konstruierte Plasmid Rc*RLP1*$_c$C178A-pBBR1MCS5 wurde wie in den anderen Fällen auch in GW170Δ*GLPG* transferriert (Abb. 48). Es konnte kein Protein der Größe des Produktes markiert werden. Demzufolge ist die Inaktivität gegenüber dem Fusionsprotein β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein allein dem Cystein 179 zuzuschreiben. Die Expression der Rc*RLP1*-Mutationen wurde als Kontrolle mit einer Multiplex-PCR nachgewiesen (Abb. 50).

3.10 Lokalisierung von *Rc*RLP1

Zur Einordnung der Funktion eines Proteins in den Stoffwechsel der Zelle ist es notwendig herauszufinden, an welchem Ort das Protein in der Zelle oder eventuell auch außerhalb gebraucht wird. Wie bereits in der Einleitung (1.3.6) erwähnt, gibt es für Rhomboid-ähnliche Proteasen in Eukaryoten (die nicht zu den Apicomplexa gehören) die Möglichkeit der Lokalisierung in der Membran des Golgi-Apparates oder in der inneren Membran von Mitochondrien.
Zur Identifizierung des Ortes können verschiedene Methoden *in silico*, *in vitro* und *in vivo* angewendet werden. Als *in-silico*-Analyse wurde ein Stammbaum erstellt (siehe Abschnitt 3.7). Daneben wurde mit verschiedenen Algorithmen die Existenz eines Signalpeptides vorhergesagt. Des Weiteren wurde das Protein *in vitro* mit isolierten Mitochondrien inkubiert und als Fusion mit GFP *in vivo* lokalisiert.

Prognose-Algorithmus	Lokalisierung in			
	Zytoplasma	ER	Mitochondrien	Chloroplasten
TargetP1.1 (np)	0,189		0,668	
WoLFPSORT	20	3	2	
SubLoc v1.0			94%	
CELLO	0,015	0,008	0,217	0,128
MitoProtII v1.101			0,9314	
URGI Predotar (np)	0,99	0,01		
URGI Predotar (p)	0,36	0,03	0,01	0,63

Tabelle 13: Tabelle 12: Vorhersage der Lokalisierung von *Rc*RLP1 in verschiedenen Kompartimenten

(np) - Eingabewahl als nicht-pflanzliche Sequenz, (p) - Eingabewahl als pflanzliche Sequenz

3.10.1 Prognose einer möglichen mitochondrialen Lokalisierung

Für alle Rhomboid-ähnlichen Proteasen des PARL-Typs wurde eine mitochondriale Lokalisierung vermutet. In Untersuchungen mit verschiedenen Programmen zur Vorhersage der intrazellulären Lokalisierung, wie zum Beispiel TargetP1.1, wiesen alle PARL-Typ-Proteasen eine hohe Wahrscheinlichkeit der Lokalisierung in der inneren mitochondrialen Membran auf (Lemberg & Freeman, 2007). Bei einigen Rhomboid-ähnlichen Proteasen wie zum Beispiel *Dm*RHO7 (McQuibban *et al.*, 2006), *Hs*PARL (Sík *et al.*, 2004) und *Sc*PCP1 (McQuibban *et al.*, 2003) wurde dies mit experimentellen Daten bestätigt, weshalb eine mitochondriale Lokalisierung für alle PARL-Typ-Proteasen angenommen wird.
In dieser Arbeit wurde die RLP1 mit zum Teil den gleichen wie auch mit weiteren Prognoseprogrammen auf ihre mutmaßliche Lokalisierung hin untersucht (Tab. 12). Die Analyse ergab mit drei Programmen die hohe Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisierung. WoLFPSORT prognostiziert RLP1 als zytoplasmatisches Protein. Bei URGI Predotar kann man zwischen pflanzlicher und nicht pflanzlicher Sequenz entscheiden. Wählt man nicht pflanzliche Sequenz für die RLP1, so erhält man eine rein zytoplasmatische Lokalisierung. Im Gegensatz dazu prognostiziert das Programm bei Eingabe einer pflanzlichen Sequenz für RLP1 eine hohe Wahrscheinlichkeit zur chloroplastidären Lokalisierung. Vom Programm CELLO wird RLP1 ebenso als chloroplastidär eingestuft, wobei zusätzlich eine höhere Wahrscheinlichkeit zum mitochondrialen Import angegeben wird. *R. commune* ist ein Pilz und enthält keine Chloroplasten. Aus den *in-silico*-Analysen ist demnach ein mitochondrialer Import trotz der Prognose von WoLFPSORT sehr wahrscheinlich.

3.10.2 Importstudien an isolierten Organellen aus Erbse (*Pisum sativum* L.)

Nach der *in-silico*-Prognose einer mitochondrialen Lokalisierung der RLP1 sollten zunächst weitere Hinweise des Imports in die Mitochondrien erhalten werden, bevor aufwendige Fusionskonstrukte generiert und Lokalisierungsstudien *in vivo* durchgeführt werden. Eine schnelle Möglichkeit ergab sich aus einer Kooperation mit Prof. Dr. R. B. Klösgen (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie, Abteilung Allgemeine Botanik). Die Inkubation *in vitro* synthetisierten Proteins mit aus der Erbse isolierten Mitochondrien sollte Aufschluss über eine mögliche Translokation in diese Organellen geben.
Zunächst wurde ein Plasmid, cRc*RLP1*-pBAT, generiert (Abb. 51). Mit diesem Plasmid kann die RLP1 unter dem T3-Promotor *in vitro* synthetisiert werden. Die 3-*globin leader*-Sequenz des β-Globins vom Hasen soll eine reibungslose Translation unterstützen und verstärken (Annweiler *et al.*, 1991).

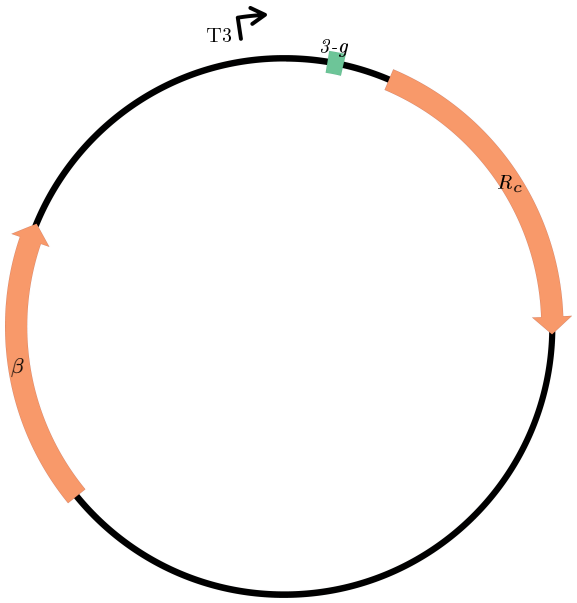


Abbildung 51: Abbildung 51: Schematische Darstellung des Plasmids cRc*RLP1*-pBAT

T3 - T3-Promotor, *3-g* - 3-*globin leader*-Sequenz vom Hasen, R_c - cDNA-Sequenz von Rc*RLP1*, β - β-Laktamase für Ampicillin-Resistenz

Die Importstudien mit *in vitro* translatierter RLP1 wurden nach Rödiger *et al.* (2010) durchgeführt. Dafür wurden Mitochondrien und Chloroplasten aus der Erbse isoliert und angereichert. Diese wurden anschließend mit radioaktiv markierter RLP1 inkubiert. Die Hälfte des Ansatzes wurde anschließend mit einer Protease behandelt, um unspezifische Bindungen des Proteins sichtbar zu machen. Die folgende Auftrennung *via* SDS-PAGE und radiologischer Detektion ist in Abb. 52 dargestellt. Aufgrund der membranständigen Topologie von RLP1 ist das radioaktiv markierte Protein nicht in einer scharfen Bande angeordnet. Es ist aber

deutlich zu sehen, dass die markierte RLP1 an Mitochondrien bindet. Nach der Proteasebehandlung der Organellen ist noch eine leichte Bande und somit keine unspezifische Bindung, sondern ein möglicher Import zu erkennen. Diese Studien reichen als weiterer Hinweis zur mitochondrialen Lokalisierung der RLP1 aus. Die Funktionalität des Signalpeptids *in vivo*, also die Translokation des Proteins in die Mitochondrien, kann nur eine Proteinfusion zeigen.

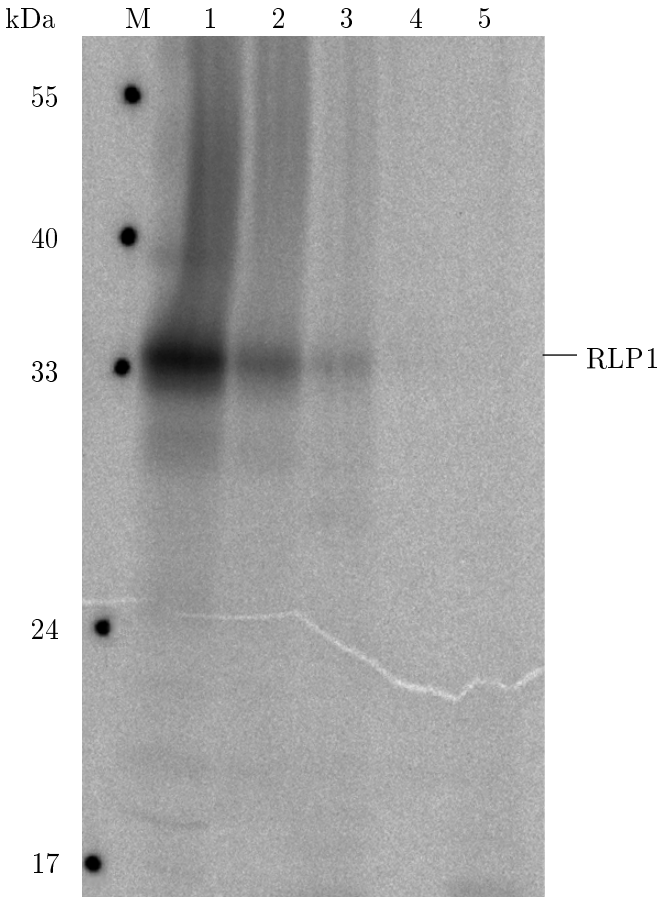


Abbildung 52: Abbildung 52: Inkubationsversuch *in vitro* translatierter RLP1 mit isolierten Organellen

Dieses Experiment wurde nach Rödiger *et al.* (2010) durchgeführt. 1 - radioaktiv markiertes *in vitro* translatiertes RLP1, 2 - Inkubationsansatz der Mitochondrien mit der RLP1 aus Spur 1 ohne Proteasebehandlung, 3 - Inkubationsansatz der Mitochondrien mit RLP1 und anschließender Proteasebehandlung, 4 - Inkubationsansatz der Chloroplasten mit RLP1 ohne Proteasebehandlung, 5 - Inkubationsansatz der Chloroplasten mit RLP1 mit anschließender Proteasebehandlung, M - radioaktiv markierter Größenstandard

3.10.3 N-terminale Fusion des *Rc*RLP1 Proteins an *Ave*GFP

Zur subzellulären Lokalisierung der RLP1 als Fusionsprotein wurde zunächst ein Konstrukt generiert, welches unter der Kontrolle des *GPD*-Promotors aus *A. nidulans* den vollständigen *RLP1*-Leserahmen als C-terminale Fusion mit Ave*GFP* enthält (Abb. 53A).

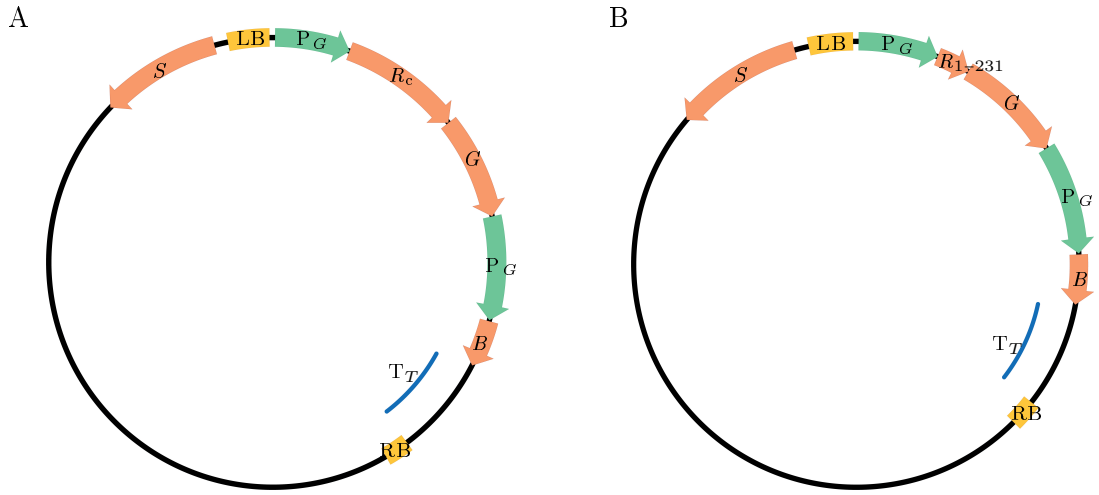


Abbildung 53: Abbildung 53: Schematische Darstellung der Plasmide Rc*RLP1*::Ave*GFP*-pPZP200 und Rc*RLP1* 1-231::Ave*GFP*-pPZP200

Die Konstruktion des Plasmids in im Anhang Z.3.3 dargestellt. A - Rc*RLP1*::Ave*GFP*-pPZP200, B - Rc*RLP1* 1-231::Ave*GFP*-pPZP200
S - Spectinomyzin-Resistenzkassette, LB - *left border*, P_G - $P_{An GPD}$, R_c - cDNA-Sequenz von Rc*RLP1*, R_{1-231} - Nukleotid 1 - 231 der kodierenden Sequenz von Rc*RLP1*, die den ersten 77 Aminosäuren entspricht, *G* - Ave*GFP*, T_T - $T_{An TRPC}$, *B* - Phleomyzin-Resistenzkassette aus *E. coli*

Durch ATMT wurde das Plasmid Rc*RLP1*::Ave*GFP*-pPZP200 in das Wildtypisolat UK7 transferiert. Die selektierten Transformanden sollten nun das Fusionsprotein RLP1::eGFP exprimieren.
Nach Anregung mit UV-Licht gibt das GFP-Molekül Licht mit einem Emissionsmaximum von 509 nm ab. Mit einem polarisierten Filter konnte nun die Lichtemission des GFP an einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Einige Mikroskopie-Bilder sind repräsentativ in Abb. 54 abgebildet. In keiner der untersuchten Transformanden konnte jedoch eine ausreichende Fluoreszenz detektiert werden.

Da es sich hierbei um eine Fusion der kompletten RLP1 mit dem eGFP-Protein handelt, konnte das Fusionsprotein (647 AS) möglicherweise aufgrund einer ungünstigen Faltung oder eines erhöhten Abbaus des Proteins nicht nachgewiesen werden. Die Struktur aus mehreren Transmembrandomänen kann ebenso ein Störfaktor für eine erfolgreiche Fluoreszenz darstellen. Eine weitere Möglichkeit besteht auch darin, dass zwar die mRNA in ausreichender Menge vorhanden ist, das Protein aber nur in sehr kleinen Konzentrationen synthetisiert

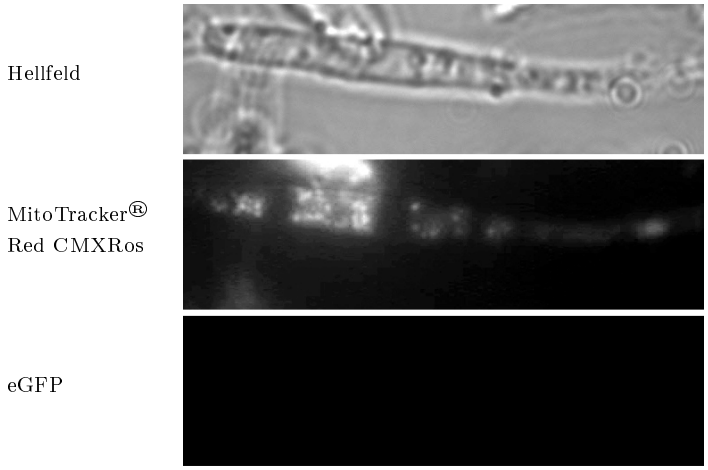


Abbildung 54: Abbildung 54: Mikroskopie von Rc*RLP1*::*eGFP*-pPZP200

Fünf verschiedene Transformanden wurden mikroskopisch analysiert, von denen hier exemplarisch eine dargestellt ist. Die Hellfeld-Aufnahme wurde mit weißem Licht und ohne Polarisationsfilter produziert. Der MitoTracker® Red CMXRos-Farbstoff fluoresziert spezifisch in den Mitochondrien.

wurde. Dadurch erscheint die Abwesenheit einer detektierbaren Fluoreszenz plausibel.
Um eine Störung der Translation bzw. Faltung zu minimieren, wurde ein neues Fusionsprotein generiert. Dieses besteht aus dem N-Terminus der RLP1 (Aminosäure 1 - 77) und dem eGFP (Abb. 53B). Die Herstellung des Plasmids Rc*RLP1*$_{1\text{-}231}$::Av*eGFP*-pPZP200 ist im Anhang Z.3.3 erläutert.
Das Plasmid Rc*RLP1*$_{1\text{-}231}$::Av*eGFP*-pPZP200 wurde ebenfalls in das Wildtypisolat UK7 transferiert. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse (Abb. 55) der erhaltenen Transformanden zeigte eine starke eGFP-Fluoreszenz, die sich auf bestimmte Kompartimente fokussierte. Ob es sich bei diesen Kompartimenten um Mitochondrien handelte, sollte eine simultane Färbung der Hyphen mit einem Mitochondrien-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff (MitoTracker® Red CMXRos, ein Rosaminderivat, von Invitrogen) zeigen. Dieser Farbstoff wird durch Licht im Bereich um 560 nm angeregt und emittiert anschließend Licht mit dem Emissionsmaximum von 599 nm. Mit Hilfe der Software AxioVision LE konnten die Lichtemission des eGFP und die des mitochondrialen Farbstoffes übereinandergelegt werden. Sowohl die Fluoreszenz des eGFP als auch die des Rosaminderivates konnten im gleichen Kompartiment detektiert werden. Demzufolge wird das Fusionsprotein RLP1$_{1\text{-}77}$::eGFP höchstwahrscheinlich in oder an die Mitochondrien transportiert.
Die eindeutige Lokalisierung sollte nun eine Immuno-Gold-Markierung in den Transformanden UK7-Rc*RLP1*$_{1\text{-}231}$::Av*eGFP*-pPZP200 mit einem anti-eGFP-Antikörper aus der Ziege zeigen. Die Methode wurde wie von Hause & Jahn 2010 beschrieben durchgeführt. In der Abb. 56 sind einige elektronenmikroskopische Bilder dargestellt. Die unspezifischen Markierungen entstanden fast ausschließlich an den Zellwänden, was bei dem genutzten Antikörper

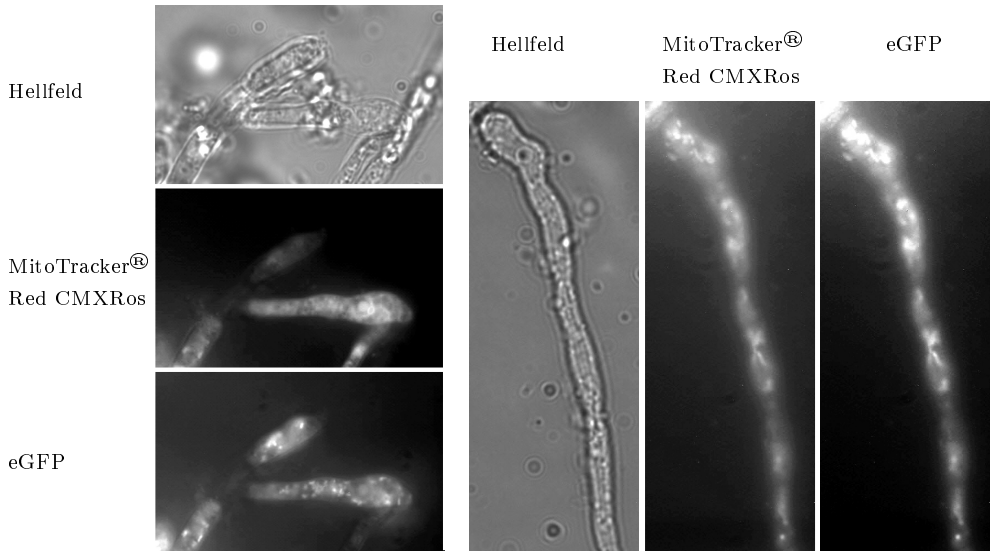


Abbildung 55: Abbildung 55: Mikroskopie von UK7-Rc*RLP1* $_{1\text{-}231}$::Av*eGFP*-pPZP200

Fünf verschiedene Transformanden wurden mikroskopisch analysiert. Exemplarisch sind hier zwei der fünf dargestellt. Die Hellfeld-Aufnahme wurde mit weißem Licht und ohne Polarisationsfilter produziert. Der MitoTracker® Red CMXRos-Farbstoff fluoresziert spezifisch in den Mitochondrien.

häufig beobachtet wurde. Es ist trotzdem klar eine mitochondriale Lokalisierung zu erkennen.

3.11 Untersuchungen zur möglichen Funktion der RLP1 in Mitochondrien

Die mitochondriale Lokalisierung lässt auf eine ähnliche Funktion wie die anderer mitochondrialer Rhomboid-ähnlicher Proteasen schließen. Eine sehr gut untersuchte Protease des PARL-Typs ist die PCP1p aus *S. cerevisiae*.
Bei einer *PCP1*-Deletion der Hefe (ΔSc*PCP1*) kann man mehrere Phänotypen beobachten. Neben einem langsameren Wachstum (McQuibban *et al.*, 2003) konnten in der Deletionsmutante fragmentierte Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Mitochondrien waren defekt in der Fusionsmaschinerie (Herlan *et al.*, 2003). Nach Untersuchungen der Mitochondrien der Transformande UK7-*RLP1* $_{trunc}$ unterschieden sich jedoch nicht im Aufbau von denen des Wildtyps UK7 (nicht abgebildet). Dies wurde durch Elektronenmikroskopie beobachtet. Jedoch konnten aufgrund der unterschiedlichen Lage der Mitochondrien und der verschiedenen Ebenen des Präparates nicht genau die Größe der Mitochondrien untersucht werden.
Als weitere Eigenschaft hat Δ Sc*PCP1* die Fähigkeit verloren, nicht-fermentierbare Kohlenstoffverbindungen verarbeiten zu können. Experimentell wurde das mit einem Tüpfeltest auf Glukose bzw. Glyzerin als einziger Kohlenstoffquelle gezeigt. Das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffen wie Glyzerin konnte durch Komplementierung mit dem

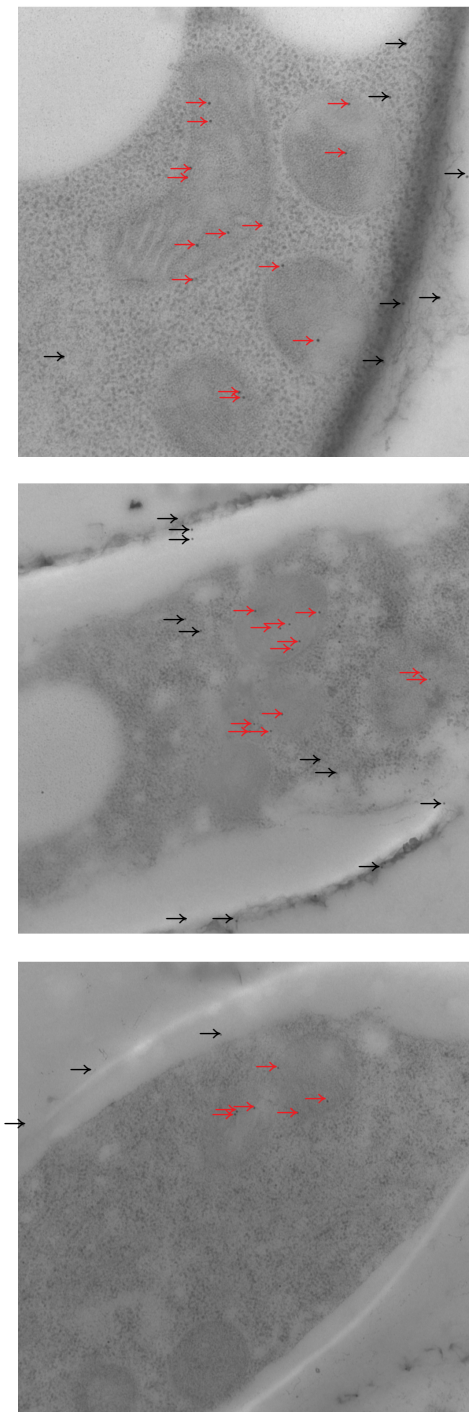


Abbildung 56: Abbildung 56: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von UK7-Rc*RLP1*$_{1\text{-}231}$::Av*eGFP*-pPZP200 nach Immunogold-Markierung mit einem anti-eGFP-Antikörper

Die Immunogold-Markierung mit dem anti-eGFP-Antikörper erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild als elektronendichte also schwarze Markierungen. Die meisten Markierungen sind in den Mitochondrien zu verzeichnen und deshalb mit roten Pfeilen hervorgehoben. Die Markierungen außerhalb der Mitochondrien wurden mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet und stellen unspezifische Bindungen des Antikörpers dar.

Spaltprodukt sMGM1p wiederhergestellt werden. Demzufolge beruht dieser Phänotyp auf der Spaltung von MGM1p zu sMGM1p und ist von letzterem abhängig (Herlan *et al.*, 2004). Um einen möglichen analogen Effekt der RLP1 auf das Pilzwachstum zu untersuchen, wurden der Wildtyp UK7 und UK7-$RLP1_{trunc}$ auf Minimalmedium für *R. commune* mit Glukose bzw. Glyzerin als einziger Kohlenstoffquelle angezogen. Sowohl der Wildtyp UK7 als auch die Mutante waren in der Lage, auf beiden Kohlenstoffquellen Myzel zu bilden. Das Wachstum in dem nährstoffarmen Medium war sehr langsam, so dass selbst vier Wochen nach Beginn des Experimentes sehr wenig Myzel zu beobachten war. Das Myzel der beiden Pilze wies jedoch eine unterschiedliche Färbung auf (Abb. 57). Die helle Myzelfärbung des Wildtyp-Isolates UK7 unterscheidet sich in beiden Medien kaum. Dagegen ist das Myzel der Transformande UK7-$RLP1_{trunc}$ deutlich bräunlich verfärbt. Die Färbung war sogar stärker im Glyzerin-haltigen Medium.

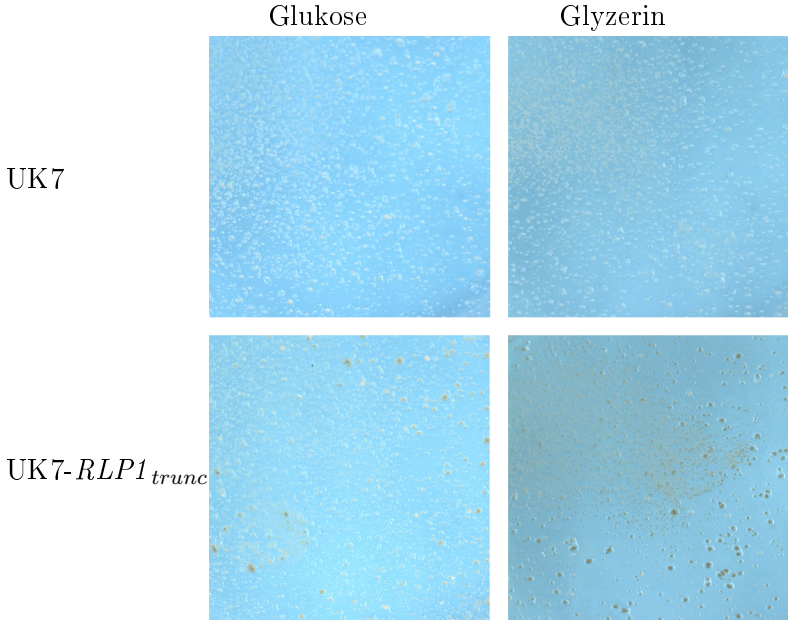


Abbildung 57: Abbildung 57: Wachstumsvergleich der *R. commune*-Stämme UK7 und UK7-*RLP1* $_{trunc}$ auf Glukose und Glyzerin

Es wurden 10^5 Sporen von UK7 bzw. UK7-*RLP1* $_{trunc}$ mit 50 mL Mininmalmedium für *R. commune* mit entweder Glukose oder Glyzerin für 28 Tage inkubiert. Es wurde kein Myzel auf der Mediumoberfläche gebildet. Die Fotos enstanden nach Entfernen des Mediums.

Trotz des schwachen Phänotyps von UK7-*RLP1* $_{trunc}$ auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen könnte die RLP1 in der Lage sein, *Sc*MGM1p als Substrat zu prozessieren. Demnach müsste die RLP1 den Effekt der Deletion von Δ*Sc*PCP1 komplementieren. Experimentell wurde dafür Δ*Sc*PCP1 mit der cDNA-Sequenz der *RLP1* unter der Kontrolle des Promotors der Alkoholdehydrogenase aus *S. cerevisiae* transformiert. Dieser Promotor wurde gewählt, um eine Expression auch auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu garantieren. Das genutzte Plasmid, P$_{ADH}$-Rc*RLP1* $_c$-T$_{ADH}$-YEplac181, ist in Abb. 58 dargestellt. Die erhaltenen Transformanden wurden dem gleichen Tüpfeltest wie Δ*Sc*PCP1 von Herlan *et al.* (2004) unterzogen (Abb. 59). Das Wachstum auf dem fermentierbaren Kohlenwasserstoff Glukose wurde durch die Komplementierung nicht beeinflusst. Ebenso unbeeinflusst ist das Wachstum der mit *RLP1* komplementierten Deletionsmutante Δ*Sc*PCP1 auf Glyzerin-haltigen Medium. Demzufolge wird *Sc*MGM1p nicht als Substrat von der RLP1 akzeptiert. Betrachtet man nun den auffälligsten Unterschied der RLP1 zu allen anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen, das Cystein an Position 179, so könnte eine Mutation des Cysteins zur Spaltung von *Sc*MGM1p führen. Die Komplementation mit der RLP1C179N bzw. RLP1C179A führt jedoch ebenfalls zu keinem Wachstum auf nicht-fermentierbarem Kohlenstoff. Das Gleiche konnte bei der Komplementation von Δ*Sc*PCP1 mit *Rc*RLP1C178A beobachtet werden. Demzufolge ist die RLP1 nicht in der Lage, die *Sc*MGM1p zu spalten. Mutationen der

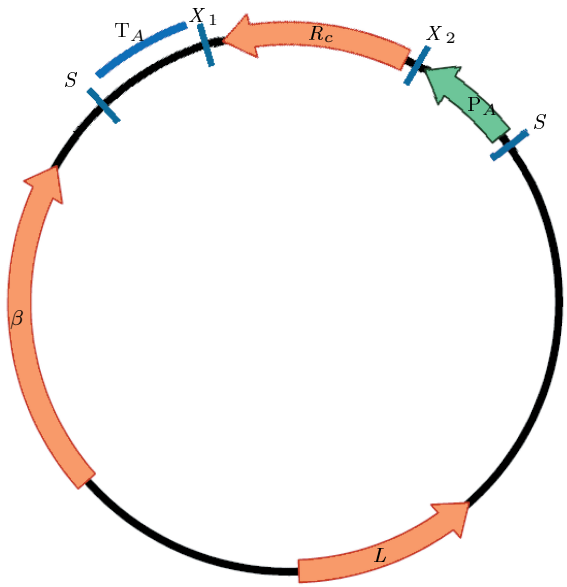


Abbildung 58: Abbildung 58: Schematische Darstellung des Plasmids P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181

P_A - P_{ADH}, R_c - cDNA-Sequenz von Rc*RLP1*, T_A - T_{ADH}, L - Leucin-Selektionsmarker, β - β-Laktamase, X_1 - *Xba* I, X_2 - *Xho* I, S - *Sph* I

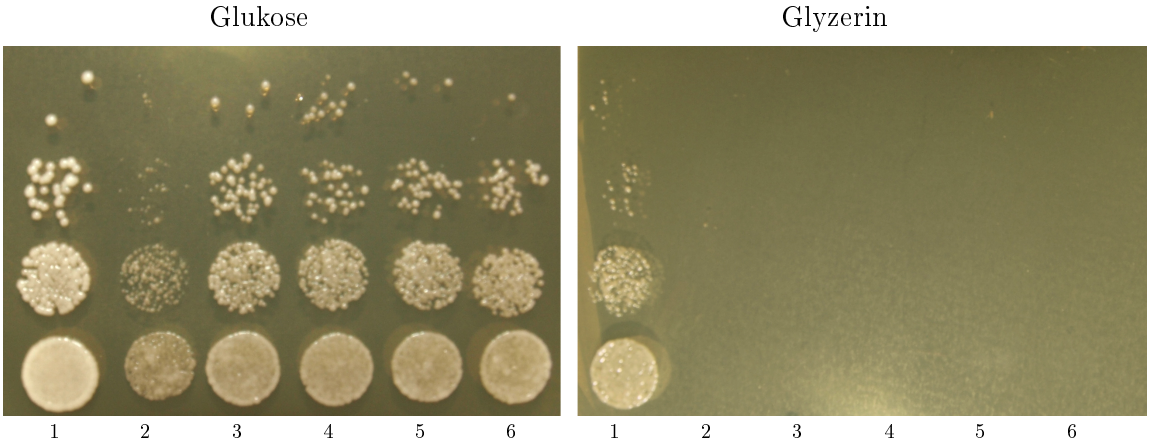


Abbildung 59: Abbildung 59: Wachstumsvergleich der Komplementationsmutanten von ΔSc*PCP1* auf Glukose und Glyzerin

Der Tüpfeltest wurde nach Herlan *et al.* (2004) durchgeführt. Ein Teil der angezogenen Zellen wurde zur Überprüfung der Expression der Rc*RLP1* genutzt (Abb. 60).
1 - BY4741, 2 - Δ Sc*PCP1*, 3 - Δ Sc*PCP1*-P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181, 4 - Δ Sc*PCP1*-P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$C179N-T_{ADH}-YEplac181, 5 - Δ Sc*PCP1*-P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$C179A-T_{ADH}-YEplac181, 6 - Δ Sc*PCP1*-P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$C178A-T_{ADH}-YEplac181

Cysteine an den Positionen 178 und 179 können die Inaktivität gegenüber *Sc*MGM1p nicht ändern. Als Kontrolle wurde die Expression des Genkonstrukts der *RLP1* in den Komplementationsmutanten nachgewiesen (Abb. 60). Hierfür wurden die gleichen Hefekulturen genutzt, die beim Tüpfeltest Verwendung fanden. Als Referenz wurde hierbei Sc*ACT1*, kodierend für Aktin, aus der Hefe genutzt. Das Transkript der RLP1 und ihrer Derivate konnte in den Kulturen detektiert werden. Der Befund, dass die RLP1 ΔSc*PCP1* nicht komplementieren kann, liegt demzufolge nicht an einer fehlenden Expression, sondern ist höchstwahrscheinlich auf die RLP1 selbst zurückzuführen.

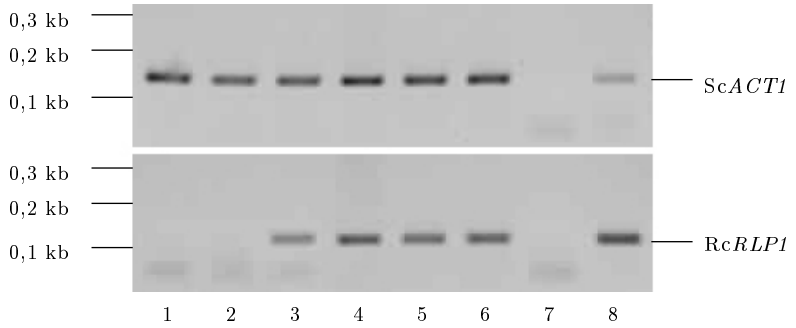


Abbildung 60: Abbildung 60: Expressionsanalyse in den Komplementationsmutanten von ΔSc*PCP1*

Diese Abb. zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen PCR auf cDNA. Für die obere wurden die Primer 80 und 81 (133 bp) zur Amplifikation des Sc*ACT1*-Transkripts genutzt. Das Amplifikationsprodukt der Rc*RLP1* im unteren Teil der Abb. entstand durch die Primer 25 und 28 (107 bp). $T_A = 55$℃, $t_s = 30$ sec
Matrizen-DNA: 1 - cDNA vom Wildtyp (BY4741), 2 - cDNA von ΔSc*PCP1*, 3 - cDNA von ΔSc*PCP1*-P_{ADH}-*RLP1*-T_{ADH}-YEplac181, 4 - cDNA von ΔSc*PCP1*-P_{ADH}-*RLP1* C179N-T_{ADH}-YEplac181, 5 - cDNA von ΔSc*PCP1*-P_{ADH}-*RLP1* C179A-T_{ADH}-YEplac181, 6 - cDNA von ΔSc*PCP1*-P_{ADH}-*RLP1* C178A-T_{ADH}-YEplac181, 7 - keine, 8 - genomische und Plasmid-DNA aus ΔSc*PCP1*-Vektor RLP1

3.12 Das Substrat der *Rc*RLP1?

Einer der kritischsten Punkte zur Charakterisierung der Rhomboid-ähnlichen Protease RLP1 ist die Frage nach dem Substrat. Unter der Annahme, dass die RLP1 eine aktive Rhomboid-ähnliche Protease ist, muss das Substrat mehrere Charakteristika erfüllen. Zum einen enthält es mindestens eine Transmembrandomäne und N-terminal ein mitochondriales Signalpeptid. Die Prozessierungsstelle kann nicht weiter definiert werden, außer dass sie sich meist nahe der Transmembranhelix befindet. Weiterhin muss das Substrat in die Bindungstasche des aktiven Zentrums der RLP1 passen, um prozessiert werden zu können.
Es sind erst wenige Substrate mitochondrialer Rhomboid-ähnlichen Proteasen bekannt, und diese weisen nur sehr wenige Gemeinsamkeiten auf, die für die Suche nach dem Substrat von Nutzen sein könnten.

3.12.1 Exprimierte mitochondriale Proteine mit Transmembrandomänen

Während des Entstehens dieser Arbeit wurde eine Datenbank exprimierter Gene (EST-Sequenzen) von *Rhynchosporium* entwickelt (Dr. Navarro-Quesada & Knogge, unveröffentlicht). Dafür wurde unterschiedlich gestresstes Myzel genutzt, um möglichst viele Gene zu erfassen. In den Sequenzen der Datenbank wurden über 22500 offene Leserahmen *in silico* entdeckt. Diese waren der Ausgangspunkt der folgenden Prognosen zur mitochondrialen Translokation und zur Identifizierung von Proteinen mit möglichen Transmembrandomänen. Zunächst wurde die EST-Datenbank auf mögliche mitochondriale Signalpeptide durchsucht. TargetP1.1 lieferte mit der Sequenz der RLP1 ein realitätsgetreues Ergebnis. Deshalb wurde die EST-Datenbank nach Ableitung der möglichen Aminosäuresequenzen mit dem Programm TargetP1.1 (Emanuelsson *et al.*, 2007) untersucht. Von den abgeleiteten Aminosäuresequenzen konnten bei 5135 eine mögliche mitochondriale Translokation zugeordnet werden. Dieses Programm gibt zusätzlich einen Verlässlichkeitsfaktor zwischen 1 (zuverlässig) und 0 (nicht verlässlich) an. Bei der Aminosäuresequenz der RLP1 lag dieser zwischen 0,6 und 0,4, so dass 0,4 als Schwellenwert für diese Analyse genutzt wurde. Insgesamt lag der Verlässlichkeitsfaktor von 2294 Sequenzen zwischen 1 und 0,4, welche nun in die weitere Analyse einbezogen wurden.
Zur Bestimmung der Anzahl an Transmembrandomänen wurde der TMMH-Algorithmus des Programmes TMMHM (Sonnhammer *et al.*, 1998; Krogh *et al.*, 2001) genutzt. Es wurden erneut alle von der EST-Datenbank abgeleiteten Aminosäuresequenzen untersucht. Bei 2736 Sequenzen konnten eine bis 14 Transmembrandomänen prognostiziert werden. Vergleicht man die 2736 Sequenzen, die mögliche Transmembrandomänen enthalten, mit den 2294 Sequenzen, die wahrscheinlich ein mitochondriales Importsignal am N-Terminus aufweisen, so konnten bei 455 Sequenzen beides *in silico* vorhergesagt werden. Daraus folgt, dass möglicherweise zwischen diesen 455 Sequenzen ein oder mehrere Substrate der RLP1 zu finden sind.
Die Identifizierung eines solchen Substrates in einer so großen Menge an Sequenzen gestaltet sich sehr schwierig. Ein Hinweis für ein Substrat könnte eine mögliche funktionale Domäne geben. Das Wellcome Trust Sanger Institut in Cambridge, UK, stellt die so genannte "Pfam-Search" (Sonnhammer *et al.*, 1997; Durbin *et al.*, 1998; Finn *et al.*, 2006, 2010) öffentlich zugänglich zur Verfügung. Damit können viele Sequenzen gleichzeitig auf mögliche Domänen im Vergleich der UniProt-Datenbank (Consortium, 2010) untersucht werden. Die 455 Sequenzen wurden auf mögliche Domänen geprüft. Bei 278 Sequenzen konnten keine Domäne und dementsprechend auch keine Funktion zugeordnet werden. Bei den restlichen 177 Sequenzen konnten sowohl Motive von gut charakterisierten als auch Domänen mit unbekannter Funktion identifiziert werden. Die Funktionen dieser Proteine verteilen sich auf verschiedene biologische Prozesse wie folgt: 38 Sequenzen enthalten Domänen, welche entweder noch keinem Stoffwechselweg zugeordnet werden konnte oder die ein zu weites funktionales Spektrum

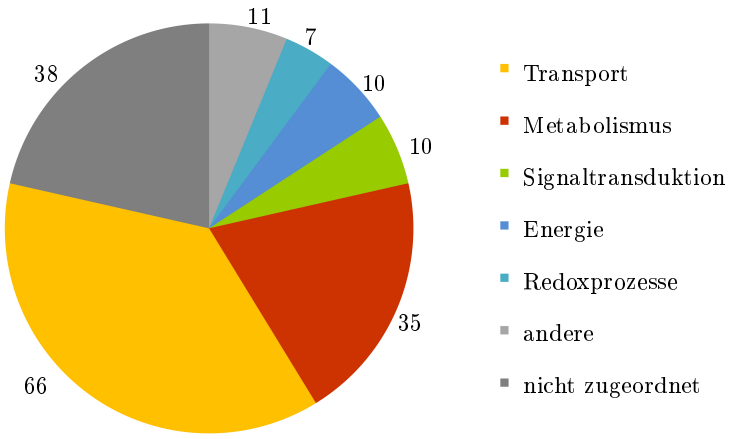


Abbildung 61: Abbildung 61: Aufteilung der zellulären Funktion exprimierter mitochondrialer Transmembranproteine

In den 455 Proteinsequenzen, welche ein putatives mitochondriales Signalpeptid und höchstwahrscheinlich Transmembrandomänen enthalten, wurden mit der "Pfam-Search" (Wellcome Trust Sanger Institut in Cambridge) in der UniProt-Datenbank nach möglichen funktionalen Domänen gesucht, welche Rückschlüsse auf den involvierten Prozess zulassen. Bei 278 Sequenzen wurde keine bekannte Domäne erkannt oder die erkannten Domänen wurden als zu unwahrscheinlich eingestuft (Schwellenwert: E-value = 0,0001). Von den restlichen 177 Proteinsequenzen (im Diagram dargestellt) konnten bei 38 die Domänen aufgrund der Diversität der Funktion oder der unzureichenden Forschungsergebnisse keinem Prozess eindeutig zugeordnet werden (dunkelgrauer Part des Diagramms). Die anderen Protein sind höchstwahrscheinlich in die dargestellten definierten biologischen Prozesse involviert. Die hellgraue Fläche bezeichnet mit ändereënthält Proteine, die im Zellzyklus, Proteinabbau, in der Transkription und in der Proteinmodifikation eine mögliche Rolle spielen.

aufweisen (die Rhomboid-ähnlichen Proteasen gehören dazu); 66 mögliche Proteine, die in Transportwege involviert sind; 35 metabolisch aktive Sequenzen; jeweils 10 Proteinsequenzen, die an der Energiebereitstellung und der Signalübertragung beteiligt sind; 7 Sequenzen kodierend für Proteine, die Redoxprozesse katalysieren, jedoch noch keiner metabolischen Funktion zugeordnet werden konnten; und 11 Sequenzen, die sich auf die Bereiche Zellzyklus, Proteinabbau, Transkription und Proteinmodifikation aufteilen (Abb. 61).
Sehr viele Sequenzen in der EST-Datenbank sind unvollständig, weshalb zu einem großen Teil nur sehr kleine Proteinsequenzen abgeleitet werden konnten. Deshalb ist die Einteilung nach der subzellulären Lokalisierung bei einem Teil der genutzten Sequenzen falsch.
Es gibt noch eine weitere Möglichkeit mutmaßliche Substrate der RLP1 zu identifizieren, indem man nach homologen Sequenzen zu Substraten anderer Spezies sucht. Dazu wurden alle von der EST-Datenbank abgeleiteten Aminosäuresequenzen einem "Pfam-Search" unterzogen (siehe oben). Die identifizierten Motive wurden anschließend nach DynaminN-ähnlichen GTPasen und möglichen Peroxidasen durchsucht. Vier Sequenzen enthielten Fragmente einer DynaminN-Domäne, die in GTPasen vorkommen. Diese könnten Homologe zu *Sc*MGM1p sein, die ebenfalls eine solche Domäne aufweist. Bei zwei Sequenzen konnte eine Peroxidasedomäne gefunden werden. *Sc*CCP1p, das zweite Substrat der *Sc*PCP1p, ist eine Cytochrom-

C-Peroxidase. Deshalb sind die zwei Sequenzen mögliche Homologe zur CCP1p. Da diese sechs Sequenzen der EST-Datenbank unvollständig sind und auch über Vergleiche mit der Genomsequenz von *R. commune* keine weiteren Informationen über die gesamte Sequenz erhalten werden konnten, müssen die Gensequenzen erst auf mRNA-Ebene und anschließendem Vergleich mit der Genomsequenz vervollständigt werden. Dann können Lokalisierungs- und gegebenenfalls Prozessierungsstudien mit der RLP1 als mögliche Protease angeschlossen werden.

3.12.2 "Docking-Studien" mit bekannten Substraten im aktiven Zentrum der RLP1

Ein weiterer Ansatzpunkt ist das aktive Zentrum der Modellstruktur der RLP1. Da diese Struktur im aktiven Zentrum der Röntgenkristallstruktur der *Ec*GlpG fast identisch ist (siehe 3.8.3), ist es möglich, bekannte Substrate von Rhomboid-ähnlichen Proteasen in die Struktur einzupassen. Diese sogenannten "Docking-Studien" wurden mit den bekannten mitochondrialen Substraten und dem künstlichen Substrat aus dem Aktivitätstest durchgeführt. Dabei war es wichtig, die Prozessierungsstelle zu kennen. Denn diese Stelle sollte in das aktive Zentrum der Struktur eingepasst werden. Es waren zu dem Zeitpunkt drei mitochondriale Substrate mit Prozessierungsstelle bekannt: *Sc*MGM1, *Sc*CCP1 und *Hs*OPA1. Diese unterscheiden sich etwas in der chemischen Beschaffenheit um die Prozessierungsstelle. *Sc*MGM1, *Sc*CCP1 und das künstliche Substrat sind an diesen Positionen eher hydrophob ausgerichtet. Die Aminosäuren um die Prozessierungsstelle von *Hs*OPA1 sind dagegen hydrophiler als die der anderen Substrate. Die eingepasste Aminosäuresequenz für *Hs*OPA1 (-$T_{200}A_{201}F_{202}R_{203}A_{204}T_{205}D_{206}R_{207}$-) konnte am besten in das aktive Zentrum der Modelstruktur von RLP1 eingelagert werden. Einen Ausschnitt der Struktur ist in Abb. 62 mit den entsprechenden vermuteten Wechselwirkungen dargestellt. Die Wechselwirkungen können aufgrund der Abstände der Aminosäuren zueinander abgeschätzt werden und sind somit in einer möglichen Interaktion wahrscheinlich. Das Aspartat, D289, und das Arginin, R280, formen in diesem Model zwei und das Aspartat, D284, eine Wasserstoffbrückenbindung zu verschiedenen Aminosäuren der möglichen Prozessierungsstelle des Substrates. Das Valin, V231, verstärkt die Substratbindung mit hydrophoben Wechselwirkungen zu einem Phenylalanin, F202. Die katalytischen Aminosäuren der RLP1 können frei das Substrat an der vorhergesehenen Stelle zwischen dem R194 und dem A195 spalten (-$T_{200}A_{201}\downarrow F_{202}R_{203}A_{204}T_{205}D_{206}R_{207}$-). Die eher hydrophilen Aminosäuren des Substrates *Hs*OPA1 könnten demzufolge der Sequenz des möglichen Substrates der RLP1 ähneln.

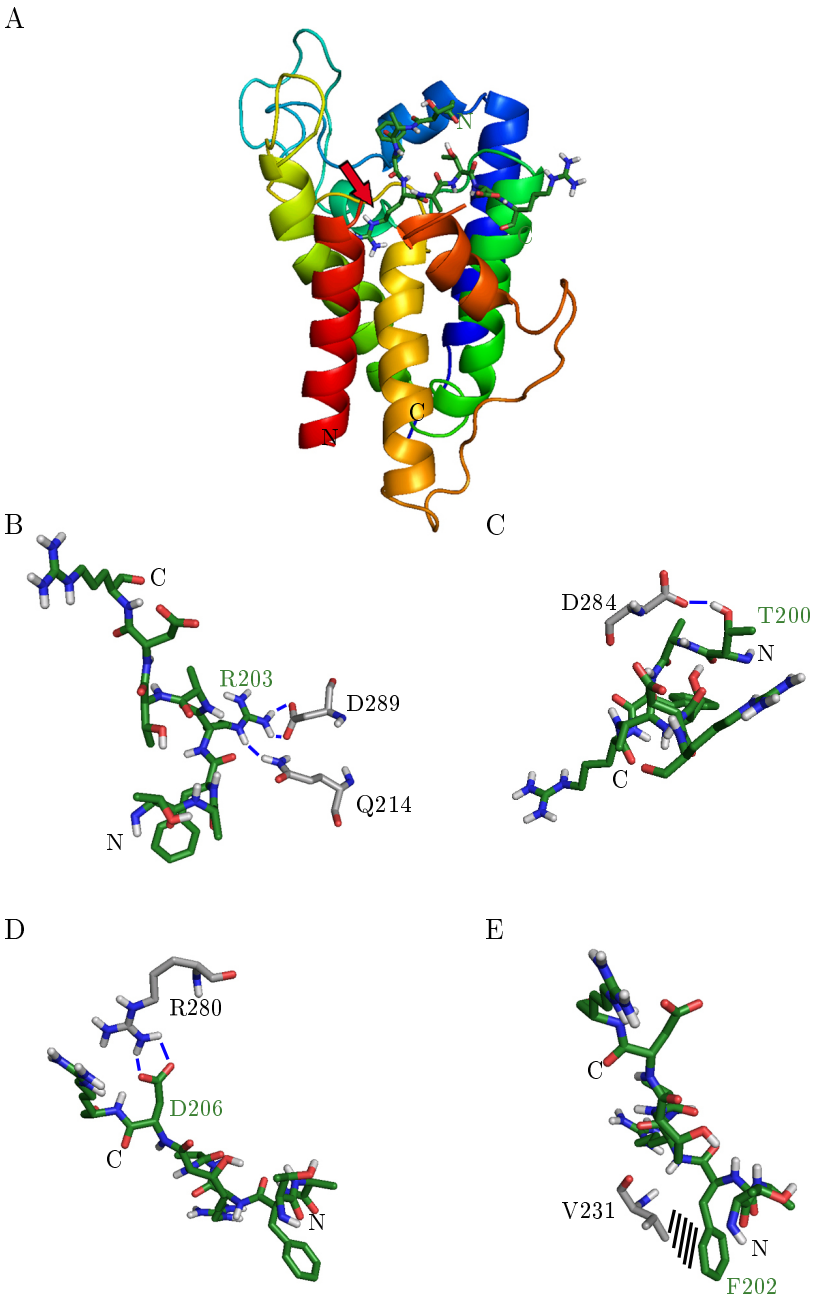


Abbildung 62: Abbildung 62: Bindungsstudien *in silico* von der Prozessierungsstelle des OPA1-Substrates in der Modellstruktur von RLP1

In dieser Abb. ist die Prognose der Interaktion von RLP1 und *Hs*OPA1 (in grün) schematisch dargestellt. Da von OPA1 noch keine Röntgenkristallstruktur veröffentlicht war, wurde lediglich die bekannte Prozessierungsstelle (-T_{200}AFRATDR_{207}-) für die Interaktionsstudie genutzt. In A ist die gesamte Kernstruktur der RLP1 (Abb. 44) mit der eingepassten Sequenz des Substrates *Hs*OPA1 dargestellt. Bei der Kernstruktur der RLP1 wurde aufgrund der besseren Einsicht in das Molekül der *Loop* zwischen Transmembrandomäne eins und zwei weggelassen. Der rote Pfeil zeigt die tiefe Bindung des Arginins (R203). Die Teilabbildungen B - E zeigen vergrößert die Interaktionen zwischen den beiden Proteinsequenzen. Die möglichen Wechselwirkungen sind mit Linien gekennzeichnet: blau - Wasserstoffbrücken, schwarz - Van-der-Waals-Kräfte. Von der RLP1 wurden der Übersicht halber jeweils nur die interagierenden Aminosäuren dargestellt.

3.12.3 Aktivitätsanalysen in *E. coli* mit modifiziertem Substrat

Um erste Hinweise auf eine Prozessierung von *Hs*OPA1 durch die RLP1 zu erhalten, wurde die Prozessierungssequenz des im Aktivitätsassay (Abschnitt 3.9) genutzten künstlichen Substrats gegen die *Hs*OPA1-Sequenz ausgetauscht (siehe Anhang Z.3.6). In Abb. 63 ist die Modifizierung der Aminosäuresequenz des Substrats dargestellt.

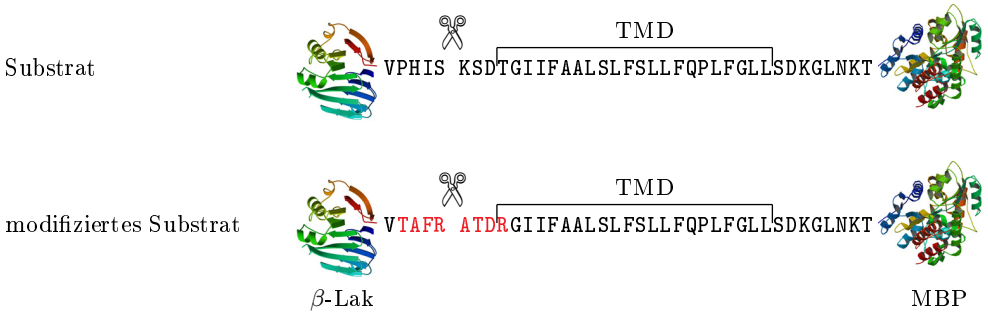


Abbildung 63: Abbildung 63: Modifizierung des artifiziellen Substrates des Aktivitätstests

Die Abb. zeigt schematisch den Aufbau des Fusionsproteins, welches für den Aktivitätstest nach Maegawa *et al.* (2005) eingesetzt wurde. Es besteht aus einer N-terminalen β-Laktamase (β-Lak), der Transmembrandomäne (TMD) des LacZ-Proteins und einem C-terminalen des Maltose-bindenden Protein (MBP). Die Modifizierung zur Prozessierungsstelle des *Hs*OPA1 ist rot markiert. Die Schere zeigt die genaue Position der Prozessierung.

Nun wurde wie in Abschnitt 3.9 beschrieben die Prozessierung mit Hilfe der Immunodetektion der β-Laktamase durchgeführt (Abb. 64). Als Kontrolle wurde der Wildtyp GW170 sowohl mit dem ursprünglichen als auch mit dem modifizierten Substrat mitgeführt. An der Produktbildung ist zu erkennen, dass der Wildtyp beide künstlichen Substrate prozessiert. Bei der *GLPG*-Deletionsmutante konnte keine Produktbildung beobachtet werden, wodurch eine Prozessierung durch andere in *E. coli* vorhandene Proteasen ausgeschlossen werden konnte. Die Analyse der Komplementationen mit Rc*RLP1* und deren Mutationen zeigt jedoch ebenfalls keine Produktbildung vergleichbar mit GW170Δ*GLPG*. Eine Expressionsanalyse in den verwendeten Kulturen zeigt aber deutlich, dass das Transkript und demzufolge höchstwahrscheinlich auch das Protein der Rhomboid-ähnlichen Protease in den Zellen vorhanden war (Abb. 65). Demzufolge ist die RLP1 nicht in der Lage das künstliche Substrat mit der an *Hs*OPA1 angepassten Prozessierungsstelle zu spalten. Eine Bindung dieses Substratderivats kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Bindungstudien mit beispielsweise *pull-down*-Experimenten wurden aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt.

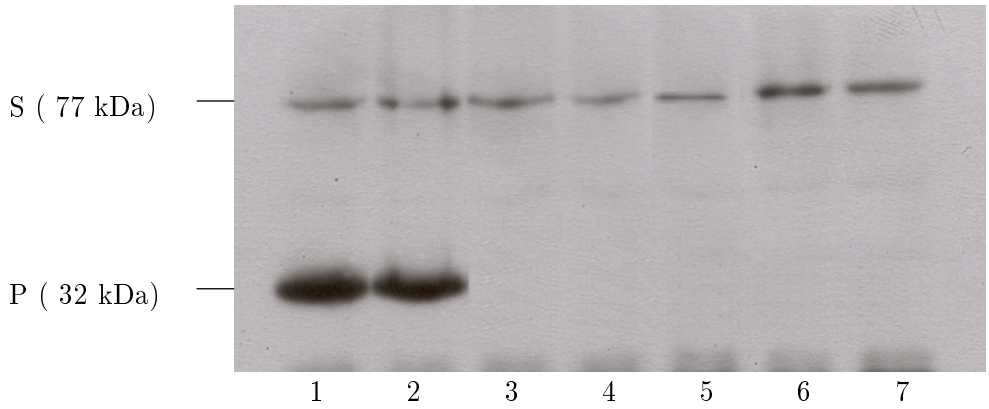


Abbildung 64: Abbildung 64: Immunodetektion des anlehnend an die Prozessierungsstelle von *Hs*OPA1 modifizierten Fusionsproteins mit anti-β-Laktamase-Antikörper

Die *E.-coli*-Zellen wurden 30 min induziert und in Probenpuffer lysiert. Jeweils 5 μL der Proben wurden auf dem SDS-Gel separiert. Die Immunodetektion erfolgte zunächst mit dem anti-β-Laktamase-Antikörper aus dem Hasen und anschließend mit einem anti-Hase-Antikörper aus der Ziege. Alle genutzten Transformanden enthielten das Plasmid mit der Sequenz des modifizierten künstlichen Fusionsproteins (ausgenommen Spur 1).
1 - GW170 mit unverändertem künstlichen Fusionskonstrukt, 2 - GW170, 3 - GW170Δ*GLPG*, 4 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$-pBBR1MCS5, 5 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179N-pBBR1MCS5, 6 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179A-pBBR1MCS5, 7 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C178A-pBBR1MCS5

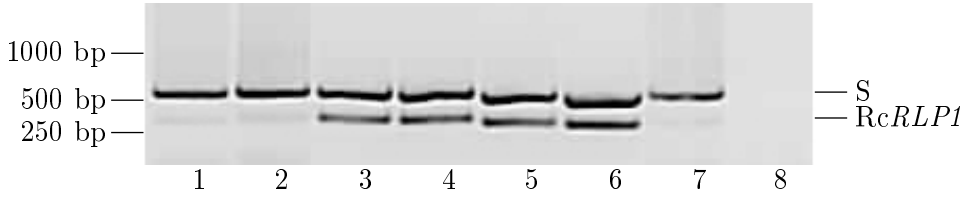
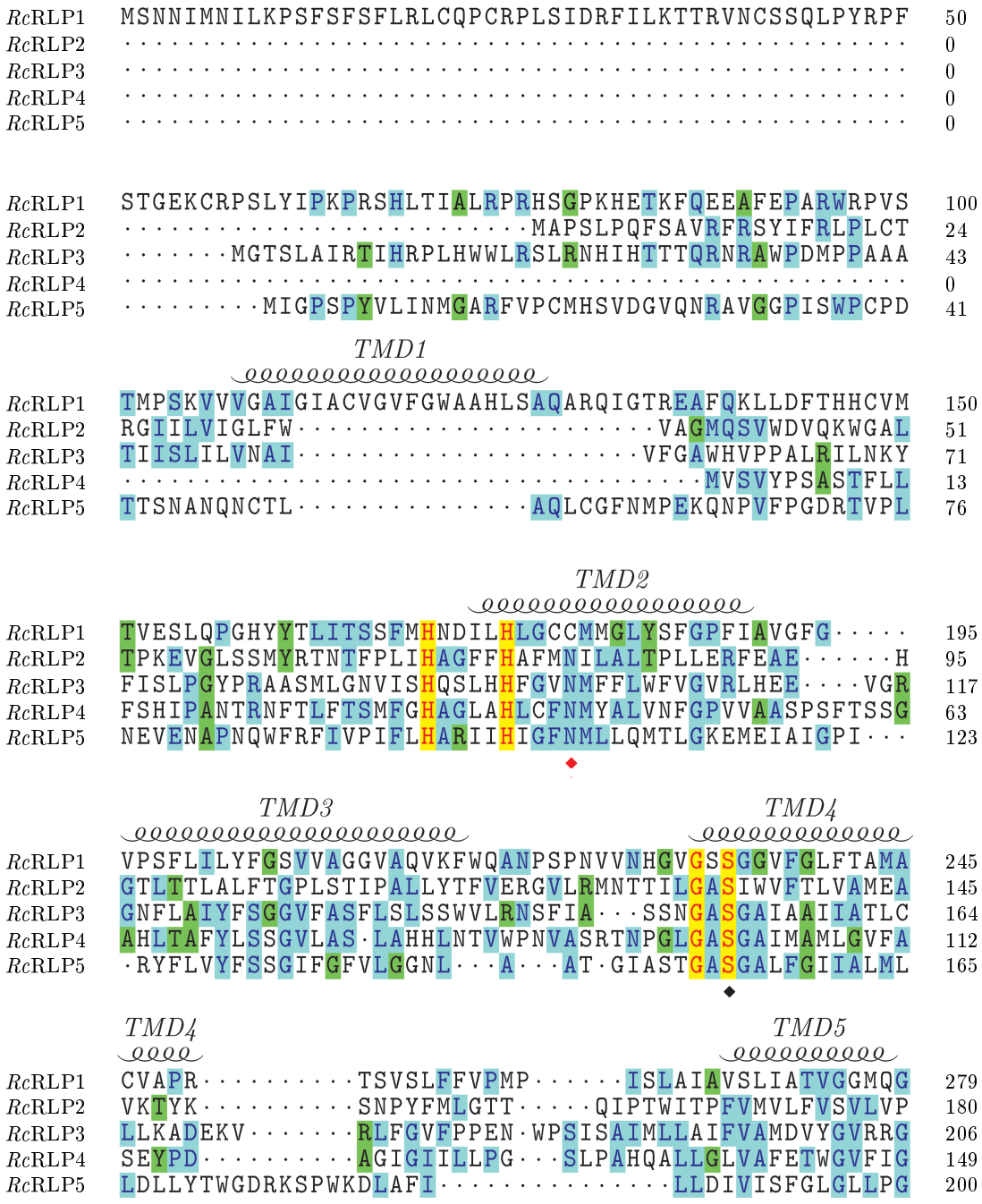


Abbildung 65: Abbildung 65: Expressionsanalyse nach Komplementation von GW170Δ*GLPG* mit dem modifizierten künstlichen Substrat

Für diese Multiplex-PCR wurde cDNA der gleichen Kulturen genutzt, welche für die Immunodetektion in Abb. 64 verwendet wurden. Als Kontrollfragment wurde die cDNA des künstlichen Substrates mit den Primer 91 und 92 (651 bp) amplifiziert. Die Rc*RLP1*-Expression wurde mit dem Primer-Paar 23 und 28 (362 bp) nachgewiesen.
1 - GW170, 2 - GW170Δ*GLPG*, 3 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$-pBBR1MCS5, 4 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179N-pBBR1MCS5, 5 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C179A-pBBR1MCS5, 6 - GW170Δ*GLPG*-Rc*RLP1*$_c$C178A-pBBR1MCS5, 7 - pGW88 (Plasmid des künstlichen Substrates), 8 - Wasserkontrolle, S - Substrat

3.13 Untersuchungen zu möglichen weiteren Rhomboid-ähnlichen Proteinen in *R. commune*

Der fehlende Effekt der Rc*RLP1*-Deletion auf die Mitochondrien des Pilzes und deren Funktion lässt vermuten, dass entweder ein anderer Mechanismus für die mitochondriale Fusion in *R. commune* existiert oder dass eine weitere mitochondriale Rhomboid-ähnliche Protease im Genom kodiert ist. Letzteres wurde bis jetzt noch in keiner Spezies gezeigt.
Bei der Analyse der EST-Datenbank war aber auffällig, dass das Programm "Pfam-Search" bei sechs Sequenzen eine Rhomboid-Domäne identifizierte. Eine davon ist die RLP1. Alle anderen könnten aktive Rhomboid-ähnliche Proteasen in *R. commune* sein.
Erstaunlicherweise wies neben der *Rc*RLP1 eine weitere Proteinsequenz ein mitochondriales Signalpeptid auf (TargetP1.1, Emanuelsson *et al.*, 2007). Diese zweite mögliche mitochondriale Rhomboid-ähnliche Protease enthält (Abb. 66) alle Merkmale einer aktiven Rhomboid-ähnlichen Protease, inklusive des hochkonservierten Asparagins. Dieses Protein wurde RLP2 genannt. Möglicherweise ist die RLP2 das Homologe zur *Sc*PCP1p und nicht die RLP1. Komplementationsstudien der Deletion von Sc*PCP1* könnten diesen Sachverhalt klären.
Drei Proteinsequenzen sind wahrscheinlich von der Aminosäureanzahl vollständig und enthalten laut TargetP1.1 kein mitochondriales Signalpeptid. Sie wurden entsprechend als RLP3, RLP4 und RLP5 benannt. Die RLP5 weist eine mögliche N-terminale Phosphoenolpyruvatcarboxykinasedomäne auf und könnte somit eine Rolle bei der Gluconeogenese spielen. Ein Aminosäurevergleich aller fünf Rhomboid-ähnlichen Proteasen aus *R. commune* (Abb. 66) zeigt, dass die Zwischentransmembranbereiche einen höheren Konservierungsgrad aufweisen als andere Rhomboid-ähnliche Proteasen untereinander (Vergleich zum Aminosäuresequenzvergleich im Anhang Z.4.2). Die Funktionen der RLP3, 4 und 5 können breit gefächert in verschiedenen Stoffwechselwegen oder auch in einem einzigen Prozess liegen. Ebenso wäre es vorstellbar, dass die drei Proteasen nicht unbedingt in der Membran des Golgi-Apparates verankert sind, sondern wie bei den Apikomplexa in die Funktion anderer Kompartimente involviert sind (Sheiner *et al.*, 2008).
Die letzte Sequenz, welche laut Vergleich mit der UniProt-Datenbank Ähnlichkeit zu Rhomboid-ähnlichen Proteasen hat, weist jedoch keine Merkmale dieser Proteinklasse auf. In der Domänenbestimmung werden oft mehrere ähnliche Domänen zu einem sogenannten Clan zusammengefasst und nach der am besten untersuchten Proteinklasse benannt. Dem Clan der Rhomboid-Domäne sind zusätzlich zwei weitere Domänen untergeordnet, die DER1-ähnliche Domäne und eine Domäne, die nicht näher charakterisiert ist, die DUF1751 (Domäne unbekannter Funktion). Zu der letzten Proteinfamilie zählt auch die letzte Sequenz. Die Familie der DUF1751 besteht aus 11 annotierten Proteinen. Führt man jedoch mit der letzten Rhomboid-ähnlichen Sequenz von *R. commune* das Programm BLASTp durch, so erhält man ähnliche Proteine aus vielen sequenzierten Organismen, die alle der DUF1751-


RcRLP1 MSNNIMNILKPSFSFSFLRLCQPCRPLSIDRFILKTTRVNCSSQLPYRPF 50
RcRLP2 0
RcRLP3 0
RcRLP4 0
RcRLP5 0
RcRLP1 STGEKCRPSLYIPKPRSHLTIALRPRHSGPKHETKFQEEAFEPARWRPVS 100
RcRLP2 MAPSLPQFSAVRFRSYIFRLPLCT 24
RcRLP3 MGTSLAIRTIHRPLHWWLRSLRNHIHTTTQRNRAWPDMPPAAA 43
RcRLP4 0
RcRLP5 MIGPSPYVLINMGARFVPCMHSVDGVQNRAVGGPISWPCPD 41
TMD1
RcRLP1 TMPSKVVVGAIGIACVGVFGWAAHLSAQARQIGTREAFQKLLDFTHHCVM 150
RcRLP2 RGIILVIGLFW VAGMQSVWDVQKWGAL 51
RcRLP3 TIISLILVNAI VFGAWHVPPALRILNKY 71
RcRLP4 MVSVYPSASTFLL 13
RcRLP5 TTSNANQNCTL AQLCGFNMPEKQNPVFPGDRTVPL 76
TMD2
RcRLP1 TVESLQPGHYYTLITSSFMHNDILHLGCCMMGLYSFGPFIAVGFG 195
RcRLP2 TPKEVGLSSMYRTNTFPLIHAGFFHAFMNILALTPLLERFEAE H 95
RcRLP3 FISLPGYPRAASMLGNVISHQSLHHFGVNMFFLWFVGVRLHEE VGR 117
RcRLP4 FSHIPANTRNFTLFTSMFGHAGLAHLCFNMYALVNFGPVVAASPSFTSSG 63
RcRLP5 NEVENAPNQWFRFIVPIFLHARIIHIGFNMLLQMTLGKEMEIAIGPI 123
TMD3
TMD4
RcRLP1 VPSFLILYFGSVVAGGVAQVKFWQANPSPNVVNHGVGSSGGVFGLFTAMA 245
RcRLP2 GTLTTLALFTGPLSTIPALLYTFVERGVLRMNTTILGASIWVFTLVAMEA 145
RcRLP3 GNFLAIYFSGGVFASFLSLSSWVLRNSFIA SSNGASGAIAAIIATLC 164
RcRLP4 AHLTAFYLSSGVLAS LAHHLNTVWPNVASRTNPGLGASGAIMAMLGVFA 112
RcRLP5 RYFLVYFSSGIFGFVLGGNL A AT GIASTGASGALFGIIALML 165
TMD4
TMD5
RcRLP1 CVAPR TSVSLFFVPMP ISLAIAVSLIATVGGMQG 279
RcRLP2 VKTYK SNPYFMLGTT QIPTWITPFVMVLFVSVLVP 180
RcRLP3 LLKADEKV RLFGVFPPEN WPSISAIMLLAIFVAMDVYGVRRG 206
RcRLP4 SEYPD AGIGIILLPG SLPAHQALLGLVAFETWGVFIG 149
RcRLP5 LDLLYTWGDRKSPWKDLAFI LLDIVISFGLGLLPG 200

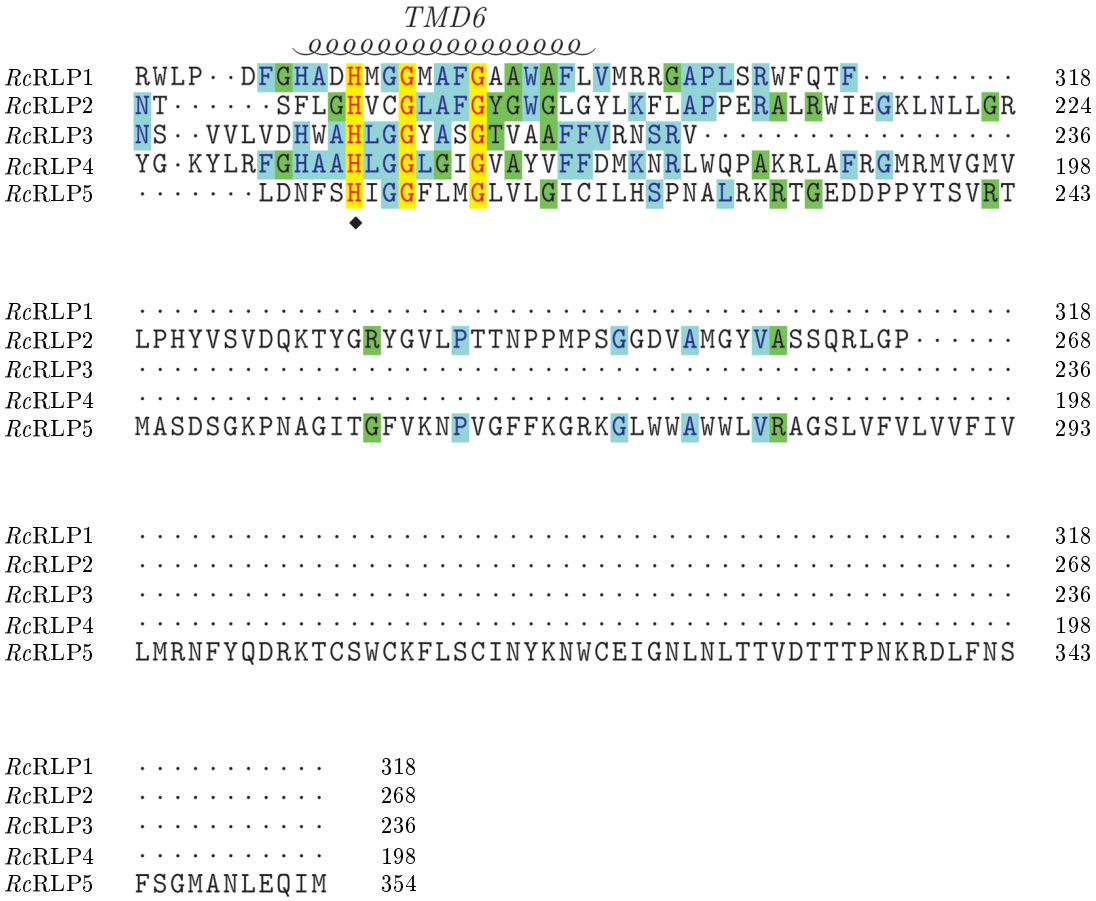


Abbildung 66: Abbildung 66: Aminosäurevergleich aller Rhomboid-ähnlichen Proteasen aus *R. commune*

Die Positionen der Transmembrandomänen der RLP1 sind oberhalb der Sequenzen dargestellt. Sie entsprechen der Sekundärstruktur des Homologiemodells der RLP1. Die katalytischen Aminosäuren sind unterhalb der Sequenzen mit schwarzen Rauten markiert. Die rote Raute kennzeichnet das hochkonservierte Asparagin der zweiten Transmembrandomäne.

Proteinfamilie zugeordnet werden müssten. Viele davon sind ebenfalls als Rhomboid-ähnliche Proteasen annotiert, weisen jedoch keine katalytischen Merkmale dieser Proteine auf. Die Abb. des Aminosäurevergleiches der 11 annotierten Proteine mit DUF1751 inklusive der sechsten Proteinsequenz der EST-Analyse ist im Anhang abgedruckt (Z.4.3). Alle 12 Sequenzen weisen untereinander einen hohen Ähnlichkeitsgrad auf. Dieser ist auch in den prognostizierten Transmembranbereichen zu finden. Da die Funktion dieser Proteine unbekannt ist, sie jedoch auch nicht zur Klasse der Rhomboid-ähnlichen Proteine gehören, wurde das *Rhynchosporium*-Protein mit DUF1751 als Protein unbekannter Funktion 1 (*Rc*PUF1) benannt.

4 Diskussion

4.1 Einfluss der RLP1 auf die Pathogenität von *R. commune*

Zu Beginn dieser Arbeit stand die Hypothese, dass in der durch REMI-Mutagenese erhaltenen Mutante YH4.5 ein Gen inaktiviert wurde, das einen gravierenden Einfluss auf die Pathogenität des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune* hat (Yuill, 2008). In verschiedenen Experimenten mit der REMI-Mutante konnten von Anfang an Probleme in der Sporenbildung und ein verlangsamtes Wachstum *ex planta* beobachtet werden. Dies resultierte schließlich im Verlust dieser Mutante. Zur Verifizierung der REMI-Mutante und zur funktionellen Charakterisierung wurde deshalb das *RLP1*-Gen gezielt deletiert. Die Mutanten, in dem das *RLP1*-Gen partiell ($RLP1_{trunc}$) oder vollständig ($\Delta RLP1$) deletiert war, zeigten jedoch keine phänotypische Veränderung im Vergleich zum Wildtyp in der Symptomentwicklung auf suzeptiblen Gerstenpflanzen. Deshalb handelt es sich bei der *RLP1* nicht um ein Pathogenitätsgen. Die ursprüngliche Apathogenität der REMI-Mutante (YH4.5) könnte an der mangelnden Sporenbildung der Mutante gelegen haben, da dies von Beginn an ein herausstechender Phänotyp war und die Infektionen mit einem relativ unsicheren Schnelltest durchgeführt wurden. Der Phänotyp der REMI-Mutante im Wachstum und in der Sporenbildung konnte ebenfalls durch die phänotypische Analyse der $RLP1_{trunc}$- und die $\Delta RLP1$-Mutanten nicht auf das *RLP1*-Gen zurückgeführt werden.
Die Anwesenheit des Restriktionsenzym bei der Transformation könnte im Genom der YH4.5-Mutante Veränderungen produziert haben, bei denen das Plasmid nicht integrierte. Solche *non-tagged* Mutationen könnten die Ursache des Sporulation- und Wachstumsphänotyp sein und somit auch die Virulenz von YH4.5 beeinflusst haben. Dennoch war das durch die REMI-Mutagenese entdeckte Protein von großem Interesse, wie auf den folgenden Seiten diskutiert wird.

4.2 Zusammenhang zwischen Struktur und Funktionalität der RLP1

Durch die große Anzahl an Rhomboid-ähnlichen Proteinen wurde diese Klasse von Proteinen von Lemberg & Freeman (2007) nach der Phylogenie zunächst in drei Gruppen aufgeteilt, in die aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen und in die inaktiven iRhom und Homologen. Die beiden letzteren wurden aufgrund der fehlenden Proteaseaktivität als Rhomboid-ähnliche Proteine zusammengefasst. Die Rhomboid-ähnlichen Proteasen ihrerseits konnten in die Proteasen des PARL- und des Sekretase-Typs unterteilt werden.
Eine Eingliederung der RLP1 in eine dieser Gruppen ist aufgrund verschiedener Spezifikationen des Proteins nicht einfach. Der hohe Konservierungsgrad im Vergleich zu den Rhomboid-ähnlichen Proteasen lässt eine Zugehörigkeit zu dieser Gruppe zu. Die Rhomboid-ähnlichen Proteasen wurden von Lemberg & Freeman (2007) exakt definiert: Es sind Proteine mit pro-

gnostizierter katalytischer Aktivität. Sie können laut Datenbank-Vergleichen als Rhomboid-ähnliche Proteasen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit fungieren. Sie enthalten die entsprechende Anzahl an Transmembrandomänen und besitzen demnach die korrekte Topologie. Die hoch konservierten katalytisch aktiven Aminosäuremotive GxSx und HxxGxxxG müssen in den Transmembranhelices vier und sechs sowie die stark konservierten Aminosäuren (HxxxxHxxxN) in Transmembrandomäne zwei der Kernstruktur vorhanden sein. Diese Merkmale treffen bis auf das Motiv der zweiten Kerntransmembranhelix auf die RLP1 zu. Denn an der Position des hoch konservierten Asparagins, welches ausnahmslos in allen annotierten aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen vorhanden ist, ist in der RLP1 ein Cystein positioniert. Dieses Cystein ist in drei Isolaten von *R. commune* und in einem von *R. secalis* konserviert. Die Unterschiede in der Proteinsequenz in den vier Isolaten sind auf den N-Terminus beschränkt und haben demzufolge wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Funktion des Proteins. Die Sequenz des RLP1-Kernbereiches ist über die Gattung *Rhynchosporium* höchstwahrscheinlich stark konserviert, was möglicherweise auf ein wichtiges Protein hinweist.

Fraglich ist also, ob die RLP1 eine Rhomboid-ähnliche Protease ist. Wenn dem nicht so ist, könnte sie aufgrund der Erkennung konservierter Aminosäuren nur der Gruppe der iRhom zugeordnet werden (Lemberg & Freeman, 2007). Der Aminosäurevergleich mehrerer Proteine der iRhom-Subfamilie mit der RLP1 zeigte jedoch kaum eine Übereinstimmung der herausstechenden Merkmale der iRhom. Konservierte Aminosäuren wie die zwei helixbrechenden Proline in Transmembrandomäne vier und sechs der Kernstruktur fehlen. Darüber hinaus konnte in keinem der iRhom-Proteine ein Cystein an der entsprechenden Position gefunden werden, wie es bei der RLP1 der Fall ist. Demzufolge kann sicher davon ausgegangen werden, dass die RLP1 kein Protein der Gruppe der iRhom ist. Ebenso kann die letzte Subfamilie der Rhomboid-ähnlichen Proteine, die inaktiven Homologen, aufgrund des hohen Anteils an konservierten Aminosäuren, der Anwesenheit der katalytisch aktiven Aminosäuren und des phylogenetischen Verwandschaftsgrad zu den Rhomboid-ähnlichen Proteasen für die RLP1 ausgeschlossen werden.

Daraus schlussfolgernd könnte die *Rc*RLP1 eine neue Untergruppe der Rhomboid-ähnlichen Proteasen bilden, da sich das Protein nur in dem Cystein anstatt des hoch konservierten Asparagins von anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen unterscheidet. Ob die Proteine dieser Untergruppe aktive Proteasen sind, bleibt unklar. Denn für die RLP1 konnte nur bei der Mutation dieses Cysteins (C179 → N/A) eine proteolytische Aktivität gegenüber dem artifiziellen Substrat in *E. coli* nachgewiesen werden. Einen Hinweis auf ein aktives Protein zeigt der Phänotyp der Deletionsmutanten in der *RLP1*. Dieser spiegelt sich in der verlangsamten Bildung des emersen Myzels (Myzel auf der Oberfläche der Flüssigkultur) wider. In der Publikation von Lemberg & Freeman (2007) wird auch geschrieben, dass es Rhomboid-ähnliche Proteasen gibt, deren HxxxxHxxxN-Motiv der zweiten Transmembrandomäne nicht so hoch

konserviert ist. Die Autoren bezogen sich dabei auf die beiden Histidine des Motivs. Wenn man aber bedenkt, dass das hoch konservierte Asparagin in den Rhomboid-ähnlichen Proteasen wie GlpG aus *E. coli* keine Funktion in Bezug auf die katalytische Aktivität besitzt (Maegawa *et al.*, 2005), ist es wahrscheinlicher, dass die RLP1 eine Rhomboid-ähnliche Protease ist und keine neue Untergruppe dieser Proteine bestimmt. Warum an dieser Position immer ein Asparagin positioniert ist, wurde bis heute noch nicht geklärt.

Die RLP1 von *R. commune* zeigt nicht nur auf Ebene der Primärstruktur eine hohe Ähnlichkeit zu den aktiven Rhomboid-ähnlichen Proteasen. Nach dem Homologiemodell kann die Aminosäurekette räumlich der Struktur der aktiven Rhomboid-ähnlichen Protease GlpG von *E. coli* angepasst werden. Das heißt, die Sequenz lässt die dreidimenionale Struktur dieser Proteinklasse zu. Die Lage der Transmembrandomänen bildet besonders gut das aktive Zentrum aus, welches dem der GlpG bis auf wenige Ausnahmen sehr nahe kommt. Neben geringen Verschiebungen identischer Aminosäuren liegt der gravierendste Unterschied in der schwefelreichen Region der Aminosäuren 178 bis 181 (-$C_{178}C_{179}M_{180}M_{181}$-), die auch das Cystein C179 enthält. Cysteine sind die einzigen Aminosäuren, die in der Tertiärstruktur kovalente Verknüpfungen zur Stabilisierung des Proteines ausbilden können (Betz, 1993; Wedemeyer *et al.*, 2000). Solche Disulfidbrücken sind abhängig von der Konformation und chemischen Beschaffenheit der Umgebung. Für die lokale Struktur dieser Bindung wirkt sich eine Anordnung von Sauerstoffatomen, aromatischen Ringsystemen und hydrophoben Aminosäureresten positiv aus (Bhattacharyya *et al.*, 2004). Auf die RLP1 bezogen liegen die Cysteine an Position 178 und 179 in einem Umfeld von hydrophoben (L174, V268, I271 und A272) und aromatischen Seitenketten (H170 und H175). Es wäre strukturell möglich, dass die Cysteine zueinander umklappen und anschließend eine sogenannte vicinale Disulfidbrücke ausbilden. Bei dieser Form der Disulfidbrücke wurde häufig vier Aminosäuren vor einem der Cysteine ein Histidin in der Primärstruktur gefunden (Bhattacharyya *et al.*, 2004). Dies trifft auf C179 in Form des hoch konservierten Histidins an Position 175 zu.
Eine Disulfidbindung kann reversibel für den Reaktionsmechanismus genutzt werden, wie das bei vielen Proteinen der Fall ist, die an Redox-Prozessen beteiligt sind. Beispiele hierfür sind Peroxiredoxine (Georgiou & Masip, 2003; Cox *et al.*, 2008), einige Glutathion-*S*-transferasen (Sheehan *et al.*, 2001), Glutaredoxin (Holmgren, 1979) und Thioredoxin bzw. Thioredoxinreduktasen (Russel & Model, 1988; Russel *et al.*, 1990). Vicinale Disulfidbrücken hingegen sind wesentlich seltener. Diese besondere Form der Disulfidbrücke zwischen zwei in der Aminosäuresequenz benachbarten Cysteinen wurde bisher nur bei wenigen Proteinen als funktionelles Element gefunden, jedoch nie als strukturelles. Bei dem viralen Hüllprotein E^{rns} der Pestiviren ist die konservierte vicinale Disulfidbrücke essentiell für die RNase-Aktivität (Langedijk *et al.*, 2002). Durch eine Mutation in den Cysteinen der vicinalen Disulfidbrücke des insektiziden Neurotoxins J-Actx-Hv1 der Spinne *Hadronyche versuta* verliert das Protein gänzlich

seine toxische Wirkung (Wang *et al.*, 2000). Zwei weitere Beispiele stellen der Acetylcholinrezeptor aus *Torpedo californica*, welcher durch reduzierende Bedingungen inaktiviert wird, und die Methanoldehydrogenase von *Methylobacterium extorquens* dar, bei der eine vicinale Disulfidbrücke beim Elektronentransfer vom Cofaktor Pyrrolochinolinchinon zu Cytochrom *C* eine entscheidende Rolle spielt (Kao & Karlin, 1986; Blake *et al.*, 1994).
In dem schwefelreichen Motiv sind neben den Cysteinen zwei Methionine enthalten. Methionine stellen in Proteinen ebenfalls eine Form zur Stabilisierung der Struktur dar. Das Schwefelatom kann mit seinen freien Elektronenpaaren sowohl mit den π-Elektronen aromatischer Aminosäuren als auch mit Sauerstoffatomen schwache nicht-kovalente Wechselwirkungen ausbilden (Desiraju & Steiner, 1999; Pal & Chakrabarti, 2001; Iwaoka *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2003). RLP1 enthält insgesamt 13 Methionine. Der Modellstruktur zufolge könnten vier der 13 Methioninseitenketten die Protein-stabilisierenden Wechselwirkungen eingehen. Zusätzlich zu den beiden Methioninen im aktiven Zentrum (M180 und M181 zu G112 bzw. S263, wobei bei der ersteren das Sauerstoffatom des Peptidrückgrates die Interaktion eingehen würde) ist eine Wechselwirkung des Methionins an Position 169 mit einem Threonin (T134) wahrscheinlich. Nur das Methionin an Position 244 könnte mit π-Elektronen zweier Phenylalanine (F189 und F256) interagieren.
Da nur ein kleiner Teil der RLP1-Methionine eine solche Wechselwirkung eingehen könnte, ist eine zweite Funktion dieser Aminosäuren denkbar. Denn die restlichen neun Methionine haben laut Homologiemodell alle Kontakt zur Proteinoberfläche. Methionin stellt ein sehr gutes Reduktionsmittel dar (Vogt, 1005). Oxidierte Methioninseitenketten können durch sehr weit verbreitete, stereospezifische Methioninsulfoxid-Reduktasen unter Verbrauch von $NADPH/H^+$ wieder zu Methionin reduziert werden (Weissbach *et al.*, 2002; Moskovitz, 2005). Levine *et al.* (1996) zeigten erstmals, dass Methionin in Proteinen als Antioxidans zum Schutz anderer leicht zu oxidierenden Stellen fungiert. Die Möglichkeit einer solchen Funktion für die Methionine in RLP1 wird durch den hohen relativen Methioningehalt von 4,09% bekräftigt, denn der durchschnittliche Methioningehalt kernkodierter Proteine liegt bei Pilzen bei etwa 2%. Mitochondrial kodierte Proteine enthalten geringfügig mehr Methionin, jedoch weniger als RLP1 (Bender *et al.*, 2008). Ein Schutz gegenüber Oxidantien ist bei einem Protein wie RLP1 notwendig, da es wie die anderen PARL-Typ-Proteasen höchstwahrscheinlich durch seine Position in der inneren mitochondrialen Membran sowohl Kontakt zum Intermembranraum als auch zur Matrix hat. Es ist also an der gleichen Stelle lokalisiert, an der die Atmungskette und somit ein häufiger Elektronentranfer stattfindet. Ein weiterer Grund hierfür sind die Mitochondrien als größte Erzeuger intrazellulär synthetisierter reaktiver Sauerstoffspezies (Balaban *et al.*, 2005).
Von der Struktur her kann eine proteolytische Aktivität trotz des hohen Gehaltes an Schwefel-haltigen Aminosäuren besonders im aktiven Zentrum nicht ausgeschlossen werden. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind im Modell des aktiven Zentrums von RLP1 ähnlich

wie die in GlpG angeordnet. Durch Austausch einer einzigen Aminosäure (C179N/A) wurde ein proteolytisch aktives Protein erhalten. Falls das Wildtyp-Protein eine aktive Rhomboid-ähnliche Protease ist, dann müsste das genuine Substrat eine vom artifiziellen Substrat stark abweichende Struktur aufweisen. Die Prozessierungsstelle ähnelt höchstwahrscheinlich nicht der von *Hs*OPA1, da das RLP1-Protein das an *Hs*OPA1 angeglichene künstliche Substrat nicht prozessiert hat. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass das genuine Substrat die RLP1 erst aktivieren muss, beispielsweise durch eine Oxidation des Cysteins C179, welche eine leichte Konformationsänderung zur Folge haben kann. Einen Hinweis hinsichtlich dieser Hypothese bildet die nachgewiesene Aktivität der Mutation C179N und C179A. Das Cystein 178 ist anscheinend nicht für die katalytische Aktivität gegenüber den getesteten Substraten notwendig, da die Mutation in dieser Aminosäure zu keiner proteolytischen Aktivität führte. Es könnte sein, dass nur das Cystein an Position 179 eine Bindung eingeht und es keine vicinale Disulfidbrücke in RLP1 gibt. Dennoch wurden die Aktivitätsstudien in *E. coli* durchgeführt. In *R. commune* könnte ein Aktivitätstest mit einer Mutation im Cystein C178 ein anderes Resultat zeigen und somit auf eine vicinale Disulfidbrücke hindeuten. Eine Funktion der Erkennung spezifischer Moleküle durch vicinale Disulfidbrücken wurde beim Acetylcholinrezeptor gezeigt, bei dem diese Bindung entscheidend für die Signalperzeption ist (Kao & Karlin, 1986). Demnach ist eine mögliche Funktion des Cystein 179 in der Substraterkennung mit anschließender Aktivierung der Proteaseaktivität nicht auszuschließen.

4.3 Mögliche Funktion einer mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Protease

Den obigen Überlegungen zufolge kann die RLP1 den Rhomboid-ähnlichen Proteasen zugeordnet werden. Eine genauere phylogenetische Einordnung der RLP1 aus *R. commune* erfolgte nach Lemberg & Freeman (2007) zu den PARL-Typ Proteasen. Diese bilden in dem phylogenetischen Baum einen eigenen Zweig. Die Anordnung in diesem Zweig spiegelt die evolutionäre Abstammung der jeweiligen Organismen zueinander wider (Lemberg & Freeman, 2007). Die RLP1 befindet sich zwar unter den Proteasen des PARL-Typs. Jedoch ist der nächst verwandte Vorfahre laut dieser Definition die PARL aus *Arabidopsis thaliana* und nicht die PCP1p aus *S. cerevisiae*. Dies ist anscheinend der einzige Punkt, der gegen eine Einordnung in die Rhomboid-ähnlichen Proteasen des PARL-Typs spricht. Denn alle anderen Merkmale dieser Gruppe konnten für die RLP1 gezeigt werden. Sie besitzt laut Homologiemodell die richtige Topologie (1+6 Transmembrandomänen). Die katalytische Dyade ist in den Transmembranbereichen fünf und sieben lokalisiert. Durch verschiedene Untersuchungen wurde die Translokation in die Mitochondrien nachgewiesen, wie das auch bei *Sc*PCP1p (McQuibban *et al.*, 2003), *Hs*PARL (Sík *et al.*, 2004) und *Dm*Rho7 (McQuibban *et al.*, 2006) der Fall war. Allen Rhomboid-ähnlichen Proteasen des PARL-Typs fehlt ein Arginin im *Loop* zwischen der ersten und zweiten Transmembrandomäne sowie das Glutamat

am Ende der zweiten Transmembranhelix. In sehr vielen Rhomboid-ähnlichen Proteasen des Sekretase-Typs ist im ersten Zwischentransmembranbereich ein Motiv bestehend aus Tryptophan und Arginin positioniert. Der *Loop* mit dem WR-Motiv bildet eine Art Deckel über dem aktiven Zentrum. Dem Motiv wird eine mögliche Funktion in der Bewegungsmechanik des Deckels zugeschrieben (Wang *et al.*, 2006). In den meisten PARL-Typ-Proteasen fehlt das WR-Motiv. Dort, wo es gefunden wurde, liegt es aber zum zweiten Transmembranbereich verschoben vor. Dieses Motiv sowie die vorher genannten Aminosäuren konnten in der RLP1 nicht identifiziert werden. Diese Befunde sprechen für eine Einordnung in die Gruppe des PARL-Typs.

Der Literatur zufolge sind anscheinend die Substrate der Rhomboid-ähnlichen Proteasen des PARL-Typs funktionell konserviert (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003, 2006; Cipolat *et al.*, 2006; Kanazawa *et al.*, 2008; Leroy *et al.*, 2010). Dadurch wird auch für die mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Proteasen eine stark verwandte Funktion angenommen. Die Funktionen dieser Gruppe von Proteasen können in zwei Bereiche eingeteilt werden. Durch die Verringerung der Transkriptmenge der mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Protease in zahlreichen Organismen wurde ein Einfluss dieser Proteine auf die Erhaltung und Vermehrung intakter Mitochondien gezeigt. Eine Fragmentierung der Mitochondrien wurde beispielsweise bei Mutanten der *PCP1* aus *S. cerevisiae* (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003), im *Rhomboid-7*-Gen aus *D. melanogaster* (McQuibban *et al.*, 2006) und bei der RNAi-Mutante des *ROM5*-Gens aus *C. elegans* (Kanazawa *et al.*, 2008) gezeigt. Den Organellen fehlt zudem jegliche DNA (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2006). Eine Folge der Deletion der *PCP1* sind die funktionell stark eingeschränkten Mitochondrien, wodurch *S. cerevisiae* die Fähigkeit der Respiration verliert. Das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ist somit nicht mehr möglich (McQuibban *et al.*, 2003). Bei anderen Spezies wie *M. musculus*, *D. melanogaster* und *C. elegans* führt die Reduktion der Transkriptmenge der mitochondrialen Rhomboid-ähnlichen Protease zu einer erhöhten bzw. verfrühten Sterberate (Cipolat *et al.*, 2006; McQuibban *et al.*, 2006; Kanazawa *et al.*, 2008).

Im Gegensatz dazu zeigen die *RLP1*-Mutationen keinen Unterschied im Wachstum auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen sowie im Erscheinungsbild der Mitochondrien. Weiterhin wird durch die Deletion die Pathogenität auf suszeptiblen Gerstenpflanzen nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Funktion und Morphologie der Mitochondrien unter den untersuchten Bedingungen durch den Verlust von RLP1 nicht beeinflusst wird. Zusätzlich konnte das *RLP1-Gen* die Deletion der PCP1p in *S. cerevisiae* nicht komplementieren. Außerdem ließ sich das mitochondriale Substrat *Sc*MGM1p, welches in der Bäckerhefe die Fusion der Mitochondrien vermittelt, in den "Docking-Studien" nicht in das aktive Zentrum der Modellstruktur von der *Rc*RLP1 einpassen. Demzufolge ist *Sc*MGM1p wahrscheinlich kein RLP1-Substrat. Deshalb führt die RLP1 vermutlich auch keine homologe Funktion zur *Sc*PCP1p bezüglich der mitochondrialen Fusion aus.

Alle bis heute untersuchten Proteasen des PARL-Typs sind zusätzlich zu der oben aufgeführten Funktion in die Kontrolle der Apoptose, also des programmierten Zelltodes, involviert. Beispielsweise zeigten Ishihara *et al.* (2006), dass durch apoptotische Stimuli eine erhöhte Prozessierung von OPA1 und somit die mitochondriale Fragmentierung induziert wird. OPA1 ist für die Modellierung der Cristae-Strukturen verantwortlich und bildet somit ein Mikrokompartiment innerhalb des Intermembranraums, in dem der Großteil des Cytochrom *C* gespeichert wird (Scorrano *et al.*, 2002; Frezza *et al.*, 2006; Olichon *et al.*, 2007; Yamaguchi *et al.*, 2008). In der Anfangsphase der Apoptose wird den Mitochondrien eine Umstrukturierung der Cristae signalisiert, wodurch die Abgabe von Cytochrom *C* ins Cytosol eingeleitet wird (Scorrano *et al.*, 2002). Dieses bildet eines der Hauptsignale für den apoptotischen Vorgang. Die Rhomboid-ähnliche Protease PARL ist für ein ausgewogenes Verhältnis von OPA1 in seiner Transmembran-Form und dem löslichen OPA1-Spaltprodukt verantwortlich. Dieses Verhältnis ist essentiell für die Bildung der Cristae-Struktur (Cipolat *et al.*, 2004; Ishihara *et al.*, 2006; Griparic *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007; Guillery *et al.*, 2008). Den Prototyp einer Protease mit zweigeteilter Funktion mit einem Substrat bildet die PARL-Typ-Protease PCP1p aus *S. cerevisiae*. Diese ist in der Lage, die mitochondriale Funktion mit Hilfe des Substrates MGM1p zu regulieren (Wong *et al.*, 2000; McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2003). Dem zweiten Substrat CCP1p (Esser *et al.*, 2002) hingegen wird keine so schwerwiegende Rolle beigemessen. Jedoch ist nachgewiesen, dass die CCP1p durch Wasserstoffperoxid induziert wird und anschließend den Transkriptionsfaktor Pos9p/Skn7p aktiviert. Die Aktivierung geschieht nur im oxidierten Zustand von CCP1p und hat die Expression antioxidativer Gene wie Thioredoxin 2 zur Folge (Charizanis *et al.*, 1999). Ein Einfluss der PARL-Typ-Proteasen auf den Redox-Zustand der Mitochondrien wurde auch bei Würmern und Säugern beobachtet (Walder *et al.*, 2005; Ishihara *et al.*, 2006; Kanazawa *et al.*, 2008). Das wird jedoch häufig durch den dramatischen Effekt einer Mutation auf die Lebensspanne überdeckt (Cipolat *et al.*, 2006; McQuibban *et al.*, 2008). Zusätzlich ist bekannt, dass oxidativer Stress einen Auslöser von Apoptose und Seneszenz darstellt (Migliaccio *et al.*, 1999; Aguilaniu *et al.*, 2003; Macip *et al.*, 2003; Serra *et al.*, 2003; Kanazawa *et al.*, 2008), weshalb der Redox-Zustand der Zellen ausbalanciert sein muss.
RLP1 aus *R. commune* hat vermutlich eine Funktion ähnlich der von *Sc*PCP1p gegenüber CCP1p. Einen Hinweis darauf liefert die Deletionsmutante, welche auf der Oberfläche des Flüssigmediums langsamer das Myzel ausbildet. Dies könnte durch die höhere Sauerstoffkonzentration bei Luftkontakt ausgelöst werden. In *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Expression der *CCP1* unter aeroben Bedingungen erhöht ist (Kwon *et al.*, 2003). Molekularer Sauerstoff führt in der Zelle zu erhöhten Konzentrationen reaktiver Sauerstoffderivate und somit zu oxidativen Stress. Auch konnten einige Sequenzmotive im Promotor der *RLP1* gefunden werden, an die bei anderen Genen und in anderen Organismen Redox-sensitive Transkriptionsfaktoren binden. Zuletzt geben die Modellstruktur, die Position und der Ge-

halt schwefelhaltiger Aminosäuren Anlass zu der Vermutung einer solchen Funktion.
Die Tatsache, dass die Mutation im *RLP1*-Gen zur Dunkelfärbung des Myzels bei Nährstoffmangel führt, kann ebenfalls ein Hinweis auf eine Sensitivität gegenüber reaktiven Sauerstoffderivaten sein. Die Dunkelfärbung in Pilzen rührt von der Melaninbiosynthese her (Butler & Day, 1998). Melanin kann dabei mehrere Aufgaben erfüllen. In manchen phytopathogenen Pilzen wird Melanin in den Appressorien gebildet (Chumley & Valent, 1990; Howard & Valent, 1996; Kawamura *et al.*, 1997). Es dient neben dem Schutz vor hohen Metallkonzentrationen (Rizzo *et al.*, 1992), extremer Temperatur (Rosas & Casadevall, 1997) und enzymatischer Lyse (DeCal & Melgarejo, 1994) auch gegen Schäden durch UV-Strahlung (Wang & Casadevall, 1994; Zhdanova *et al.*, 1994; Rehstrom & Free, 1997) und Oxidantien (Aver'yanov *et al.*, 1989; Sichel *et al.*, 1991; Jacobson & Hong, 1997; Nyphus *et al.*, 1997; Wu *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2010).
Um die Funktion von RLP1 zu evaluieren, benötigt man jedoch das Substrat. Nur damit kann ein Zusammenhang zwischen dem Phänotyp der Deletion, der Funktion homologer Proteine und der Struktur bzw. Funktion von RLP1 erschlossen werden. Die mitochondrialen Substrate Rhomboid-ähnlicher Proteasen sind trotz homologer Funktionen in der Aminosäuresequenz nicht sehr hoch konserviert. *Sc*MGM1p und *Hs*OPA1 beispielsweise sind nur zu 30 % homolog. Die ähnlichen Bereiche beziehen sich dabei auf die funktionellen Domänen wie die GTPase-Domänen (Cipolat *et al.*, 2004). Durch die Analyse einer EST-Datenbank von *R. commune* konnten auch vier abgeleitete Aminosäuresequenzen mit ähnlichen Domänen wie in *Sc*MGM1p gefunden werden. Ob ein Protein davon allerdings in der mitochondrialen Fusion eine Rolle spielt, kann zu dem jetzigen Zeitpunkt nicht gesagt werden. Die vier EST-Sequenzen sind unvollständig und die abgeleitete Aminosäuresequenz enthält nur Fragmente der DynaminN-ähnlichen GTPase-Domäne. Aus diesem Grund konnte auch keine Prognose über eine mögliche mitochondriale Translokation durchgeführt werden. Die einzige Hypothese hinsichtlich des Substrates, die aus der Analyse der EST-Datenbank entwickelt werden kann, ist, dass der Mechanismus der mitochondrialen Fusion wahrscheinlich auch in *R. commune* konserviert ist. Es konnten zu den am Fusionsmechanismus beteiligten bekannten Proteinen (MGM1p, FZO1p und UPS1p; Westermann, 2000; Sesaki *et al.*, 2006) mindestens ein Homologes gefunden werden. Zusätzlich dazu konnten sogar zwei mögliche Peroxidasen und ein putativer Transkriptionsfaktor, die sehr hohe Ähnlichkeit zu *Sc*CCP1p und *Sc*Pos9p aufweisen, identifiziert werden. Folglich kann auch die zelluläre Reaktion bei oxidativen Stress in *R. commune* konserviert sein. Die RLP1 könnte an diesem Prozess beteiligt sein.

4.4 Paraloge zur Rc*RLP1*

Falls der mitochondriale Fusionsmechanismus konserviert ist, muss es eine Protease geben, die die Spaltung des MGM1p-Homologen vermittelt. Bei einer Analyse der EST-Datenbank von *R. commune* konnten insgesamt fünf Nukleotidsequenzen Rhomboid-ähnlicher Proteasen

identifiziert werden. Unter diesen war neben der RLP1 eine weitere putativ mitochondriale Rhomboid-ähnliche Protease, RLP2. Die Lokalisierung von RLP2 wurde bisher experimentell noch nicht bestätigt. Jedoch konnte die komplette kodierende Nukleotidsequenz identifiziert werden. Die davon abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt nach einer *in-silico*-Analyse eine hohe Wahrscheinlichkeit für die mitochondriale Translokation. Zusätzlich enthält RLP2 anders als RLP1 das hochkonservierte Asparagin an Position 80 (Abb. 66). Sie entspricht somit einer typischen PARL-Protease. Vermutlich ist RLP2 das funktionelle *Sc*PCP1p-Homologe und somit an der Membranfusion der Mitochondrien beteiligt. Um dies zu verifizieren, müsste das Substrat von RLP2 identifiziert und eine mögliche Prozessierung untersucht werden. Mögliche Kandidaten als MGM1p-Homologes wären die vier putativen DynaminN-ähnlichen GTPasen aus der Analyse der EST-Datenbank. Diese müssten zunächst auf RNA-Ebene vervollständigt werden. Ein anschließender Aktivitätsassay in Form einer Komplementation der *GLPG*-Deletionsmutante von *E. coli* mit dem *RLP2*-Gen und jeweils einem der möglichen Substrate könnte eine direkte Prozessierung nachweisen. Ein eventuell schnellerer Hinweis auf eine homologe Funktion könnte darüber hinaus eine Komplementation der *PCP1*-Deletion in *S. cerevisiae* geben.

Das Vorliegen zweier Rhomboid-ähnlicher Proteasen in Mitochondrien von *R. commune* ist hiermit das erste Mal gefunden worden. Bisher wurde postuliert, dass nur eine mitochondriale Rhomboid-ähnliche Protease pro Spezies kodiert ist (Koonin *et al.*, 2003; Lemberg & Freeman, 2007). Das Vorkommen von zwei Proteasen des selben Typs könnte eine Aufspaltung der Funktion des ursprünglichen Gens zur Folge haben. Es ist möglich, dass RLP2 die Funktion der *Sc*PCP1p gegenüber ihrem Substrat *Sc*MGM1p ausführt und RLP1 eine ähnliche Rolle wie *Sc*PCP1p mit dem Substrat *Sc*CCP1p übernimmt. Ähnliches wurde bereits für Enzyme aus verschiedenen Stoffwechselwegen beschrieben. Beispielsweise sind die Homospermidinsynthase und die Deoxyhypusinsynthase aus einem Vorläuferprotein entstanden. Sie sind zu 80 % identisch und zeigen sogar fast exakt die gleiche Genstruktur (Ober & Hartmann, 1999b). Beide Enzyme stammen aus verschiedenen Stoffwechselprozessen - die Homospermidinsynthase ist im Sekundärstoffwechsel unter anderem von *Senecio vernalis* in die Pyrrolizidinbiosynthese und somit in der Abwehr von Insekten involviert (Böttcher *et al.*, 1993); die Deoxyhypusinsynthase hingegen spielt eine regulatorische Rolle in der posttranslationellen Modifizierung des Initiationsfaktors 5A (Ober & Hartmann, 1999a). Die Hypothese der Subfunktionalisierung (Hughes, 1994, 2002; Force *et al.*, 1999) schließt permanten Selektionsdruck der duplizierten Gene ein, wodurch degenerative Mutationen akkumulieren können (Roth *et al.*, 2007). Dadurch wird die Substratspezifität und demnach die Subfunktion moduliert (Hughes, 1994; Mayr, 1997). Die gegenteilige Version dieses evolutionären Schrittes scheinen die Substrate durchzumachen. Möglicherweise wurden diese bzw. ähnliche Funktionen der zwei Substrate MGM1p und CCP1p aus *S. cerevisiae* in tierischen Organismen von einem Protein, OPA1 und seinen Homologen, übernommen.

Falls das *RLP1*-Gen durch Duplikation entstanden ist, muss dieser Vorgang vor der Entstehung der *Rhynchosporium*-Gattung erfolgt sein. Das wird durch die Tatsache gestützt, dass einerseits RLP1 in allen bisher sequenzierten Genomen von *Rhynchosporium* kodiert ist und dass andererseits dieses Gen sehr hoch konserviert ist. Das Vorläufergen bleibt jedoch unbekannt, da sich alle anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen aus *R. commune* schon von der Aminosäuresequenz mit mehr als 50 % von der RLP1 unterscheiden. Der Unterschied auf DNA-Ebene ist aufgrund der degenerierten Codon-Nutzung noch wesentlich höher. Entweder ist die funktionelle Abspaltung von den Proteasen des PARL-Typs früh nach der Abspaltung der Hefen von den Vorläuferorganismen von *Rhynchosporium* geschehen oder RLP1 entstand aus einem anderen Vorläuferprotein. Bei den Rhomboid-ähnlichen Proteasen werden nichtenzymatische Transportproteine als mögliche Urproteine angenommen. Ein solches Vorläuferprotein wäre auch für RLP1 denkbar. Die Tatsache, dass bis jetzt keine Rhomboid-ähnliche Protease mit einem ähnlichen schwefelreichen Zentrum gefunden wurde, macht die Ableitung der RLP1-Herkunft bei der Fülle an bekannten Genomen kompliziert.

"We see nothing of these slow changes in progress, until the hand of time has marked the long lapse of ages, [...] that we only see that the forms of life are now different from what they formerly were.[2] *"*

Darwin (1859)

[2] Deutsche Übersetzung von Dr. H. G. Bronn: Wir sehen nichts von diesen langsam fortschreitenden Veränderungen, bis die Hand der Zeit auf eine abgelaufene Periode hindeutet, [...] dass wir nur noch das Eine wahrnehmen, dass die Lebensformen jetzt ganz andre sind, als sie früher gewesen.

5 Weiter führende Arbeiten

Die Evaluierung der RLP1-Funktion sollte im Vordergrund der fortführenden Arbeiten stehen. Ein erster Schritt dafür wäre die Verifizierung des Phänotyps der Deletionsmutante UK7-Δ*RLP1* durch eine Komplementation mit dem genuinen *RLP1*-Gen. Dadurch sollte das Wachstum des emersen Myzels in Flüssigkulturen wieder dem des Wildtyps gleichen. Ein Einfluss des Cysteins an Position C179 auf die RLP1-Funktion könnte mit der Komplementation der UK7-Δ*RLP1*-Mutante mit der in diesem Cystein mutierten RLP1 untersucht werden.
Weiterhin ist es notwendig, die mögliche Rolle in Prozessen zu evaluieren, welche den Redox-Status des Pilzes definieren. Ein denkbarer Ansatz dafür wäre, die Auswirkungen reaktiver Sauerstoffderivate auf das Wachstum des Wildtyp-Isolates UK7 und dessen *RLP1*-Mutanten zu beobachten. Die Schwierigkeit dabei liegt aufgrund der langen Wachstumszeit in der Kurzlebigkeit solcher Sauerstoffderivate. Deshalb müssten diese entweder regelmäßig in nicht allzu hohen Konzentrationen aufgefrischt werden. Über das Verhalten des Pilzes gegenüber solchen reaktiven Sauerstoffderivaten ist bisher nichts bekannt, weshalb vorerst eine geeignete Konzentration für diesen Test gefunden werden müsste.
Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung der RLP1-Funktion wäre eine Messung des oxidativen Stresslevels in Wildtyp UK7 und dessen Mutanten. Oxidativer Stress spiegelt sich unter anderem in der Menge an oxidierten Cysteinen, also der Menge an Disulfidbrücken, wider (Weissbach *et al.*, 2002). Hat RLP1 einen Einfluss auf den Redox-Status des Pilzes, kann durch Markierung der Disulfidbrücken mit Fluoreszenzfarbstoffen ein Unterschied in der Gesamtmenge pro Milligramm Protein festgestellt werden (Pérez *et al.*, 2010). Man kann sogar die betroffenen Proteine mit Hilfe von MALDI-TOF/MS identifizieren.
Eine wichtige Frage im Zusammenhang mit der RLP1-Funktion ist, ob das Protein eine aktive Protease ist und welches Substrat diese dann prozessiert. Es kann aber auch sein, dass RLP1 keine proteolytische Aktivität *in vivo* besitzt. In diesem Fall ist es für die Evaluierung der Funktion interessant, mit welchen Proteinen oder anderen Molekülen RLP1 interagiert. Über die möglichen Interaktionspartner bzw. Substrate kann die Funktion und der Reaktionsmechanismus untersucht werden. Interagierende Proteine innerhalb einer Membran zu identifizieren, ist nicht einfach. Systeme wie das bakterielle *two-hybrid*-System (Karimova *et al.*, 1998; Rohrer & Berger-Bächi, 2003) scheiden aus, da Membranproteine beispielsweise in *E. coli* oft toxisch wirken (Frommer & Ninnemann, 1995). Es wurde jedoch ein System in Hefe etabliert, mit welchem durch die Zusammenführung zweier einzeln inaktiver Ubiquitinbruchstücke mögliche Protein-Protein-Interaktionen identifiziert werden. Dazu werden Fusionsproteine generiert, wobei eines der beiden Fusionsproteine eine Art Protein-Bank von *R. commune* darstellt. Dieses nennt sich *mating-based split-ubiquitin system* (Obrdlik *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2005). Eine zweite Möglichkeit eines solchen Interaktionstests kann die

FRET-Methode darstellen (Thaler *et al.*, 2005; Koushik *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2006). Nachteilig wirkt sich dann jedoch das Platzangebot der Proteine aus. Dieses wird durch die 2-dimensionale Lage der Membran bestimmt. Somit nimmt die Wahrscheinlichkeit von falsch-positiven Kandidaten zu.
Im Falle einer aktiven Protease ließe sich das *mating-based split-ubiquitin system* mit Hilfe der proteolytischen Aktivität vereinfachen und zusätzlich ein Aktivitätstest herstellen. Dafür müsste das mögliche Substrat C-terminal mit einer Fusion aus einem mitochondrialen Signalpeptid und dem Transkriptionsfaktor, welcher den Selektionsmarker aktivieren soll, in Leserichtung fusioniert werden. Als Substrat könnten zunächst die bereits als putative Peroxidasen bzw. DynaminN-ähnliche GTPasen identifizierten Proteine fungieren. Man könnte in diesem System auch eine cDNA-Bank nach weiteren möglichen Substraten durchsuchen.
Die schon identifizierten möglichen Substrate können ebenfalls in *E. coli* auf die Prozessierung durch eine Rhomboid-ähnliche Protease überprüft werden. Das kann im genuinen Organismus *R. commune* mit Hilfe eines markierten Substrates (zum Beispiel mit His-Tag) per Immunodetektion durchgeführt werden.
Die Proteine mit DynaminN-ähnlichen GTPase-Domänen könnten ebenso Substrate von RLP2 sein. Proteolysetests können, wie für RLP1 oben beschrieben, durchgeführt werden. Zusätzlich kann eine mögliche Funktion der RLP2 als Homologes der *Sc*PCP1p durch eine Komplementation der Deletionsmutante der Bäckerhefe mit der *RLP2* untersucht werden.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein mitochondriales Protein, RLP1 aus *R. commune*, welches den PARL-Typ-Proteasen zugeordnet wurde, partiell funktionell charakterisiert. RLP1 besitzt ein äußerst seltenes Cystein an der Position eines sonst hoch konservierten Asparagins. Dieses Cystein ist in eine schwefelreiche Gruppe von vier Aminosäuren eingebettet. Obwohl für das genuine Protein bisher keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden konnet, ließ sich die Prozessierung eines künstlichen Fusionsprotein nach Mutation dieser einzigartigen Cysteinposition zeigen. Eine Funktion des Cysteins im Reaktionsmechanismus der RLP1 wird deshalb nicht ausgeschlossen.
Aufgrund des Phänotyps zweier *RLP1*-Mutanten in *R. commune*, welcher sich bei Luftkontakt durch eine stark verlangsamte Myzelbildung auszeichnet, wird eine Funktion homolog zur *Sc*PCP1p angenommen. Deletion der *PCP1* in *S. cerevisiae* führte unter anderem zum Verlust der Respiration. Eine Komplementation dieses Phänotypes mit *RLP1* war sowohl mit dem genuinen Gen als auch mit einer Mutation im Cystein-Codon nicht erfolgreich. Deshalb erfüllt die *Rc*RLP1 höchstwahrsscheinlich nur einen Teil der Funktion der *Sc*PCP1p, nämlich den gegenüber dem Substrat CCP1p.
Eine EST-Datenbank-Analyse zeigte eine zweite mutmaßlich mitochondrial lokalisierte Rhomboid-ähnliche Protease (*RLP2*) von *R. commune*. Dies widerspricht sich mit der angenommenen These, dass jede Spezies nur eine mitochondriale Rhomboid-ähnliche Protease enthält. Da RLP2 sämtliche Eigenschaften der PARL-Typ Proteasen inklusive des hochkonservierten Asparagins aufweist, könnte es sich bei diesem Protein um das PCP1-Homologe mit einer Funktion in der mitochondrialen Morphologie handeln. Möglicherweise sind die RLP1 und RLP2 ein Beispiel für die Subfunktionalisierungshypothese von Hughes (1994), sodass die beiden Funktionen der PARL-Typ-Proteasen auf zwei Enzyme evolutionär aufgeteilt wurden.

Literatur

Aguilaniu, H., Gustafsson, L., Rigoulet, M., & Nyström, T. 2003. Asymmetric inheritance of oxidatively damaged proteins during cytokinesis. *Science*, **299**, 1751 – 1753.

Akiyama, Y., & Maegawa, S. 2007. Sequence features of substrates required for cleavage of GlpG, an *Escherichia coli* rhomboid protease. *Mol. Microbiol.*, **64**, 1028 – 1037.

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S. S., & Wissinger, B. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature Genet.*, **20**, 211 – 215.

Ali, S. M., Mayfield, A. H., & Clare, B. G. 1976. Pathogenicity of 203 isolates of *Rhynchosporium secalis* on 21 barley cultivars. *Physiol. Plant. Path.*, **9**, 135 – 143.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403 – 410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389 – 3402.

Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A. A., & Yu, Y.-K. 2005. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J.*, **272**, 5101 – 5109.

Annweiler, A., Hipskind, R. A., & Wirth, T. 1991. A strategy for efficient *in vitro* translation of cDNAs using the rabbit β-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 3750.

Aver'yanov, A., Lapikova, V., Petelina, G., & Dzhavakhiya, V. 1989. Increased sensitivity of pigment mutants of *Pyricularia oryzae* to toxic excetions of rice leaves. *Fiziol. Rast.*, **36**, 1088 – 1095.

Ayesu-Offei, E. N., & Clare, B. G. 1970. Processes in the infection of barley leaves by *Rhynchosporium secalis*. *Aust. J. Biol. Sci.*, **23**, 299 – 307.

Badr, A., Müller, K., Schäfer-Pregl, R., Rabey, H. El, Effgen, S., Ibrahim, H. H., Pozzi, C., Rohde, W., & Salamini, F. 2000. On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*). *Mol. Biol. Evol.*, **17**, 499 – 510.

Baker, R. P., Wijetilaka, R., & Urban, S. 2006. Two *Plasmodium* rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria. *PLoS Pathogens*, **2**, 922 – 932.

Balaban, R. S., Nemoto, S., & Finkel, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483 – 495.

Bang, A. G., & Kintner, C. 2000. Rhomboid and Star facilitate presentation and processing of the *Drosophila* TGF-a homolog Spitz. *Genes Dev.*, **14**, 177 – 186.

Ben-Shem, A., Fass, D., & Bibi, E. 2007. Structural basis for intramembrane proteolysis by rhomboid serine proteases. *PNAS*, **104**, 462 – 466.

Bender, A., Hajieva, P., & Moosmann, B. 2008. Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria. *PNAS*, **105**, 16496 – 16501.

Bereta, J., & Bereta, M. 1995. Stimulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA levels by endogenois nitric oxide in cytokine-activated endothelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 363 – 369.

Betz, S. F. 1993. Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci.*, **2**, 1551 – 1558.

Bhatia, P., Taylor, W. R., Greenberg, A. H., & Wright, J. A. 1994. Comparision of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Analyt. Biochem.*, **216**, 223 – 226.

Bhattacharyya, R., Pal, D., & Chakrabarti, P. 2004. Disulfide bonds, their stereospecific environment and conservation in protein structures. *Prot. Eng. Des. Sel.*, **17**, 795 – 808.

Bier, E., Jan, L. Y., & Jan, Y. Nung. 1990. *Rhomboid*, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.*, **4**, 190 – 120.

Blake, C. C. F., Ghosh, M., Harlos, K., Avezoux, A., & Anthony, C. 1994. The active site of methanol dehydrogenase contains a disulphide bridge between adjacent cysteine residues. *Nature Struct. Biol.*, **1**, 103 – 105.

Bouajila, A., Zoghlami, N., Ghorbel, A., Rezgui, S., & Yahyaoui, A. 2010. Pathotype and microsatellite analyses reveal new sources of resistance to barley scald in tunisia. *FEMS Microbiol. Letters*, **305**, 35 – 41.

Brossier, F., Jewett, T. J., Sibley, L. D., & Urban, S. 2005. A spatially localized rhomboid protease cleaves cell surface adhesins essential for invasion by *Toxoplasma*. *PNAS*, **102**, 4146 – 4151.

Bryson, K., McGuffin, L. J., Marsden, R. L., Ward, J. J., Sodhi, J. S., & Jones, D. T. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucl. Acids Res.*, **33**, W36–W38.

Böttcher, F., Adolph, R. D., & Hartmann, T. 1993. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, **32**, 679 – 689.

Bucher, P. 1990. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.*, **212**, 563 – 578.

Butler, M. J., & Day, A. W. 1998. Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1115 – 1136.

Chae, M. S., Lin, C. C., Kessler, K. E., Nargang, C. E., Tanton, L. L., Hahn, L. B., & Nargang, F. E. 2007. Identification of an alternative oxidase intuction motif in the promoter region of the *aod-1* gene in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **175**, 1597 – 1606.

Chan, C. Y., Kiechle, M., Manivasakam, P., & Schiestl, R. H. 2007. Ionizing radiation and restriction enzymes induce microhomology-mediated illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5051 – 5059.

Chang, T. J., Juan, C. C., Yin, P. H., Chi, C. W., & Tsay, H. J. 1998. Up-regulation of β-actin, cyclophilin and GAPDH in N!S! rat hepatoma. *Oncol. Rep.*, **5**, 469 – 471.

Chao, J.-R., Parganas, E., Boyd, K., Hong, C. Y., Opferman, J. T., & Ihle, J. N. 2008. Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature letters*, **452**, 98 – 102.

Charizanis, C., Juhnke, H., Krems, B., & Entian, K.-D. 1999. The mitochondrial cytochrome c peroxidase Ccp1 of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in conveying an oxidative stress signal to the transcription factor Pos9 (Skn7). *Mol. Gen. Genet.*, **262**, 437 – 447.

Chumley, F. G., & Valent, B. 1990. Genetic analysis of melanin-deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **4**, 135 – 143.

Cipolat, S., de Brito, O. M., Zilio, B. Dal, & l. Scorrano. 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *PNAS*, **101**, 15927 – 15932.

Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D'Hooge, R., Scorrano, L., & Strooper, B. De. 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome *c* release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*, **126**, 163 – 175.

Claros, M.G., & Vincens, P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem*, **241**, 779 – 786.

Consortium, The UniProt. 2010. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.*, **38**, D142 – D148.

Cox, A. G., Pullar, J. M., Hughes, G., Ledgerwood, E. C., & Hampton, M. B. 2008. Oxidation of mitochondrial peroxiredoxin 3 during the initiation of receptor-mediated apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.*, **44**, 1001–1009.

Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., & Elofsson, A. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in procariotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot. Eng.*, **10**, 673 – 676.

Cunha, M. M. L., Franzen, A. J., Seabra, S. H., Herbst, M. H., Vugman, N. V., Borba, L. P., de Souza, W., & Rozental, S. 2010. Melanin in *Fonsecaea pedrosoi*: a trap for oxidative radicals. *BMC Microbiol.*, **10**, 80 – 89.

Daher, G. C., Harris, B. E., & Diasio, R. B. 1990. Metabolism of pyrimidine analogues and their nucleosides. *Pharmacol. Ther.*, **48**, 189 – 222.

Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.* John Murray.

De-Cal, A., & Melgarejo, P. 1994. Effect of *Penicillium frequentans* and its antibiotics on unmelanized hyphae of *Monilinia laxa*. *Phytopathology*, **84**, 1010 – 1014.

de Souza, C. C., de S. Goldman, M. H., & Goldman, G. H. 2000. Tagging of genes involves in multidrug resistance in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **263**, 702 – 711.

Desiraju, G. R., & Steiner, T. 1999. *The Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology.* Oxford University Press.

Devic, M., Albert, S., Delseny, M., & Roscoe, T. J. 1997. Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiol. Biochem.*, **35**, 331–339.

Doolittle, W. F. 1998. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.*, **14**, 307 – 311.

Dowse, T. J., & Soldati, D. 2005. Rhomboid -like proteins in Apicomplexa: phylogeny and nomenclature. *Trends Parasitol.*, **21**, 254 – 258.

Durbin, R., Eddy, S., Krogh, A., & Mitchison, G. 1998. *Biological seqeuence analysis.* Cambridge: Cambridge University Press.

Dutt, A., Canevascini, S., Froehli-Hoier, E., & Hajnal, A. 2004. EGF signal propagation during *C. elegans* vulval development mediated by ROM-1 rhomboid. *PLoS Biol.*, **2**, e334.

Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols*, **2**, 953 – 971.

Erez, E., Fass, D., & Bibi, E. 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature*, **459**, 371 – 378.

Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G., & Pratje, E. 2002. A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.*, **323**, 835 – 843.

Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Böckler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., S. Moxon, M. Marshall, Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L., & Bateman, A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D247 – D251.

Finn, R. D., Mistry, J., Tate, J., Coggill, P., Heger, A., Pollington, J. E., Gavin, O. L., Gunesekaran, P., Ceric, G., Forslund, K., Holm, L., Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., & Bateman, A. 2010. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **38**, D211–D222.

Foltenyi, K., Greenspan, R. J., & Newport, J. W. 2007. Activation of EGFR and ERK by rhomboid signaling regulates the consolidation and maintenance of sleep in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.*, **10**, 1160 – 1167.

Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., & Yan, Y.-L. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, **151**, 1531 – 1545.

Fredrick, K., & Ibba, M. 2010. How the sequence of a gene can tune its translation. *Cell*, **141**, 227–229.

Freeman, M. 1994. The spitz gene is required for photoreceptor determination in the *Drosophila* eye where it interacts with the EGF receptor. *Mech. Dev.*, **48**, 25–33.

Frezza, C., Cipolat, S., de Brito, O. M., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., Strooper, B. De, & Scorrano, L. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*, **126**, 177–189.

Friedmann, E., Lemberg, M. K., Weihofen, A., Dev, K. K., Dengler, U., Rovelli, G., & Martoglio, B. 2004. Consensus analysis of signal peptide peptidase and homologous human aspartic proteases reveals opposite topology of catalytic domains compared with presenilins. *J. Biol. Chem.*, **279**, 50790–50798.

Frommer, W., & Ninnemann, O. 1995. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and platn cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **46**, 419 – 444.

Gakh, O., Cavadini, P., & Isaya, G. 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 63 – 77.

Gallio, M., Sturgill, G., Rather, P., & Kylsten, P. 2002. A conserved mechanism for extracellular signaling in eukaryotes and prokaryotes. *PNAS*, **99**, 12208 – 12213.

Gardiner, D. M., & Howlett, B. J. 2004. Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus Leptosphaeria maculans. *Current Genetics*, **45**, 249 – 255.

Georgiou, G., & Masip, L. 2003. An overoxidation journey with a return ticket. *Science*, **300**, 592–594.

Gietz, R. D., & Akio, S. 1988. New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527 – 534.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., & Piette, J. 2006. NF-κB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.*, **72**, 1493 – 1505.

Gohlke, U., Pullan, L., McDevitt, C. A., Porcelli, I., de Leeuw, E., Palmer, T., Saibil, H. R., & Berks, B. C. 2005. The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *PNAS*, **102**, 10482–10486.

Griparic, L., Kanazawa, T., & van der Bliek, A. M. 2007. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.*, **178**, 757 – 764.

Grivell, A. R., & Jackson, J. F. 1968. Thymidine kinase: evidence for its absence from *Neurospora crassa* and some other micro-organisms, and the relevance of this to specific labelling of deoxyribonucleic acid. *J. Gen. Microbiol.*, **54**, 307 – 317.

Guichard, A., Biehs, B., Sturtevant, M. A., Wickline, L., Chacko, J., Howard, K., & Bier, E. 1999. *Rhomboid* and *Star* interact synergistically to promote EGFR/MAPK signaling during *Drosophila* wing vein development. *Development*, **126**, 2663 – 2676.

Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombès, A., Belenguer, P., Arnoult, D., & Rojo, M. 2008. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell*, **100**, 315 – 325.

Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A. C., & Reed, J. C. 2003. Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature*, **423**, 456 – 461.

Habgood, R M, & Hayes, J D. 1971. The inheritance of resistance to *Rhynchosporium secalis* in barley. *Heredity*, **27**, 25Ű37.

Hause, G., & Jahn, S. 2010. Preparation of fungi for ultrastructural investigations and immunogoldlabelling. *Methods Mol. Biol.*, **638**, 291 – 301.

Henikoff, S, & Henikoff, J G. 1992. Amino acid substitution matrices from protein blocks. *PNAS*, **89**, 10915 – 10919.

Henikoff, S., & Henikoff, J. G. 1993. Performance evaluation of amino acid substitution matrices. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, **17**, 49 – 61.

Herlan, M., Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., & Reichert, A. S. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance

of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 27781 – 27788.

Herlan, M., Bornhövd, C., Hell, K, Neupert, W., & Reichert, A. S. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.*, **165**, 167 – 173.

Hinshaw, J. E., & Schmid, S. L. 1995. Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, **374**, 190 – 192.

Hofmann, K., & Stoffel, W. 1993. TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem.*, **374**, 166.

Holmgren, A. 1979. Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides: purification and characterization of glutaredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 3664 – 3671.

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., & Nakai, K. 2006. *Protein subcellular localization prediction with WoLF PSORT*. London: Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBC06, Imperial College Press.

Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, **35**, W585 – 587.

Howard, R. J., & Valent, B. 1996. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisae*. *Annu. Rev. Microbiol.*, **50**, 491 – 512.

Howell, S. A., Hackett, F., Jongco, A. M., Withers-Martinez, C., Kim, K., Carruthers, V. B., & Blackman, M. J. 2005. Distinct mechanisms govern proteolytic shedding of a key invasion protein in apicomplexan pathogens. *Mol. Microbiol.*, **57**, 1342 – 1356.

Howell, S. L., & Tyhurst, M. 1979. Interaction between insulin-storage granules and F-actin *in vitro*. *Biochem. J.*, **178**, 367 – 371.

Hughes, A. L. 1994. The evolution of functionally novel proteins after gene duplication. *Proc. Biol. Sci.*, **256**, 119 – 124.

Hughes, A. L. 2002. Adaptive evolution after gene duplication. *Trends Genet.*, **18**, 433 – 434.

Hwang, J. C., Chang, L. C., Lin, Y. F., Shui, H. A., & Chen, J. S. 2010. Effects of fungal statins on high-glucose-induced mouse mesangial cell hypocontractility may involve filamentous actin, t-complex polypeptide 1 subunit beta, and glucose regulated protein 78. *Transl. Res.*, **156**, 80 – 90.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., & Mihara, K. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO Journal*, **25**, 2966 – 2977.

Ivashchenko, A. T., Tauasarova, M. K., & Atambaeva, S. A. 2009. Exon-intron structure of genes of fungi genomes. *Mol Biol (Mosk)*, **43**, 28–35.

Iwaoka, M., Takemoto, S., Okada, M., & Tomoda, S. 2002. Weak nonbonded SŮŮŮX (X = O, N, and S) interactions in proteins: statistical and theoretical studies. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **75**, 1611 – 1625.

Jacobson, E. S., & Hong, J. D. 1997. Redox buffering by melanin and Fe (II) in *Cryptococcus neoformans*. *J. Bacteriol.*, **179**, 5340 – 5346.

Jeyaraju, D. V., Xu, L., Letellier, M.-C., Bandaru, S., Zunino, R., Berg, E. A., & anf L. Pellegrini, H. M. McBride. 2006. Phosphorylation and cleavage of presenilin-associated rhomboid-like protein (PARL) promotes changes in mitochondrial morphology. *PNAS*, **103**, 18562 – 18567.

Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.*, **292**, 195 – 202.

Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. 1994. A model recognition approach to the prediction of all-helical membrane protein structure and topology. *Biochemistry*, **33**, 3038 – 3049.

Juven-Gershon, T., & Kadonaga, J. T. 2010. Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery. *Dev. Biol.*, **339**, 225 – 229.

Kahmann, R., & Basse, C. 1999. REMI (restriction enzyme mediated Integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. *Europ. J. Plant Path.*, **105**, 221–229.

Kanazawa, T., Zappaterra, M. D., Hasegawa, A., Wright, A. P., Newman-Smith, E. D., Buttle, K. F., McDonald, K., Mannella, C. A., & van der Bliek, A. M. 2008. The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genetics*, **4**, e1000022.

Kao, P. N., & Karlin, A. 1986. Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8085 – 8088.

Karakasis, K., Taylor, D., & Ko, K. 2007. Uncovering a Link between a Plastid Translocon Component and Rhomboid Proteases Using Yeast Mitochondria-Based Assays. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 655 – 661.

Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., & Ladant, D. 1998. A bacterial two-hyvrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *PNAS*, **95**, 5752 – 5756.

Kawamura, C., Moriwaki, J., Kimura, N., Fujita, Y., Fuji, S. I., Hirano, T., Koizumi, S., & Tsuge, T. 1997. The melanin biosynthesis genes of *Alternaria alternata* can restore pathogenesis of the melanin deficient mutants of *Magnaporteh grisea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 446 – 453.

Kim, J. H., Na, H. J., Kim, C. K., Kim, J. Y., Ha, K. S., Lee, H., Chung, H. T., Kwon, H. J., Kwon, Y. G., & Kim, Y. M. 2008. The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-κB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-κB-inducing kinase pathways: role of H_2O_2 in NF-κB activation. *Free Radic. Biol.*, **45**, 885 – 896.

Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.*, **338**, 1027 – 1036.

Koonin, E. V., & Galperin, M. Y. 2002. *Sequence - evolution - function: computational approaches in comparative genomics*. Kluwer Academic Publishers.

Koonin, E. V., Makarova, K. S., Rogozin, I. B., Davidovic, L., Letellier, M.-C., & Pellegrini, L. 2003. The rhomboids: a nearly ubiquitous family of intramembrane serine proteases that probably evolved by multiple ancient horizontal gene transfer. *Genome Biol.*, **4**, R19.1 – R19.12.

Koushik, S. V., Chen, H., Thaler, C., III, H. L. Puhl, & Vogel, S. S. 2006. Cerulean, Venus, and VenusY67C FRET reference standards. *Biophys J.*, **91**, L99 – L101.

Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.*, **305**, 567 – 580.

Kuge, S., & Jones, N. 1994. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.*, **13**, 655 – 664.

Kumar, S., Dudley, J., Nei, M., & Tamura, K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequence. *Briefings in Bioinformatics*, **9**, 299 – 306.

Kwon, M., Chong, S., Han, S., & Kim, K. 2003. Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1623**, 1 – 5.

Langedijk, J. P. M., van Veelen, P. A., Schaaper, W. M. M., de Ru, A. H., Meloen, R. H., & Hulst, M. M. 2002. A structural model of Pestivirus E^{rns} based on disulfide bond connectivity and homology modeling reveals an extremely rare vicinal disulfide. *J. Virol.*, **76**, 10383 – 10392.

Laskowski, A. 1993. Procheck: a program to check the stereochemical quality of prtoein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283 – 291.

Lee, J. R., Urban, S., Garvey, C. F., & Freeman, M. 2001. Regulated intracellular ligand transport and proteolysis control EGF signal activation in *Drosophila*. *Cell*, **107**, 161 – 171.

Lee, P. A., Tullman-Ercek, D., & G., G. Georgiou. 2006. The bacterial twin-arginine translocation pathway. *Annu. Rev. Microbiol.*, **60**, 373 – 395.

Lehnackers, H., & Knogge, W. 1990. Cytological studies on the infection of barley cultivars with known resistance genotypes by *Rhynchosporium secalis*. *Can. J. Bot.*, **68**, 1953 – 1961.

Lemberg, M. K., & Freeman, M. 2007. Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases. *Genome Research*, **17**, 1634 – 1646.

Lemberg, M. K., Menendez, J., Misik, A., Garcia, M., Koth, C. M., & Freeman, M. 2005. Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified proteases. *EMBO J.*, **24**, 464 – 472.

Lemieux, M. J., Fischer, S. J., Cherney, M. M., Bateman, K. S., & James, M. N. G. 2007. The crystal structure of the rhomboid peptidase from *Haemophilus influenzae* provides insight into intramembrane proteolysis. *PNAS*, **104**, 750 – 754.

Leroy, I., Khosrobakhsh, F., Diot, A., Daloyau, M., Arnauné-Pelloquin, L., Cavelier, C., Emorine, L. J., & Belenguer, P. 2010. Processing of the dynamin Msp1p in *S. pombe* reveals an evolutionary switch between its orthologs Mgm1p in *S. cerevisiae* and OPA1 in mammals. *FEBS letters*, **584**, 3153–3157.

Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. 1996. Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *PNAS*, **93**, 15036 – 15040.

Macip, S., Igarashi, M., Berggren, P., Yu, J., Lee, S. W., & Aaronson, S. A. 2003. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 8576 – 8585.

MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., III, W. E. Reiher, Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C., Stote, R., Straub, J., Watanabe, M., Wiórkiewicz-Kuczera,

J., Yin, D., & Karplus, M. 1998. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3586 – 3616.

Mackey, A. J., Haystead, T. A., & Pearson, W. R. 2002. Getting more from less: algorithms for rapid protein identification with multiple short peptide sequences. *Mol. Cell. Prot.*, **1**, 139 – 147.

Maegawa, S., Ito, K., & Akiyama, Y. 2005. Proteolytic Action of GlpG, a Rhomboid Protease in the *Escherichia coli* Cytoplasmic Membrane. *Biochemistry*, **44**, 13543 – 13552.

Martins, L. M., Iaccarino, I., Tenev, T., Gschmeissner, S., Totty, N. F., Lemoine, N. R., Savopoulos, J., Gray, C. W., Creasy, C. L., Dingwall, C., & Downward, J. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a Reaper-like motif. *J. Biol. Chem.*, **277**, 439–444.

Mayer, U., & Nüsslein-Volhard, C. 1988. A group of genes required for pattern formation in the ventral ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.*, **2**, 1496–1511.

Mayr, E. 1997. *This is biology.* Belknap Press.

McGuire, A. M., Pearson, M. D., Neafsey, D. E., & Galagan, J. E. 2009. Cross-kingdom patterns of alternative splicing and splice recognition. *Genome Biol.*, **9**, R50.

McQuibban, G. A., Saurya, S., & Freeman, M. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*, **423**, 537 – 541.

McQuibban, G. A., Lee, J. R., Zhang, L., Juusola, M., & Freeman, M. 2006. Normal mitochondrial dynamics requires Rhomboid-7 and affects *Drosophila* lifespan and neuronal function. *Current Biology*, **16**, 982 – 989.

Meyer, E. A., Castellano, R. K., & Diederich, F. 2003. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**, 1210Ũ1250.

Migliaccio, E., Giorgio, M., Mele, S., Pelicci, G., Reboldi, P., Pandolfi, P. P., Lanfrancone, L., & Pelicci, P. G. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*, **402**, 309 – 313.

Miller, J. P., Lo, R. S., Ben-Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Noble, W. S., & Fields, S. 2005. Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *PNAS*, **102**, 12123 – 12128.

Moliaka, Y. K., Grigorenkoa, A., Maderaa, D., & Rogaev, E. I. 2004. Impas 1 possesses endoproteolytic activity against multipass membrane protein substrate cleaving the presenilin 1 holoprotein. *FEBS letters*, **557**, 185 – 192.

Moskovitz, J. 2005. Methionine sulfoxid reductases: Ubiquitous enzymes involved in antioxidant defence, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophyys. Acta*, **1703**, 213 – 219.

Nilsson, I. M., Witt, S., Kiefer, H., Mingarro, I., & von Heijne, G. 2000. Distant downstream sequence determinants can control N-tail translocation during protein insertion into the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.*, **275**, 6207–6213.

Nyphus, K. J., Wilborn, A. T., & Jacobson, E. S. 1997. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.*, **65**, 434 – 438.

Ober, D., & Hartmann, T. 1999a. Desoxyhypusine synthase from *Tobacco*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32040 – 32047.

Ober, D., & Hartmann, T. 1999b. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase. *PNAS*, **96**, 14777 – 14782.

Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., E, Boles, André, B., & Frommer, W. B. 2004. K^+ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *PNAS*, **101**, 12242 – 12247.

O'Donnell, R. A., Hackett, F., Howell, S. A., Treeck, M., Struck, N., Krnajski, Z., Withers-Martinez, C., Gilberger, T. W., & Blackman, M. J. 2006. Intramembrane proteolysis mediates shedding of a key adhesin during erythrocyte invasion by the malaria parasite. *J. Cell Biol.*, **17**, 1023 – 1033.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., & Lenaers, G. 2003. Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome *c* release and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **278**, 7743 – 7746.

Olichon, A., Elachouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P., & Lenaers, G. 2007. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **14**, 682 – 692.

Opitz, C., Cristina, M. Di, Reiss, M., Ruppert, T., Crisanti, A., & D., D. Soldati. 2002. Intramembrane cleavage of microneme proteins at the surface of the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. *EMBO J.*, **21**, 1577 – 1585.

Pal, D., & Chakrabarti, P. 2001. Non-hydrogen bond interactions involving the methionine sulfur atom. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **19**, 115Ű–128.

Pascall, J. C., Luck, J. E., & Brown, K. D. 2002. Expression in mammalian cell cultures reveals interdependent, but distinct, functions for Star and Rhomboid proteins in the processing of the *Drosophila* transforming-growth-factor-alpha homologue Spitz. *Biochem. J.*, **363**, 347 – 352.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, **29**, e45.

Pérez, V. I., Pierce, A., de Waal, E. M., Ward, W. F., Bokov, A., Chaudhuri, A., & Richardson, A. 2010. Detection and quantification of protein disulfides in biological tissues: a fluorescence-based proteomic approach. *Methods in Enzymology*, **473**, 161 – 117.

Price, J. V., Clifford, R. J., & Schüpbach, T. 1989. The maternal ventralizing locus torpedo is allelic to faint little ball, an embryonic lethal, and encodes the *Drosophila* EGF receptor homolog. *Cell*, **56**, 1085 – 1092.

Rastogi, R., Bate, N. J., Sivasankar, S., & Rothstein, S. J. 1997. Footprinting of the spinach nitrite reductase gene promotor reveals the preservation of nitrate regulatory elements between fungi and higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **34**, 465 – 476.

Rödiger, A., Baudisch, B., & Klösgen, R. B. 2010. Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J Plant Physiol.*, **167**, 620–624.

Rehstrom, A., & Free, S. 1997. The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **49**, 321 – 330.

Reinhardt, A., & Hubbard, T. 1998. Using neural networks for prediction of the subcellular location of proteins. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 2230 – 2336.

Rizzo, D. M., Blanchette, R. A., & Palmer, M. A. 1992. Biosorption of metal compounds by *Armillaria rhizomorphs*. *Can. J. Bot.*, **70**, 1515 – 1520.

Rohe, M., Gierlich, A., Hermann, H., Hahn, M., Schmidt, B., Rosahl, S., & Knogge, W. 1995. The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrsl resistance genotype. *EMBO J.*, **14**, 4168 – 4177.

Rohrer, S., & Berger-Bächi, B. 2003. Application of a bacterial two-hybrid system for the analysis of protein-protein interactions between FemABX family proteins. *Microbiology*, **149**, 2733 – 2738.

Rosas, A. L., & Casadevall, A. 1997. Melanization affects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to heat and cold. *FEMS Microbiol. Lett.*, **153**, 265 – 272.

Roth, C., Rastogi, S., Arvestad, L., Dittmar, K., Light, S., Ekman, D., & Liberles, D. A. 2007. Evolution after gene duplication: models, mechanisms, sequences, systems, and organisms. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, **308**, 58 – 73.

Rovery, M. 1988. Limited proteolyses in pancreatic chymotrypsinogens and trypsinogens. *Biochimie*, **70**, 1131 – 1135.

Russel, M., & Model, P. 1988. Sequence of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 9015 – 9019.

Russel, M., Model, P., & Holmgren, A. 1990. Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *J. Bacteriol.*, **172**, 1923 – 1929.

Rutledge, B. J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y. N., & Perrimon, N. 1992. The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev.*, **6**, 1503 – 1517.

Sachs, M. S., Selker, E. U., Lin, B., Roberts, C. J., Luo, Z., Vaught-Alexander, D., & Margolin, B. S. 1997. Expression of herpes virus thymidine kinase in Neurospora crassa. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2389 – 2395.

Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & W, W. Martin. 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 429 – 441.

Scazzocchio, C. 2000. The fungal GATA factors. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 126 – 131.

Schejter, E. D., & Shilo, B.-Z. 1989. The *Drosophila* EGF receptor homolog (DER) gene is allelic to faint little ball, a locus essential for embryonic development. *Cell*, **56**, 1093 – 1104.

Schiestl, R. H., Dominska, M., & Petes, T. D. 1993. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: Illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and *in vivo* ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 2697 – 2705.

Schrödinger, LLC. 2010 (August). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1.*

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S. A., Mannella, C. A., & Korsmeyer, S. J. 2002. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome *c* during apoptosis. *Dev. Cell*, **2**, 55 – 67.

Serra, V., von Zglinicki, T., Lorenz, M., & Saretzki, G. 2003. Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *J. Biol. Chem.*, **278**, 6824 – 6830.

Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. Aiken, & Jensen, R. E. 2003. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and

mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 276 – 283.

Sesaki, H., Dunn, C. D., Iijima, M., Shepard, K. A., Yaffe, M. P., Machamer, C. E., & Jensen, R. E. 2006. Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *The Journal of Cell Biology*, **5**, 651 – 658.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V. M., & Dowd, C. A. 2001. Structure, function aand evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.*, **360**, 1 – 16.

Sheiner, L., Dowse, T. J., & Soldati-Favre, D. 2008. Identification of trafficking deteminants for polytopic rhomboid proteases in *Toxoplasma gondii*. *Traffic*, **9**, 665 – 677.

Shephard, K. A., & Yaffe, M. P. 1999. The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, **22**, 711 – 720.

Shilo, B. Z. 2003. Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp. Cell Res.*, **284**, 140 – 149.

Sibley, L. D. 2004. Intracellular parasite invasion strategies. *Science*, **304**, 248 – 253.

Sichel, G., Corsaro, C., Scalia, M., Billo, A. J. Di, & Bonomo, R. P. 1991. In vitro scavenger activity of some flavonoids and melanins against O2-(.). *Free Radic. Biol. Med.*, **11**, 1 – 8.

Sík, A., Passer, B. J., Koonin, E. V., & Pellegrini, L. 2004. Self-regulated cleavage of the mitochondrial intramembrane-cleaving protease PARL yields Pβ, a nuclear-targeted peptide. *J. Biol. Chem.*, **279**, 15323 – 15329.

Singh, S., Plassmeyer, M., Gaur, D., & Miller, L. H. 2007. Mononeme: a new secretory organelle in *Plasmodium falciparum* merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease. *PNAS*, **104**, 20043 – 20048.

Sippl, M. J. 1990. Calculation of conformational ensembles from potentials of mean force. *J. Mol. Biol.*, **213**, 859 – 883.

Snabes, M. C., & Boyd, A. E. 1982. Increased filamentous actin in islet of Langerhans from fasted hamsters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **104**, 207 – 211.

Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., & Chan, D. C. 2007. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *The Journal of Cell Biology*, **178**, 749 – 755.

Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., & Durbin, R. 1997. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*, **28**, 405 – 420.

Sonnhammer, E. L.L., von Heijne, G., & Krogh, A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. 175 – 182.

Stevenson, L. G., Strisovsky, K., Clemmer, K. M., Bhatt, S., Freeman, M., & Rather, P. N. 2007. Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase. *PNAS*, **104**, 1003 – 1008.

Strisovski, K., Sharpe, H. J., & Freeman, M. 2009. Sequence-specific intramembrane proteolysis: Identification of a recognition motif in rhomboid substrates. *Mol. Cell*, **36**, 1048 – 1059.

Sturtevant, M. A., Roark, M., & Bier, E. 1993. The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway. *Genes Dev.*, **7**, 961 – 973.

Swanston-Flatt, S. K., Carlsson, L., & Gylfe, E. 1980. Actin filament formation in pankreatic β-cells during glucose stimulation of insulin secretion. *FEBS letters*, **117**, 299 – 302.

Sweigard, J. A., Carroll, A. M., Farrall, L., Chumley, F. G., & Valent, B. 1998. *Magnaporthe grisea* pathogenicity genes obtained through insertional mutagenesis. *MPMI*, **11**, 404 – 412.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, **24**, 1596 – 1599.

Tanaka, A., Shiotani, H., Yamamoto, M., & Tsuge, T. 1999. Insertional mutagenesis and cloning of the genes required for biosynthesis of the host-specific AK-toxin in the japanese pear pathotype pf *Alternaria alternata*. *MPMI*, **12**, 691 – 702.

Thaler, C., Koushik, S. V., & Vogel, S. S. 2005. Quantitative multiphoton spectral imaging and its use for measuring resonance energy transfer. *Biophys J.*, **89**, 2736 – 2749.

Thastrup, O., Tullin, S., Poulsen, L. K., & Petersen, S. 1995. *Fluorescent proteins*. United States Patent US 006,172,188, 22.09.1995.

Thön, M., Abdallah, Q. A., Hortschansky, P., Scharf, D. H., Eisendle, M., Haas, H., & Brakhage, A. A. 2010. The CCAAT-binding complex coordinates the oxidative stress response in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 1098 – 1113.

Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M. A., & Arst, Jr. H. N. 1995. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- amd alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.*, **14**, 779 – 790.

Tomley, F. M., & Soldati, D. S. 2001. Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.*, **17**, 81 – 88.

Tripos, International. *SYBYL 8.0*. 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA.

Tsruya, R., Schlesinger, A., Reich, A., Gabay, L., Sapir, A., & Shilo, B. Z. 2002. Intracellular trafficking by Star regulates cleavage of the *Drosophila* EGF receptor ligand Spitz. *Genes Dev.*, **16**, 222 – 234.

Urban, S. 2006. Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions. *Genes Dev.*, **20**, 3054 – 3068.

Urban, S., & Freeman, M. 2003. Substrate specificity of rhomboid intramembrane proteases is governed by helix-breaking residues in the substrate transmembrane domain. *Molecular Cell*, **11**, 1425 – 1434.

Urban, S., & Wolfe, M. S. 2005. Reconstitution of intramembrane proteolysis *in vitro* reveals that pure rhomboid is sufficient for catalysis and specificity. *PNAS*, **102**, 1883 – 1888.

Urban, S., Lee, J. R., & Freeman, M. 2001. *Drosophila* Rhomboid-1 defines a family of putative intramembrane serine proteases. *Cell*, **107**, 173 – 182.

Urban, S., Schlieper, D., & Freeman, M. 2002a. Conservation of intramembrane proteolytic activity and substrate specificity in prokaryotic and eukaryotic rhomboids. *Current Biology*, **12**, 1507 – 1512.

Urban, S., Lee, J. R., & Freeman, M. 2002b. A family of rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J.*, **21**, 4277 – 4286.

van't Slot, K. A. E., Gierlich, A., & Knogge, W. 2007. A single binding site mediates resistance- and disease-associated activity of the effector protein NIP1 from the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol.*, **144**, 1654–1666.

Vernet, T., Dignarda, D., & Thomasa, D. Y. 1987. A family of yeast expression vectors containing the phage f1 intergenic region1. *Gene*, **52**, 225 – 233.

Vienken, K., Scherer, M., & Fischer, R. 2005. The $Zn(II)_2Cys_6$ putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submersed culture. *Genetics*, **169**, 619 – 630.

Vogel, S. S., Thaler, C., & Koushik, S. V. 2006. Fanciful FRET. *Sci STKE.*, **2006**, re2.

Vogt, W. 1995. Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 93 – 105.

Walder, K., Kerr-Bayles, L., Civitarese, A., Jowett, J., Curran, J., Elliott, K., Trevaskis, J., Bishara, N., Zimmet, P., Mandarino, L., Ravussin, E., Blangero, J., Kissebah, A., & Collier, G. R. 2005. The mitochondrial rhomboid protease PSARL is a new candidate gene for type 2 diabetes. *Diabetologia*, **48**, 459 – 468.

Wang, X.-H., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M. W., Howden, M. E. H., Nicholson, G. M., Christie, M. J., & King, G. F. 2000. Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge. *Nature Struct. Biol.*, **7**, 505 – 513.

Wang, Y., & Casadevall, A. 1994. Susceptibility of melanized and nonmelanized *Cryptococcus neoformans* to nitrogen- and oxygen-derived oxidants. *Infect. Immun.*, **62**, 3004 – 3007.

Wang, Y., & Ha, Y. 2007. Open-cap conformation of intramembrane protease GlpG. *PNAS*, **104**, 2098 – 2102.

Wang, Y., Zhang, Y., & Ha, Y. 2006. Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease. *Nature*, **444**, 179 – 180.

Wasserman JD, Urban S, Freeman M. 2000. A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signaling. *Genes Dev.*, **14**, 1651 – 1663.

Wedemeyer, W. J., Welker, E., Narayan, M., & Scheraga, H. A. 2000. Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry*, **39**, 15429 – 15440.

Wei, M. C., zong, W. X., Cheng, E. H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., McGregor, G. R., Thompson, C. B., & Korsmeyer, S. J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, **292**, 727 – 730.

Weissbach, H., Etienne, F., Hoshi, T., Heinemann, S. H., Lowther, W. T., Matthews, B., John, G. St, Nathan, C., & Brot, N. 2002. Peptide methionine sulfoxide reductase: Structure, mechanism of action, and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.*, **397**, 172 – 178.

Westermann, B. 2003. Mitochondrial membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **1641**, 195 – 202.

Wevelsiep, L., Kogel, K. H., & Knogge, W. 1991. Purification and characterization of peptides from *Rhynchosporium secalis* inducing necrosis in barley. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **39**, 471 – 482.

Wevelsiep, L., Rüpping, E., & Knogge, W. 1993. Stimulation of barley plasmalemma peptides from the fungal pathogen H^+-ATPase by phytotoxic *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol*, **101**, 297 – 301.

Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M., & Nunnari, J. 2000. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *The Journal of Cell Biology*, **151**, 341 – 352.

Wong, E. D., Wagner, J. A., Scott, S. V., Okreglak, V., Holewinske, T. J., Cassidy-Stone, A., & Nunnari, J. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, **160**, 303 – 311.

Wu, Y., Shan, L., Yang, S., & Ma, A. 2008. Identification and antioxidant activity of melanin isolated from *Hypoxylon archeri*, a companion fungus of *Tremella fuciformis*. *J. Basic Microbiol.*, **48**, 217 – 221.

Wu, Z., Yan, N., Feng, L., oberstein, A., Yan, H., Baker, R. P., Gu, L., Jeffrey, P. D., Urban, S., & Shi, Y. 2006. Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a gating mechanism for substrate entry. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13**, 1084 – 1091.

Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R. T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M. H., & Newmeyer, D. D. 2008. Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell.*, **31**, 557 – 569.

Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., & Martinez, E. 2007. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*, **389**, 52 – 65.

Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. 2006. Prediction of protein subcellular localizatio. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, **64**, 643 – 65.

Yuill, S. B. 2008. *Tagging pathogenicity genes in the interaction of barley and the fungal pathogen, Rhynchosporium secalis.* University of Adelaide. Dissertation.

Zaffarano, P. L., McDonald, B. A., Zala, M., & Linde, C. C. 2006. Global hierarchical gene diversity analysis suggests the fertile crescent is not the center of origin of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology*, **96**, 941 – 950.

Zaffarano, P. L., McDonald, B. A., & Linde, C. C. 2008. Rapid speciation following recent host shifts in the plant pathogenic fungus *Rhynchosporium*. *Evolution*, **62**, 1418 – 1436.

Zaffarano, P. L., McDonald, B. A., & Linde, C. C. 2010. The two new species of *Rhynchosporium*. *Mycologia*, **103**, DOI: 10.3852/10–119.

Zhdanova, N. M., Zakharenko, V. O., Vasylevs'ka, A. I., Shkol'nyi, O. T., Nakonechna, L. T., & Artyshkova, L. V. 1994. Peculiarities of soil mycobiota composition in Chernobyl NPP. *Ukr. Bot. Zh.*, **51**, 134 – 143.

Zhou, X. W., Blackman, M. J., Howell, S. A., & Carruthers, V. B. 2004. Proteomic Analysis of Cleavage Events Reveals a Dynamic Two-step Mechanism for Proteolysis of a Key Parasite Adhesive Complex. *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 565 – 576.

Zhu, J., & Schiestl, R. H. 1996. Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1805 – 1812.

Zink, C. 1990. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.* De Gruyter.

Zohary, D., & Zopf, M. 2001. *Domestication of plants in the old world: the origin and sread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley.* Oxford: Oxford University Press.

Z Anhang

Z.1 Oligonukleotide

Nr.	Name	Sequenz
6	Rh6	cactgggtagtcttagagct
9	Rho7	tcgatagtacctccctttct
10	Rho8	gagcacctcgtctcattacc
12	Rho10	gccgtcataaaacgatgaac
13	Rho11	atctatcggcgcaagcacgg
14	Rho12	tgtggcgtactgtaagtc
15	Rho13	aggccgtaccagcaccactg
16	Rho14	cgctttgagaaagcatctag
17	Rho15	cgtgtggtcttcagctaggt
18	Rho16	ccaattgtgtttgcgattcac
23	RhoORF1	ttcgagccggctcgatggcg
24	RhoORF1A	ttcgagccggctcgatggc
25	RhoORF2	cttggatgctgtatgatggg
26	RhoORF2n	tgggcctttcattgccgtcg
27	RhoORF3	tgccaaaacttgacttgagc
28	RhoORF3n	cctcctgcgacgacggatcc
30	RhoCDS1as	tccaaagactcctacacaag
36	RhoC179Ns	cccatcatattgcatccaagatgc
37	RhoC179Nas	gcatcttggatgcaatatgatggg
38	RhoC179As	cccatcatagcgcatccaagatgc
39	RhoC179Aas	gcatcttggatgcgctatgatggg
40	RhoC178As	atcatacaggctccaagat
41	RhoC178Aas	catcttggagcctgtatgat
43	RhoNheI	gctagcatgtctaggccgcagtgc
44	RhoXbaI	cctctagaaccagggaaccatggccgag
45	RhoHisXbaI	tctagattaatgatgatgatgatgatggaaagtttgaaaccatcgag
46	RhoXhoI	gtcgctcgagacaacaagatcgttatg
47	GFPRhogpdA2s	tctagaagcatgccattaacctag
48	GFPRhogpdA2as	cccgggggtgatgtctgctcaagc
49	GFPRhocDNAs	cccgggaacaaccgcaagatcgttat
50	GFPRhocDNAas	gctagccaaagtttgaaaccatcgag
51	GFPRhoGFPs	gctagcatggtgagcaagggcgagga

Nr.	Name	Sequenz
52	GFPRhoGFPas	ccgcgggctgcttggacaaatgaaca
53	GFPRhobles	ccgcggagagagaagggctgagtaat
55	pAN7-1I	tcaatacactacatggcg
56	pAN7-1II	ccactcgacctgcaggca
57	pAN7-1III	ggaagagtatgagtattc
58	pAN7-1IV	gctgagataggtgcctca
59	pAN7-1V	gcctttgagtgagctgat
60	pAN7-1VI	attctcaagtatctcgag
64	5'-cRhoEcoRI	gaattcacaaccgcaagatcgttatg
65	3'-cRhoNotI	gcggccgctagtattacagaaagtactat
66	BLM-Opa1s	cattgggtaccccatatcgccttccgtgctacggatcgtatttttgccgctatttctc
67	BLM-Opa1as	cgattttactagttttgcgc
69	HPH6	acatgcagctcccggagacgg
70	HPH9	agaatcatccttattcgttg
71	HphCDS1	cgtcaaccaagctctgatag
78	GDPRT2s	tctgctaaggattggcgcgg
79	GDPRT2as	gcttgccgttgagctctggg
80	YACT1RTs	ttgggtttggaatctgccgg
81	YACT1RTas	cggcaatacctgggaacatg
91	bla-Sub1	atgggggatcatgtaatccg
92	Mbp-Sub2	cagtttatccggatgctcaac
99	RLP-pET-XbaI	tctagaatgtccaacaatatcatgaa
100	RLP-pET-XhoI	ggccgcggccgcttagaaagtttgaactcgag
101	RLP-pET-NdeI	gatccatatgtccaacaatatcatgaa
102	RLP-pET28-NotI	ggccgcggccgcttagaaagtttgaaaccatc
103	Fusion-Primer9	atcgtcttctgcaatcggtactgcagatcgtgttgttaac
104	Fusion-Primer10	aacgcgagaggtagaaaagtctcggccatgaagaacttagagg
105	HO05J24R	tagtgatatcgctcatgccgg
106	HO05J24F	gtgcgctgtggtcaagatgtt
107	Aktin RT 2 s	gagatgatgcgccaagggct
108	Aktin RT 2 as	ttggactgcgcctcatcacc
109	Rho ORF 4 RT	ggcgttccagaagctcctcg
110	Pfp RT s	gatccccaggtgaagcccga
111	Pfp RT as	gattcgcttccccagacgcc
112	Ubi47s	ggggagggagacgggcgt
113	Ubi47as	gcagctcgaggatggccg

Nr.	Name	Sequenz
114	Act8376s	acgcggcctggttgcgag
115	Act8376as	cgccgcctacggattcct
116	NIP2RTs	cacaggaacgcaaacgcggt
117	NIP2RTas	caggggctcccgaagcctgg
118	NIP1RTs	cctgcttggttccaggggat
119	NIP1RTas	gtatcccgtcgggcattgga
120	Fusion-Primer 5s	taccgattgcagaagacgatggtgactctttctggcatgc
121	Fusion-Primer 6as	cttttctacctctcgcgttatctcgtctcccgaaaatgaa
122	NIP3RTs	caactacagcccaagccgca
123	NIP3RTas	gtgcaggtacgggcatgcac
124	pSS2-ble 4	cagtcctgctcctcggccac
125	ble2	ctacatgtaagttgggtaacgccagggt

Z.2 Schematische Darstellung von Vektoren und Sequenzen

Z.2.1 pAN7-1

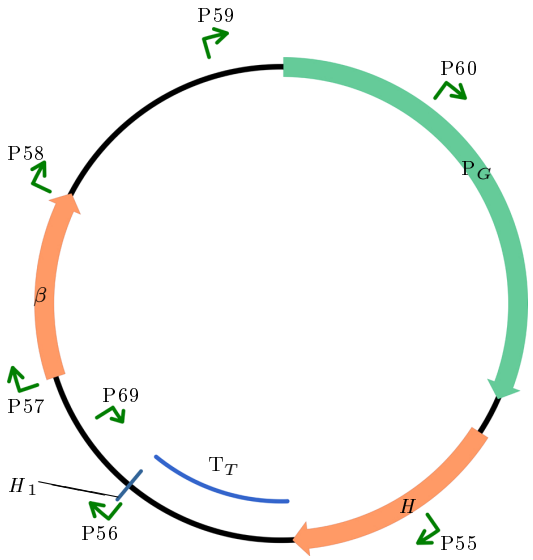


Abbildung 67: Abbildung 67: pAN7-1

P_G - P_{AnGPD}, H - Hygromyzin-B-phosphotransferase, T_T - T_{AnTRPC}, β - β-Laktamase, P - Primer, H_1 - *Hin* dIII

Z.2.2 pGW88

Von dem Plasmid pGW88 (**?**) stand keine Sequenz zur Verfügung. Es enthält neben einer Resistenzkassette gegen Spectinomyzin ein Fusionskonstrukt bestehend aus der β-Laktamase, der zweiten Transmembrandomäne der Laktosepermease und dem Maltose-bindenden Protein. Dessen Produkt wurde als künstliches Substrat in den Aktivitätsuntersuchungen in *E. coli* genutzt (3.9).

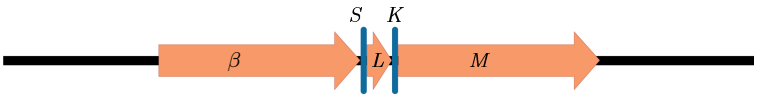


Abbildung 68: Abbildung 68: pGW88

β - β-Laktamase, L - 2. Transmembrandomäne des $LACZ$-Gens, M - Gen des Maltose-bindenden Proteins, K - *Kpn* I, S - *Spe* I

Z.3 Konstruktion spezifischer Vektoren

Z.3.1 *RLP1*$_c$-pCR2.1

Dieser Vektor ist der Ausgangsvektor vieler Konstrukte.
Das genutzte Ausgangsmaterial war Myzel von UK7 (14 Tage in FRIES No.3 gewachsen). Von diesem wurde RNA isoliert und diese konnte nach DNase-Behandlung in cDNA mit dem SMART™RACE cDNA Amplification Kit wie in 3.3 beschrieben umgeschrieben werden. Mit den Primer 46 und 44 konnte die cDNA *RLP1*-Gens amplifiziert und anschließend nach Herstellerangaben von Invitrogen in pCR2.1 kloniert werden. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung als korrekt bestätigt. Die Primer generierten für weitere Klonierungsarbeiten am 5'-Ende eine *Xho* I- und am 3'-Ende eine *Xba* I-Restriktionschnittstelle. Das Plasmid *RLP1*$_c$-pCR2.1 wurde mittels Restriktion vor jeder weiteren Verwendung erneut überprüft. Das Resultat der Restriktion ist neben der Vektorkarte abgebildet (Abb. 69). Das Restriktionsenzym *Hin* dIII produziert zwei Fragmente der Länge 3931 bp und 1013 bp. Die Restriktion mit *Kpn* I ergibt zwei Fragmente der Länge 4301 bp und 643 bp. Mit *Nae* I werden Fragmente mit der Länge 2988 bp, 1275 bp, 476 bp und 205 bp generiert. Durch *Nco* I entstehen Fragmente der Länge 2581 bp und 2363 bp mit *RLP1*$_c$-pCR2.1 als Ausgangsplasmid.

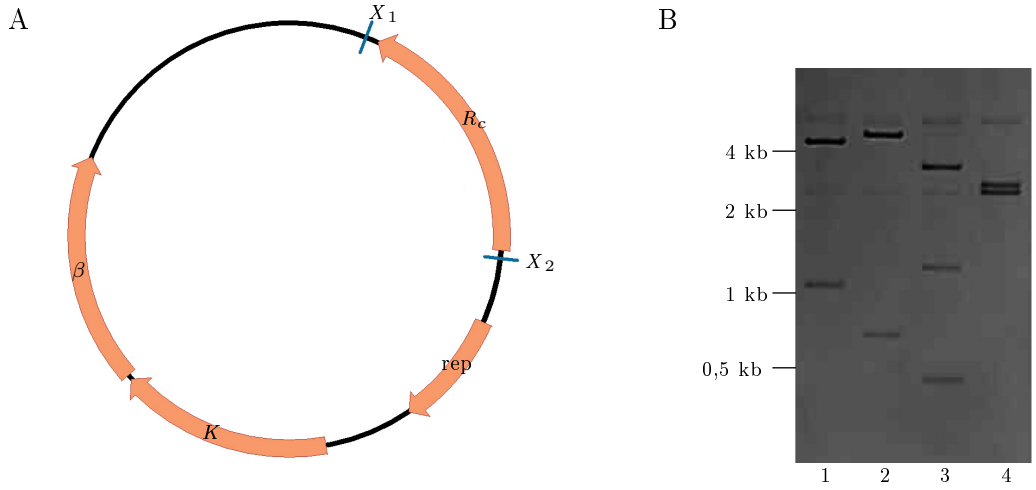


Abbildung 69: Abbildung 69: *RLP1*$_c$-pCR2.1

A - Schematische Darstellung des Plasmids *RLP1*$_c$-pCR2.1: R_c - cDNA der *RLP1*, X_1 - *Xba* I, X_2 - *Xho* I, β - β-Laktamase, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, rep - Replikationsursprung
B - Behandlung mit den Restriktionsenzymen *Hin* dIII (1), *Kpn* I (2), *Nae* I (3) und *Nco* I (4).

Z.3.2 cRc*RLP1*-pBAT

Das Plasmid cRc*RLP1*-pBAT, mit dem die RLP1 *in vitro* für Importstudien translatiert wurde, wurde, wie in Darstellung 70 abgebildet, generiert. Die kodierende Sequenz der

RLP1 wurde mit den Primer 64 und 65 amplifiziert, in pCR2.1 zur Sequenzüberprüfung zwischenkloniert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RI und *Not* I in das Plasmid pBAT (Annweiler *et al.*, 1991) ligiert. Der entstandene Vektor cRc*RLP1*-pBAT wurde per Sequenzierung der Ligationsstellen überprüft (Primer 24 und 30).

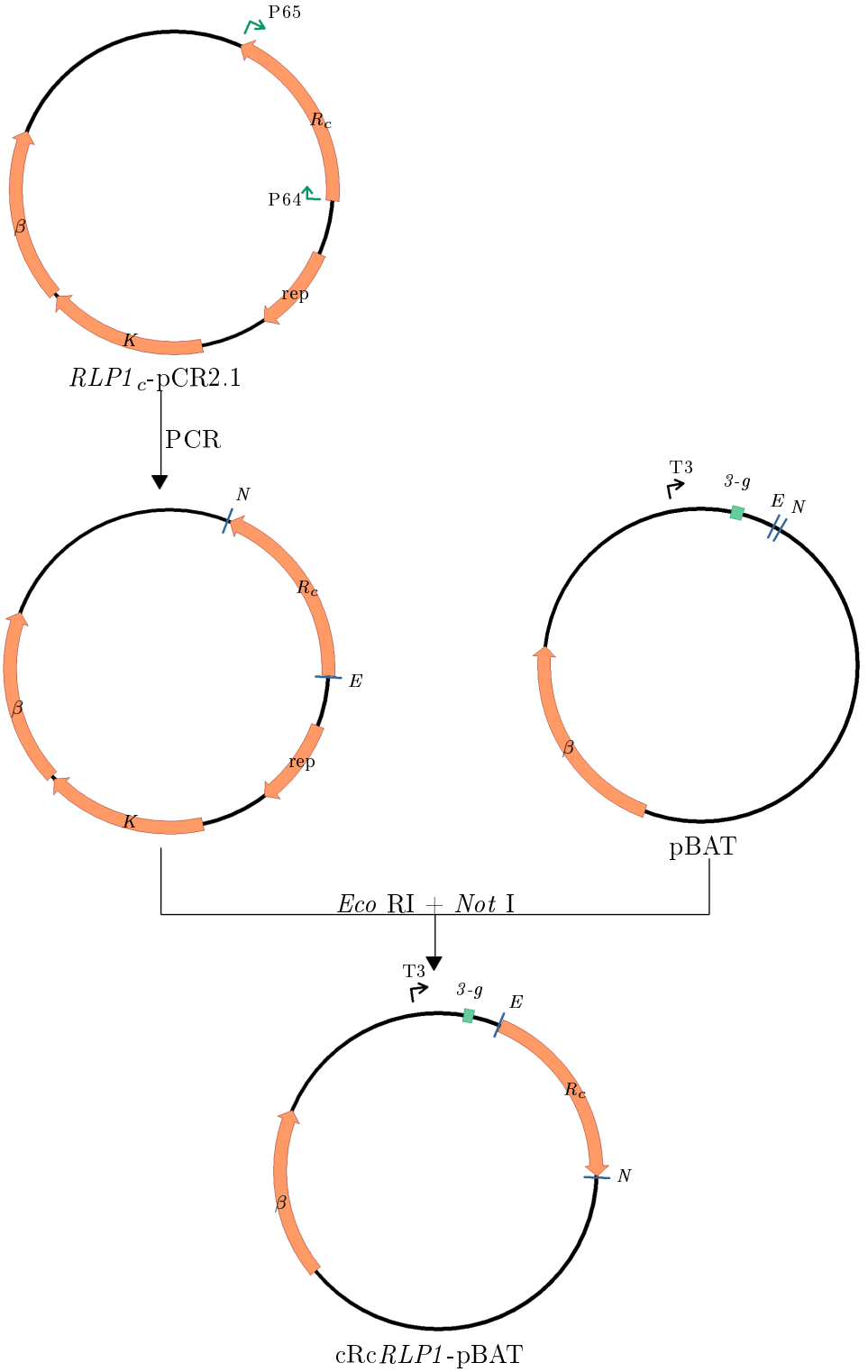


Abbildung 70: Abbildung 70: Schematische Darstellung der Konstruktion von cRc*RLP1*-pBAT

R_c - cDNA des *RLP1*-Gens, β - β-Laktamase, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, rep - Replikationsursprung, T3 - T3-Promotor, *3-g* - 3-*globin leader*-Sequenz vom Hasen, P - Primer, *E* - *Eco* RI, *N* - *Not* I

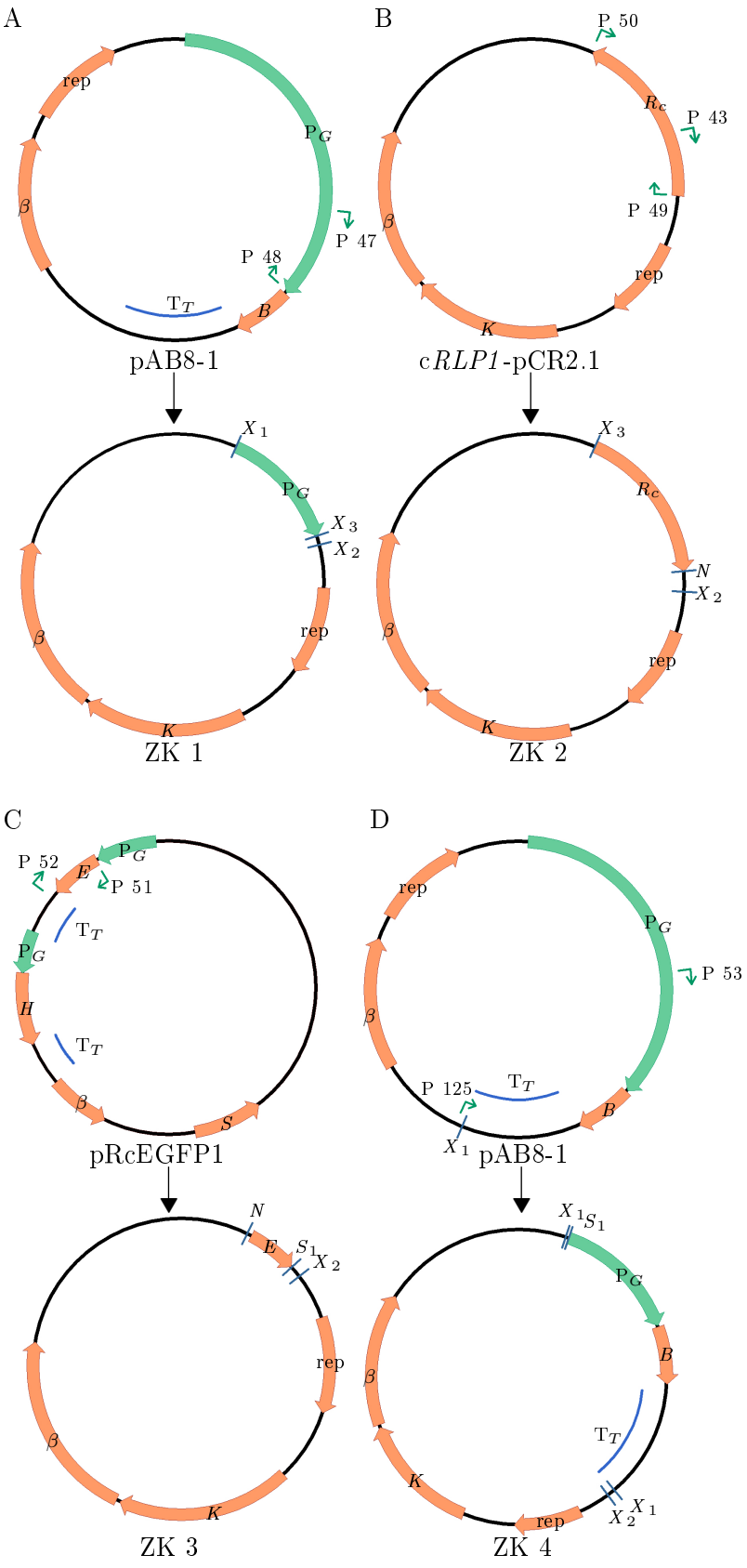
Z.3.3 Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP2000 und Rc*RLP1*$_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200

Die Plasmide Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 und Rc*RLP1*$_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200 wurden für Lokalisationsstudien generiert. Dies ist schematisch in Abb. 71 dargestellt. Die Konstrukte bestehen aus jeweils vier Teilen, die nacheinander zusammengefügt wurden. Der Unterschied der beiden liegt lediglich in der Sequenz der *RLP1*, welche bei Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 vollständig und bei Rc*RLP1*$_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200 durch Primer 43 verkürzt vorliegt.
Zunächst wurden sämtliche Teilsequenzen mit PCR amplifiziert und in pCR2.1 nach Herstellerangaben ligiert. Über die Primer wurden bei den Teilsequenzen die Erkennungsstellen der genutzten Restriktionsendonukleasen eingeführt:

Teilsequenz	5'-Restriktionsstelle	5'-Primer	3'-Restriktionsstelle	3'-Primer
Promotor P$_{AnGPD}$	*Xba* I	47	*Xma* I	48
RLP1	*Xma* I	49	*Nhe* I	50
RLP1$_{1-231}$	*Xma* I	49	*Nhe* I	43
EGFP	*Nhe* I	51	*Sac* II	52
Phleomyzin-Resistenzkassette	*Sac* II	53	*Xba* I (endogen)	125

Nach der Sequenzierung der einzelnen Teilsequenzen wurden diese eine nach der anderen zusammengefügt. Dies geschah über die entsprechende Restriktionsendonuklaese, deren Erkennungssequenz zwischen den Teilen eingefügt wurde, und dem Restriktionsenzym *Xho* I, dessen Erkennungsstelle durch das Palsmid pCR2.1 zur Verfügung stand. Bei der Klonierung der Fusion von *RLP1* bzw. *RLP1*$_{1-231}$ und EGFP wurde auf einen durchgehenden offenen Leserahmen durch Sequenzierung des Überganges geachtet. Zum Schluss wurde das Fusionskonstrukt in den binären Vektor pPZP200 mit der Restriktionsendonuklease *Xba* I kloniert. Die korrekte Konstruktion der Plasmide Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 und Rc*RLP1*$_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200 wurde mittels Restriktion überprüft. Das Resultat der Restriktion ist Abb. 72 dargestellt. Die entstandenen Fragmente stimmen größenmäßig mit den erwarteten überein:

Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200			
Age I	7308 bp	3829 bp	
Hin dIII	7376 bp	3761 bp	
Sal I	6980 bp	2638 bp	1519 bp
Sca I	6999 bp	2638 bp	1500 bp
Rc*RLP1*$_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200			
Age I	6585 bp	3829 bp	
Hin dIII	7376 bp	3038 bp	
Sal I	6980 bp	1915 bp	1519 bp
Sca I	6999 bp	1915 bp	1500 bp


A
rep
P G
β
P 47
P 48
T T
B
pAB8-1
X 1
P G
X 3
X 2
β
rep
K
ZK 1
B
P 50
Rc
P 43
P 49
β
rep
K
cRLP1-pCR2.1
X 3
Rc
N
X 2
β
rep
K
ZK 2
C
P 52
P G
E
P 51
T T
P G
H
T T
β
S
pRcEGFP1
N
E
S 1
X 2
rep
β
K
ZK 3
D
rep
P G
P 53
β
P 125
T T
B
X 1
pAB8-1
X 1
S 1
P G
B
β
T T
K
rep
X 2
X 1
ZK 4

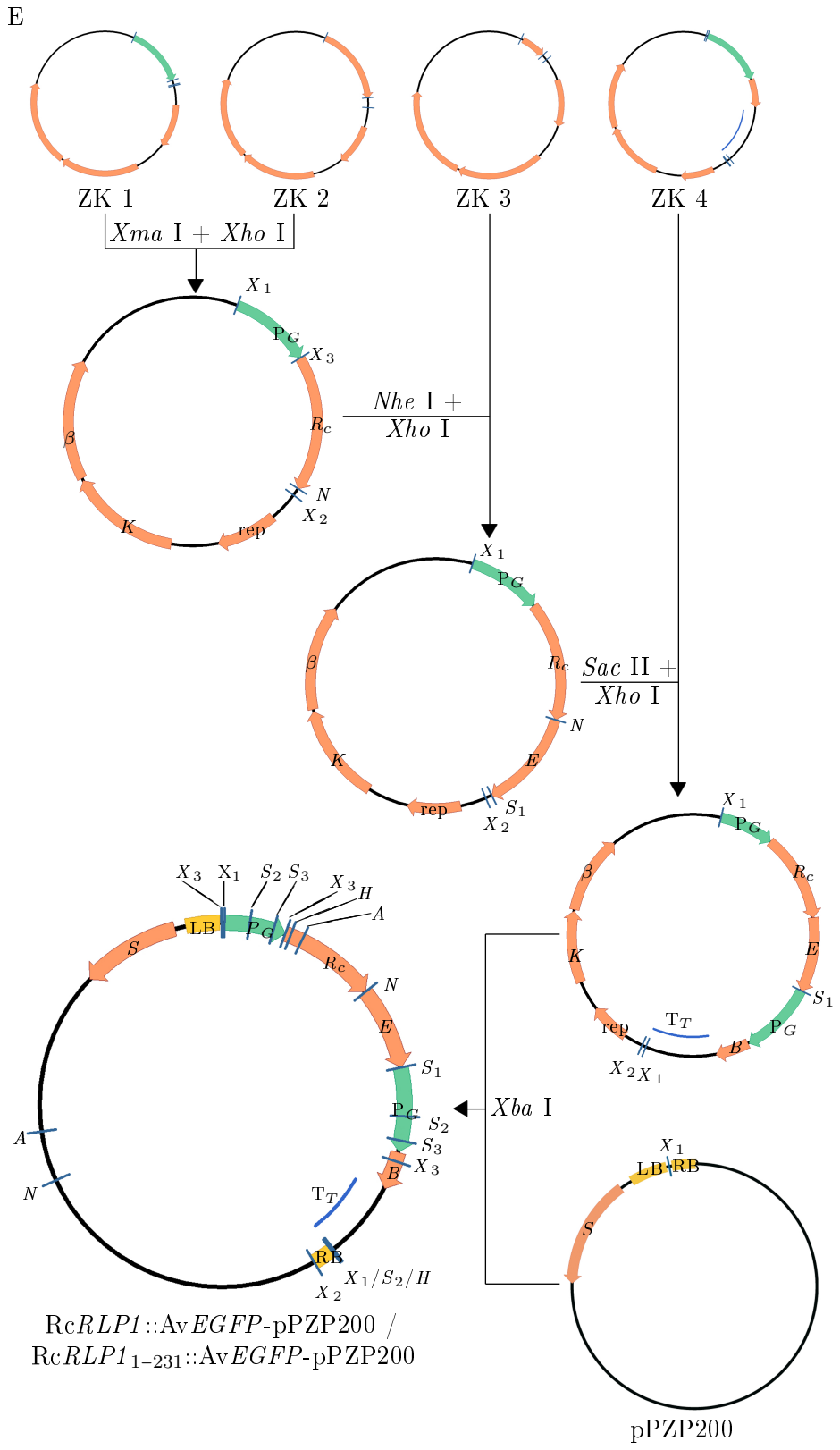

E
ZK 1
ZK 2
ZK 3
ZK 4
Xma I + Xho I
Nhe I + Xho I
Sac II + Xho I
Xba I
LB
RB
rep
RcRLP1::AvEGFP-pPZP200 /
RcRLP1 1–231::AvEGFP-pPZP200
pPZP200

Abbildung 71: Abbildung 71: Schematische Darstellung der Konstruktion von Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 und Rc$RLP1_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200

Die Teilabbildungen A-D zeigen die Generierung der Zwischenkonstrukte 1-4. Die PCR-Fragmente, die durch die Nutzung der dargestellten Primer-Paare entstanden, wurden in pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert. Bei dem Zwischenkonstrukt 2 (B) wurde Primer 50 für die Generierung des Plasmids Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 verwendet. Primer 43 wurde zur Herstellung des Plasmids Rc$RLP1_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200 genutzt. In Teilabbildung E ist die Klonierungsstrategie zu Fertigstellung der Plasmid aus den Zwischenkonstrukten exemplarisch anhand des Plasmids Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 dargestellt. Rc$RLP1_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200 wurde gleichermaßen generiert.
P_G - $P_{An}GPD$, R_c - cDNA-Sequenz von *RLP1*, *E* - Av*EGFP*, *B* - Phleomyzin-Resistenzgen, T_T - $T_{An}TRPC$, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, β - β-Laktamase, *S* - Spectinomyzin-Resistenzkassette, LB - linke *border*-Sequenz, RB - rechte *border*-Sequenz, rep - Replikationsursprung, *A* - *Age* I, *H* - *Hin* dIII, *N* - *Nhe* I, S_1 - *Sac* II, S_2 - *Sal* I, S_3 - *Sca* I, X_1 - *Xba* I, X_2 - *Xho* I, X_3 - *Xma* I

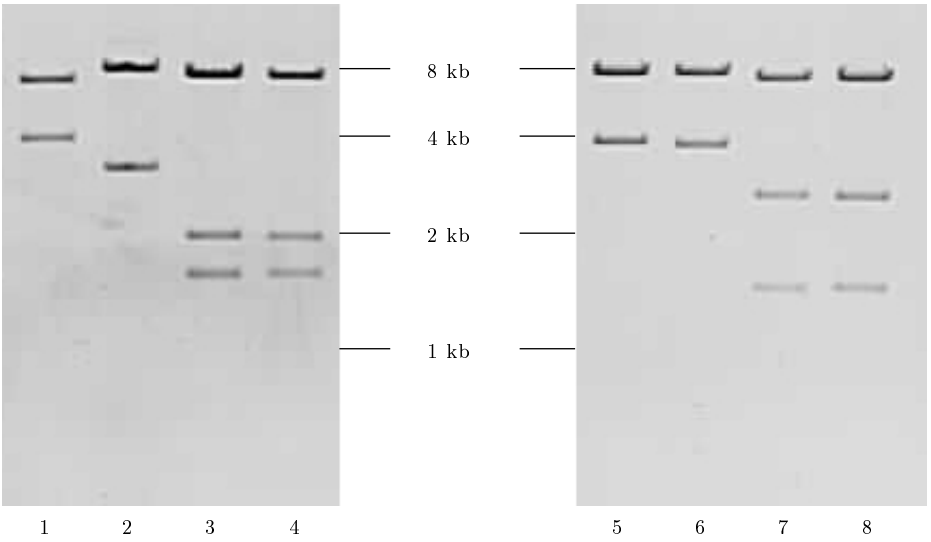


Abbildung 72: Abbildung 72: Restriktionsanalyse von Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200 und Rc$RLP1_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200

1 - 4 - Rc*RLP1*::Av*EGFP*-pPZP200, 5 - 6 - Rc$RLP1_{1-231}$::Av*EGFP*-pPZP200, 1 und 5 - *Age* I, 2 und 6 - *Hin* dIII, 3 und 7 - *Sal* I, 4 und 8 - *Sca* I

Z.3.4 Rc*RLP1*-pBBR1MCS5 und Derivate

Die Plasmide Rc*RLP1*-pBBR1MCS5, Rc*RLP1* C179N-pBBR1MCS5, Rc*RLP1* C179A- pBBR1MCS5 und Rc*RLP1* C178A-pBBR1MCS5 waren für Studien der proteolytischen Aktivität in *E. coli* notwendig. Die Klonierungsstrategie ist schematisch in Abb. 73 dargestellt. Die Plasmide unterscheiden sich einzig in einem Triplett in der kodierenden Sequenz der *RLP1*. Durch die Mutation sollte ein Aminosäureaustausch durchgeführt werden. Diese Mutationen wurden mit Hilfe von *fusion*-PCR eingeführt. Dafür wurden zunächst zwei PCR-Fragmente generiert, bei denen der überlappende Primer an dem zu mutierenden Triplett bindet und das Kodon der Mutation bereits trägt. Diese waren bei dem Austausch des Cystein 179 gegen Asparagin Primer 36 und 37, beim Austausch desselben gegen Alanin Primer 38 und 39, und beim Austausch von Cystein 178 gegen Alanin Primer 40 und 41. Die äußeren Primer entsprachen dabei immer Primer 45 und 46. Die Mutation-tragende Sequenz der *RLP1* wurde in einer finalen *fusion*-PCR amplifiziert. Bei dieser wurden nur die beiden äußeren Primer eingesetzt (Primer 45 und 46) sowie die beiden Fragmente der eben beschriebenen einzelnen PCR. Nach der Ligation in pCR2.1 wurden die kodierenden Sequenzen mittels Sequenzierung überprüft. Mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Xho* I, deren Erkennungssequenzen mit dem Primerpaar 45 und 46 eingefügt wurden, konnte die *RLP1* in den Expressionsvektor pBBR1MCS5 kloniert werden. Für die Expression enthält der Endvektor im 3'-Bereich der *RLP1* den Promotor des *LACZ*-Gens. (Dieser ist der Übersicht halber in die Plasmidkarte nicht eingezeichnet.)
Die korrekte Konstruktion der Plasmide Rc*RLP1*-pBBR1MCS5, Rc*RLP1* C179N- pBBR1MCS5, Rc*RLP1* C179A-pBBR1MCS5 und Rc*RLP1* C178A-pBBR1MCS5 wurde mittels Sequenzierung mit den T7-Standardprimer.

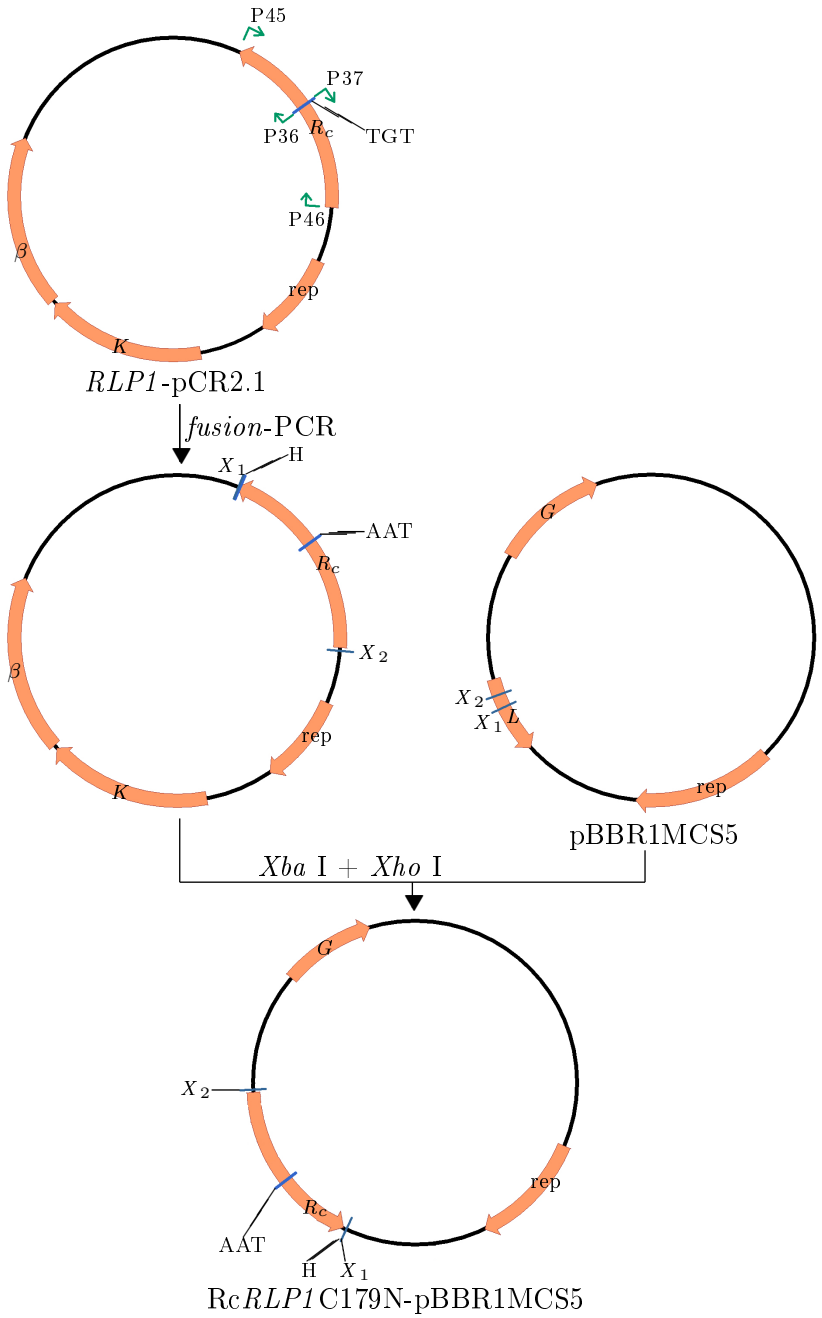


Abbildung 73: Abbildung 73: Schematische Darstellung der Konstruktion des Rc*RLP1*C179N-pBBR1MCS5

Das Plasmid Rc*RLP1*C179N-pBBR1MCS5 entstand durch die Behandlung der dargestellten Vektoren mit den markierten Restritkionsenzymen und anschließender Ligation der entstandenen spezifischen Fragmente. Die Mutation ist durch *fusion*-PCR mit den markierten Primer eingeführt worden (siehe Text). Die Position des mutierten Tripletts ist blau dargestellt. Durch Primer 45 wurde zusätzlich ein Tag bestehend aus sechs Histidin-Codons angefügt.
R_c - cDNA-Sequenz von *RLP1*, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, β - β-Laktamase, *G* - Gentamyzin-3-acetyltransferase, rep - Replikationsursprung, P - Primer, H - His-Tag, X_1 - *Xba* I, X_2 - *Xho* I

Z.3.5 P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181 und Derivate

Für die Generierung der Konstrukte zur Komplementation von *S. cerevisiae* Δ*PCP1* standen zwei Plasmide zur Verfügung, von denen die Sequenz nicht genau bekannt war. Der Vektor pVT100L (**?**) enthält einen Polylinker zwischen dem Promotor und der Terminationssequenz der Alkoholdehydrogenase (ADH). Die *RLP1* wurde mit den Primer 46 und 44 amplifiziert, in pCR2.1 zur Sequenzüberprüfung zwischenkloniert und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Xho* I in das Plasmid pVT100L zwischen den Promotor und die Terminationssequenz der ADH ligiert. Nach erfolgreicher Amplifikation des entstandenen Plasmides wurde das Fragment mit dem Restriktionsenzym *Sph* I vom restlichen Plasmid separiert und in den Vektor YEplac181 (**?**) ligiert (P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181). Dieser enthält im Gegensatz zu pVT100L eine funktionierende Leuzin-Selektionskassette. Da von dem generierten Vektor keine komplette Sequenz vorhanden ist, wurde die Klonierung durch Sequenzierung der Restriktionserkennungsstellen ausgehend von der *RLP1*-Sequenz überprüft (Primer 24, 30, 44 und 46).
Die Mutationen im Cystein 178 und 179 wurden durch die Primer 36 und 37, 38 und 39 bzw. 40 und 41 wie bei der Konstruktion in Abschnitt Z.3.4 eingefügt. Anschließend wurde erneut die mutierte Sequenz per *fusion*-PCR mit den Primer 46 und 44 amplifiziert und in pCR2.1 kloniert. Die Plasmide P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$C179N-T_{ADH}-YEplac181, P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$C179A-T_{ADH}-YEplac181 und P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$C178A-T_{ADH}-YEplac181 entstanden durch die gleiche Klonierungsstrategie wie P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181 und wurden durch Sequenzierung mit den gleichen Primer überprüft.

Z.3.6 *OPA1*-pGW88

Wie in Abschnitt Z.2.2 beschrieben stand für das Plasmid pGW88 keine vollständige Sequenz zur Verfügung. Die einzigen Information über dieses Plasmid bestanden in der Sequenz des Fusionskonstrukts β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein (siehe Abb. 75). Für die Modifizierung der Prozessierungsstelle wurde ein degenerierter Primer (Primer 66) genutzt, welche die Spaltungsstelle von Hs*OPA1* imitiert. Das mit dem Primer-Paar 66 und 67 entstandene Fragment wurde nach der Klonierung in pCR2.1 mit den Restriktionsendonukleasen *Kpn* I und *Spe* I so in pGW88 ligiert, dass die ursprüngliche Transmembrandomäne durch die modifizierte Sequenz ausgetauscht wird. Der entstandene Vektor *OPA1*-pGW88 wurde mit Primer 91 und 92 auf die vollständige Sequenz überprüft und anschließend wie in 3.12.3 beschrieben für die Aktivitätsanalysen eingesetzt. Durch die Immunodetektion des Fusionsproteins als Substrat konnte die erfolgreiche Modifizierung bestätigt werden.

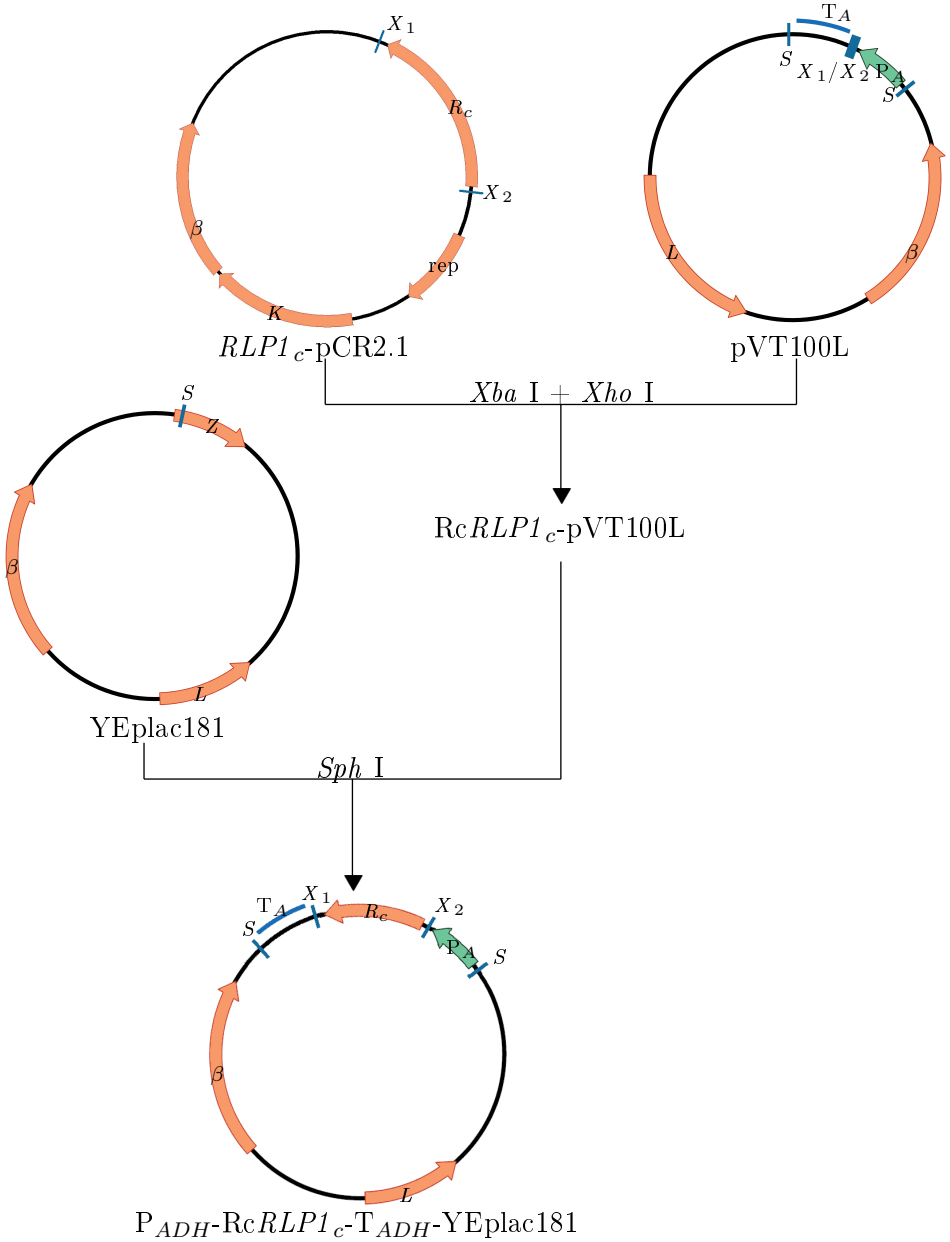


Abbildung 74: Abbildung 74: Schematische Darstellung der Konstruktion des P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181

Das Plasmid P_{ADH}-Rc*RLP1*$_c$-T_{ADH}-YEplac181 entstand durch die Behandlung der dargestellten Vektoren mit den markierten Restritkionsenzymen und anschließender Ligation der entstandenen spezifischen Fragmente. Von den Vektoren pVT100L und YEplac181 standen nur schematische Karten zur Verfügung, weshalb die dargestellten Bestandteile in keiner Relation zueinander stehen. Es sind dabei lediglich die Richtung und die Reihenfolge zu beachten.
P_A - P_{Sc}*ADH*, R_c - cDNA-Sequenz von *RLP1*, T_A - T_{Sc}*ADH*, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, β - β-Laktamase, *L* - Leuzin-Selektionsmarker, rep - Replikationsursprung, *S* - *Sph* I, X_1 - *Xba* I, X_2 - *Xho* I

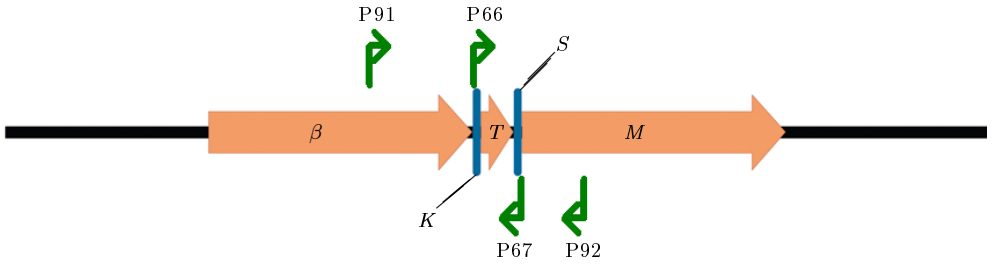
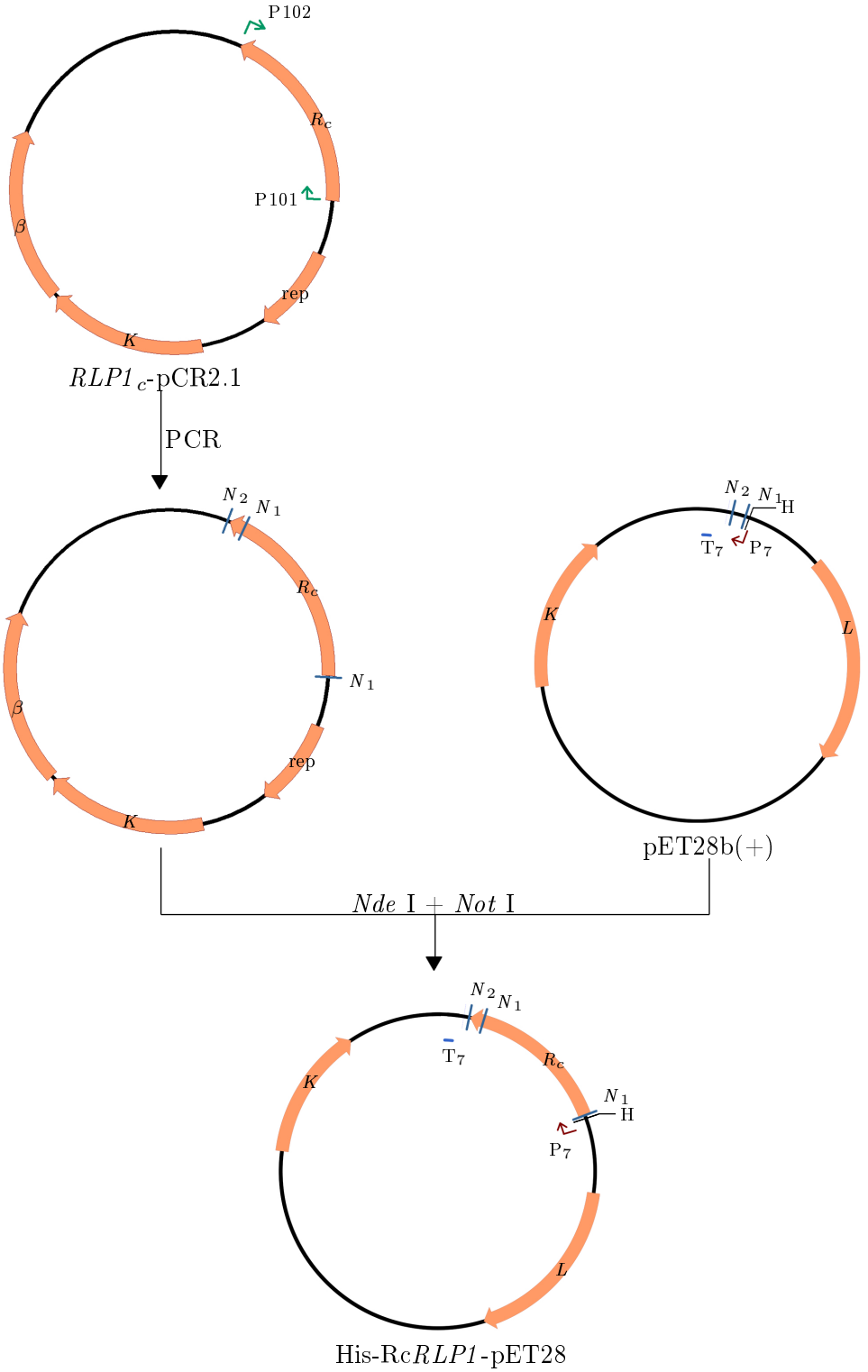


Abbildung 75: Abbildung 75: Schematische Darstellung eines Teils von pGW88

In dieser Abb. ist das Fusionskonstrukt der β-Laktamase::Laktosepermease$_{TMD}$::Maltosebindeprotein im Plasmid pGW88 dargestellt. Die Bindungsstellen der für die Modifizierung der Transmembrandomäne genutzten Primer sowie die Primer zur Überprüfung der Klonierung *via* Sequenzierung sind mit grünen Pfeilen markiert.
β - β-Laktamase, *T* - Transmembrandomäne 2 von Ec*LACY*, *M* - cDNA des Maltose-bindenden Proteins, P - Primer, *K* - *Kpn* I, *S* - *Spe* I

Z.3.7 Kristallisierungsvektoren

Zur Bestimmung der exakten Röntgenkristallstruktur muss die RLP1 in großer Menge gereinigt vorliegen. Dafür wurden zwei Plasmide generiert, welche zur Expression in *E. coli* benötigt werden.
Bei der heterologen Expression der bereits kristallografisch aufgeklärten *Ec*GlpG wurden N-terminale His-Tags verwendet (), also ein Anhang aus sechs bis acht Histidinen. Diese können zur Reinigung mittels Affinitätschromatografie (Nickel-NTA) verwendet werden. Einer der beiden generierten Plasmide kodiert für die RLP1 mit einem N-terminalen His-Tag. Die Klonierungsstrategie des His-Rc*RLP1*-pET28 ist in Abb. 76 dargestellt. Zur Amplifikation der *RLP1* wurden die Primer 101 und 102 genutzt. Durch diese wurden die für die Klonierung essentiellen Restriktionserkennungsstellen eingeführt. Nach der Ligation des Amplfikationsproduktes in pCR2.1 und Abklärung der Sequenz durch die Firma AGOWA wurde die *RLP1* mit den Restriktionsendonukleasen *Nde* I und *Not* I in den Vektor pET28b(+) ligiert. Wichtig war hierbei eine partielle Restriktion mit dem Enzym *Nde* I, da es eine zweite Erkennungssequenz in offenen Leserahmen der *RLP1* gibt. Mit den T7-Standard-Primer wurde die Fusion mit dem His-Tag durch Sequenzierung erfolgreich nachgewiesen.
Zusätzlich zur N-terminalen Verlängerung der RLP1 durch Histidine wurde ein zweites Plasmid generiert, welches die Sequenz für die RLP1 mit einem C-terminalen His-Tag enthält. Hierfür wurde die *RLP1* mit dem Primer-Paar 99 und 100 amplifiziert, welche eine *Xba* I- bzw. *Xho* I-Restriktionserkennungsstelle einfügen. Nach der Ligation in pCR2.1 wurde die Sequenz *via* Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde die *RLP1* mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen *Xba* I und *Xho* I in pET41b(+) ligiert. Durch die Sequenzierung mit den T7-Standard-Primer wurde erneut die korrekte Fusion mit dem Histidin-Anhang überprüft. Die Klonnierungsstrategie von Rc*RLP1*-His-pET41 ist in Abb. 77 dargestellt.



His-Rc*RLP1*-pET28

Abbildung 76: Abbildung 76: Schematische Darstellung der Konstruktion von His-Rc*RLP1*-pET28

R_c - cDNA der *RLP1*, β - β-Laktamase, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, rep - Replikationsursprung, *L* - *LACI*-Gen, P_7 - T7-Promotor, T_7 - T7-Terminator, H - His-Tag, P - Primer, N_1 - *Nde* I, N_2 - *Not* I

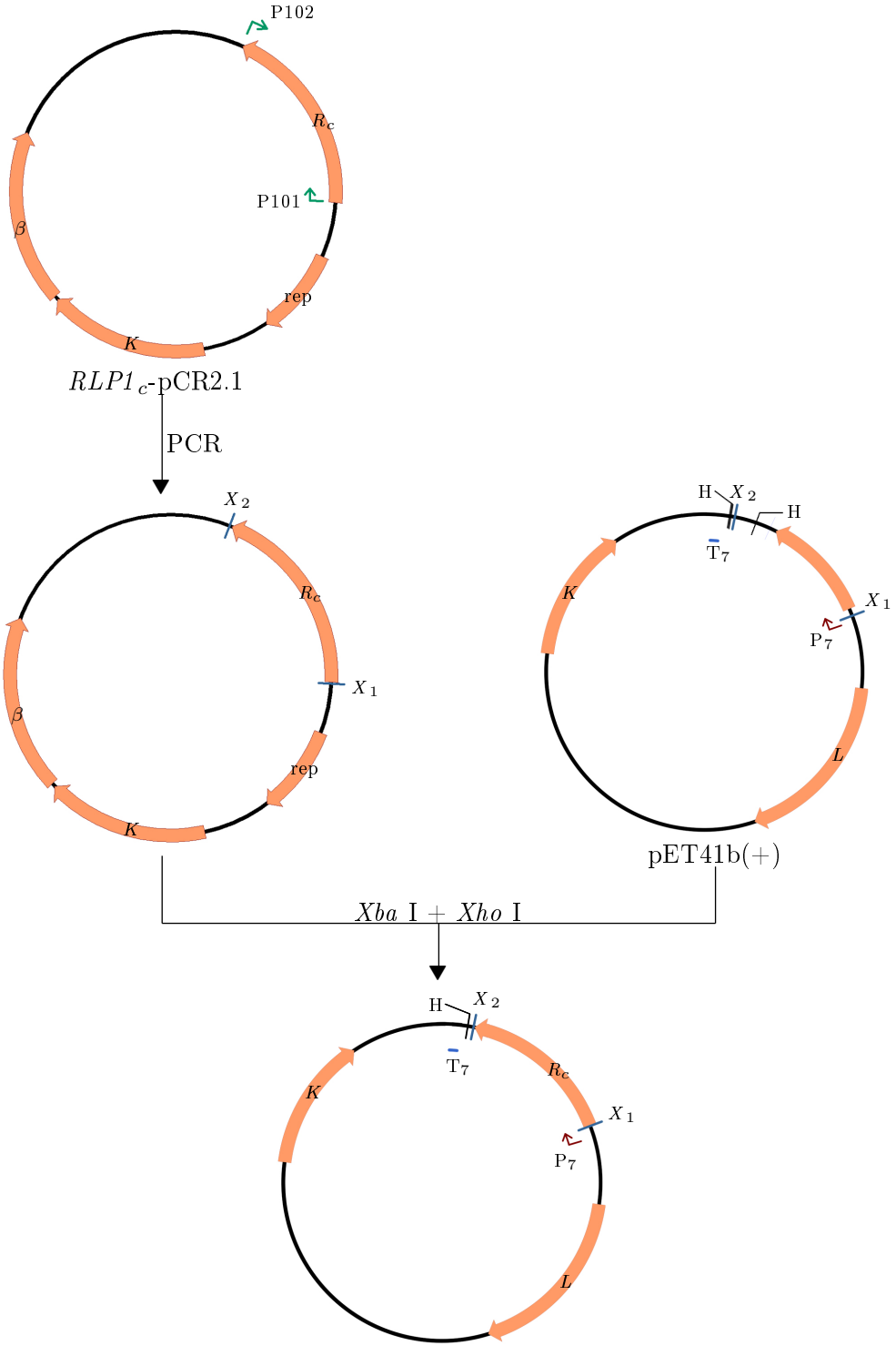


Abbildung 77: Abbildung 77: Schematische Darstellung der Konstruktion von Rc*RLP1*-His-pET41

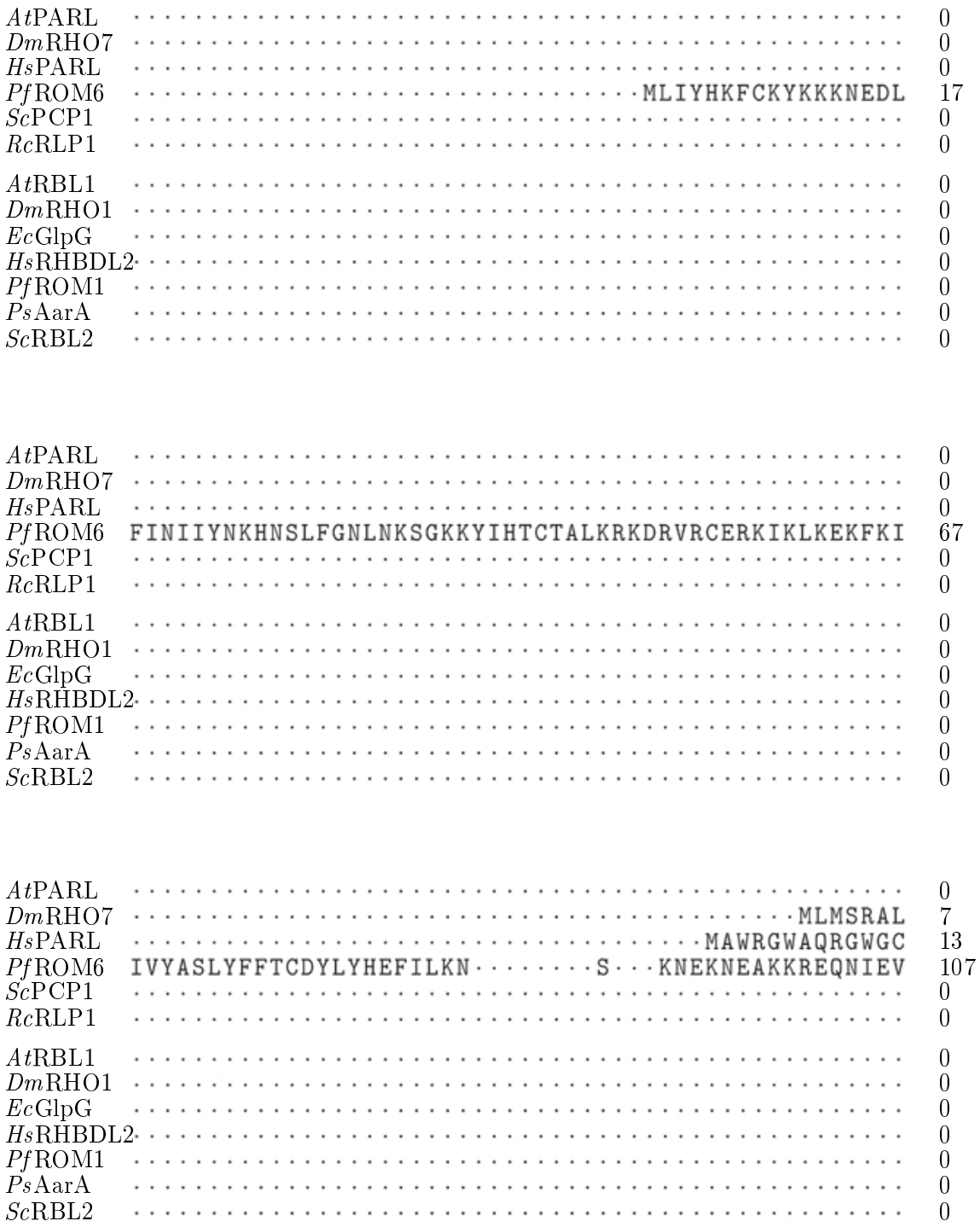
R_c - cDNA der *RLP1*, β - β-Laktamase, *K* - Kanamyzin-Resistenzkassette, rep - Replikationsursprung, *L* - *LACI*-Gen, P_7 - T7-Promotor, T_7 - T7-Terminator, H - His-Tag, P - Primer, X_1 - *Xba* I, X_2 - *Xho* I

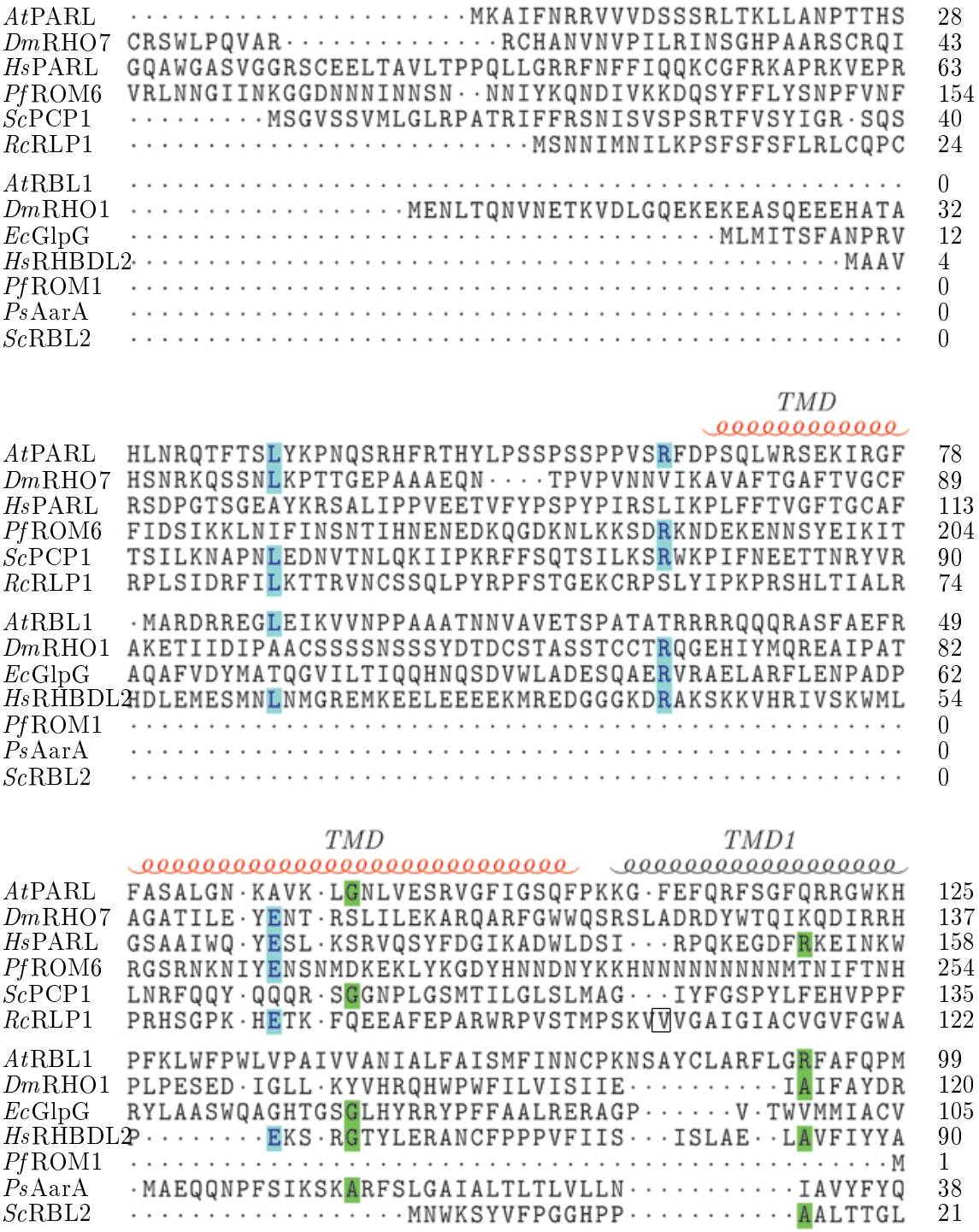
Z.4 Sequenzvergleiche

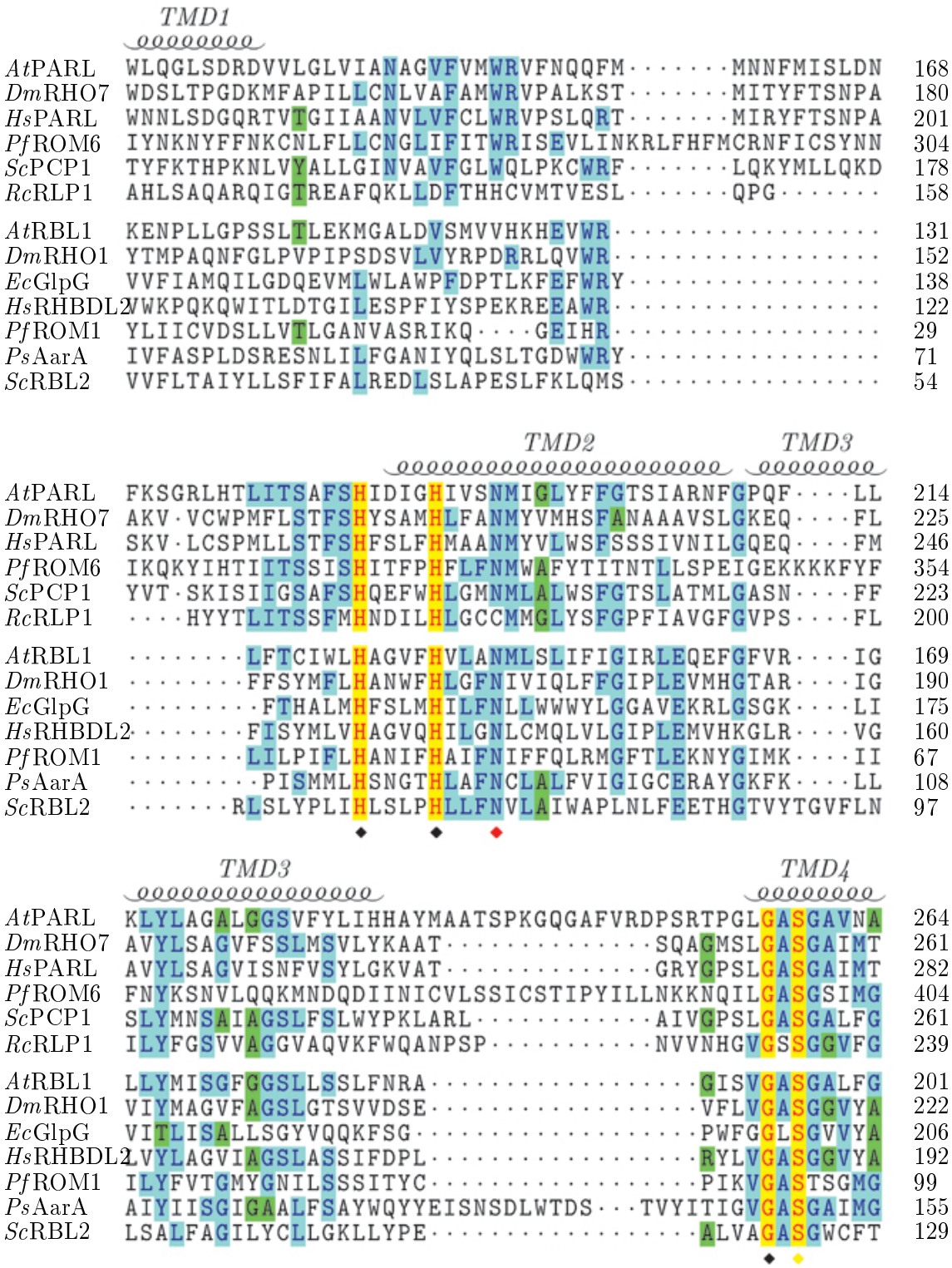
Z.4.1 Vergleich der RLP1-Aminosäuresequenz mit der UniProt-Datenbank

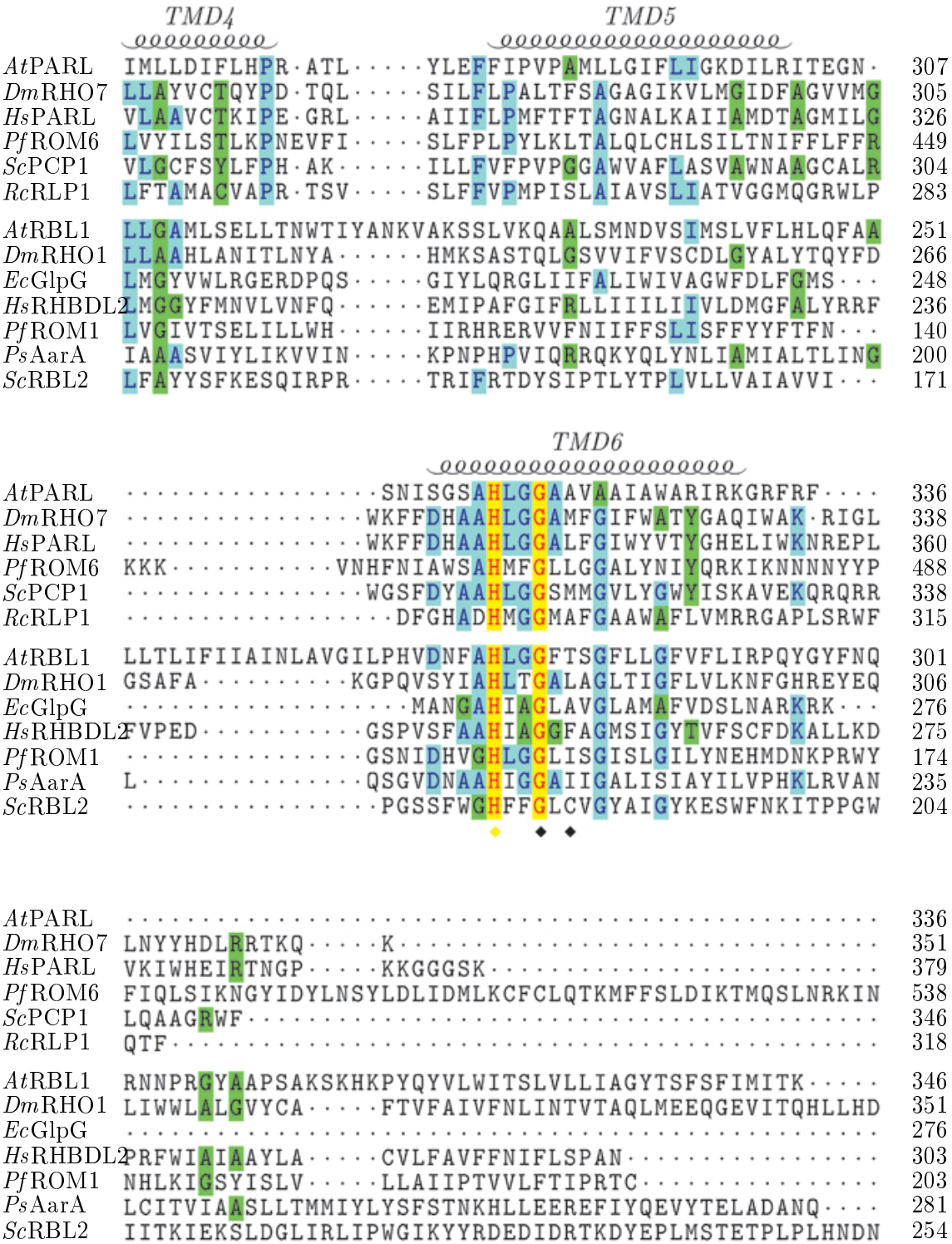
Ein Vergleich der RLP1-Aminosäuresequenz mit der UniProtKB-Datenbank (BLASTp, **?**) zeigte die höchste Ähnlichkeit zu Rhomboid-ähnlichen Proteasen zur S54 Peptidase aus *Simonsiella muelleri* (Akzessionsnummer: D6KWV1, 36 % Identität), *Rhomboid family protein* aus *Polaribacter* sp. (Akzessionsnummer: A2TX14, 35 % Identität) und *Rhomboid family protein Tetrahymena thermophila* (Akzessionsnummer: Q22WI6, 30 % Identität).
Die Software NCBI BLASTP 2.2.17 (**?**) ergab bei den Datenbankvergleich der RLP1 mit der Spezifizierung, dass nur pilzliche Sequenzen durchsucht werden, die höchste Ähnlichkeit zu YGR101w aus *Candida glabrata* (Akzessionsnummer: Q6FSU3, 28 % Identität), *Mitochondrial serin protease* aus *Pichia pastoris* (Akzessionsnummer: Q4R8Q0, 27 % Identität) und PCP1 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Akzessionsnummer: P53259, 27 % Identität).

Z.4.2 Aminosäurevergleich vieler Rhomboid-ähnlicher Proteasen mit der *Rc*RLP1




AtPARL ·····MKAIFNRRVVVDSSSRLTKLLANPTTHS 28
DmRHO7 CRSWLPQVAR·····RCHANVNVPILRINSGHPAARSCRQI 43
HsPARL GQAWGASVGGRSCEELTAVLTPPQLLGRRFNFFIQQKCGFRKAPRKVEPR 63
PfROM6 VRLNNGIINKGGDNNNININNSN··NNIYKQNDIVKKDQSYFFLYSNPFVNF 154
ScPCP1 ·····MSGVSSVMLGLRPATRIFFRSNISVSPSRTFVSYIGR·SQS 40
RcRLP1 ·····MSNNIMNILKPSFSFSFLRLCQPC 24
AtRBL1 ····· 0
DmRHO1 ·····MENLTQNVNETKVDLGQEKEKEASQEEEHATA 32
EcGlpG ·····MLMITSFANPRV 12
HsRHBDL2 ·····MAAV 4
PfROM1 ····· 0
PsAarA ····· 0
ScRBL2 ····· 0
TMD
AtPARL HLNRQTFTSLYKPNQSRHFRTHYLPSSPSSPPVSRFDPSQLWRSEKIRGF 78
DmRHO7 HSNRKQSSNLKPTTGEPAAAEQN····TPVPVNNVIKAVAFTGAFTVGCF 89
HsPARL RSDPGTSGEAYKRSALIPPVEETVFYPSPYPIRSLIKPLFFTVGFTGCAF 113
PfROM6 FIDSIKKLNIFINSNTIHNENEDKQGDKNLKKSDRKNDEKENNSYEIKIT 204
ScPCP1 TSILKNAPNLEDNVTNLQKIIPKRFFSQTSILKSRWKPIFNEETTNRYVR 90
RcRLP1 RPLSIDRFILKTTRVNCSSQLPYRPFSTGEKCRPSLYIPKPRSHLTIALR 74
AtRBL1 ·MARDRREGLEIKVVNPPAAATNNVAVETSPATATRRRRQQQRASFAEFR 49
DmRHO1 AKETIIDIPAACSSSSNSSSYDTDCSTASSTCCTRQGEHIYMQREAIPAT 82
EcGlpG AQAFVDYMATQGVILTIQQHNQSDVWLADESQAERVRAELARFLENPADP 62
HsRHBDL2 HDLEMESMNLNMGREMKEELEEEEKMREDGGGKDRAKSKKVHRIVSKWML 54
PfROM1 ····· 0
PsAarA ····· 0
ScRBL2 ····· 0
TMD
TMD1
AtPARL FASALGN·KAVK·LGNLVESRVGFIGSQFPKKG·FEFQRFSGFQRRGWKH 125
DmRHO7 AGATILE·YENT·RSLILEKARQARFGWWQSRSLADRDYWTQIKQDIRRH 137
HsPARL GSAAIWQ·YESL·KSRVQSYFDGIKADWLDSI···RPQKEGDFRKEINKW 158
PfROM6 RGSRNKNIYENSNMDKEKLYKGDYHNNDNYKKHNNNNNNNNNNMTNIFTNH 254
ScPCP1 LNRFQQY·QQQR·SGGNPLGSMTILGLSLMAG···IYFGSPYLFEHVPPF 135
RcRLP1 PRHSGPK·HETK·FQEEAFEPARWRPVSTMPSKVVVGAIGIACVGVFGWA 122
AtRBL1 PFKLWFPWLVPAIVVANIALFAISMFINNCPKNSAYCLARFLGRFAFQPM 99
DmRHO1 PLPESED·IGLL·KYVHRQHWPWFILVISIIE·····IAIFAYDR 120
EcGlpG RYLAASWQAGHTGSGLHYRRYPFFAALRERAGP·····V·TWVMMIACV 105
HsRHBDL2 P·····EKS·RGTYLERANCFPPPVFIIS···ISLAE··LAVFIYYA 90
PfROM1 ·····M 1
PsAarA ·MAEQQNPFSIKSKARFSLGAIALTLTLVLLN·····IAVYFYQ 38
ScRBL2 ·····MNWKSYVFPGGHPP·····AALTTGL 21


TMD1
AtPARL WLQGLSDRDVVLGLVIANAGVFVMWRVFNQQFM·····MNNFMISLDN 168
DmRHO7 WDSLTPGDKMFAPILLCNLVAFAMWRVPALKST·····MITYFTSNPA 180
HsPARL WNNLSDGQRTVTGIIAANVLVFCLWRVPSLQRT·····MIRYFTSNPA 201
PfROM6 IYNKNYFFNKCNLFLLCNGLIFITWRISEVLINKRLFHFMCRNFICSYNN 304
ScPCP1 TYFKTHPKNLVYALLGINVAVFGLWQLPKCWRF·····LQKYMLLQKD 178
RcRLP1 AHLSAQARQIGTREAFQKLLDFTHHCVMTVESL·····QPG····· 158
AtRBL1 KENPLLGPSSLTLEKMGALDVSMVVHKHEVWR····· 131
DmRHO1 YTMPAQNFGLPVPIPSDSVLVYRPDRRLQVWR····· 152
EcGlpG VVFIAMQILGDQEVMLWLAWPFDPTLKFEFWRY····· 138
HsRHBDL2 VWKPQKQWITLDTGILESPFIYSPEKREEAWR····· 122
PfROM1 YLIICVDSLLVTLGANVASRIKQ····GEIHR····· 29
PsAarA IVFASPLDSRESNLILFGANIYQLSLTGDWWRY····· 71
ScRBL2 VVFLTAIYLLSFIFALREDLSLAPESLFKLQMS····· 54
TMD2
TMD3
AtPARL FKSGRLHTLITSAFSHIDIGHIVSNMIGLYFFGTSIARNFGPQF····LL 214
DmRHO7 AKV·VCWPMFLSTFSHYSAMHLFANMYVMHSFANAAAVSLGKEQ····FL 225
HsPARL SKV·LCSPMLLSTFSHFSLFHMAANMYVLWSFSSSIVNILGQEQ····FM 246
PfROM6 IKQKYIHTIITSSISHITFPHFLFNMWAFYTITNTLLSPEIGEKKKKFYF 354
ScPCP1 YVT·SKISIIGSAFSHQEFWHLGMNMLALWSFGTSLATMLGASN····FF 223
RcRLP1 ····HYYTLITSSFMHNDILHLGCCMMGLYSFGPFIAVGFGVPS····FL 200
AtRBL1 ·····LFTCIWLHAGVFHVLANMLSLIFIGIRLEQEFGFVR····IG 169
DmRHO1 ·····FFSYMFLHANWFHLGFNIVIQLFFGIPLEVMHGTAR····IG 190
EcGlpG ·····FTHALMHFSLMHILFNLLWWWYLGGAVEKRLGSGK····LI 175
HsRHBDL2 ·····FISYMLVHAGVQHILGNLCMQLVLGIPLEMVHKGLR····VG 160
PfROM1 ·····LILPIFLHANIFHAIFNIFFQLRMGFTLEKNYGIMK····II 67
PsAarA ·····PISMMLHSNGTHLAFNCLALFVIGIGCERAYGKFK····LL 108
ScRBL2 ·····RLSLYPLIHLSLPHLLFNVLAIWAPLNLFEETHGTVYTGVFLN 97
TMD3
TMD4
AtPARL KLYLAGALGGSVFYLIHHAYMAATSPKGQGAFVRDPSRTPGLGASGAVNA 264
DmRHO7 AVYLSAGVFSSLMSVLYKAAT·····SQAGMSLGASGAIMT 261
HsPARL AVYLSAGVISNFVSYLGKVAT·····GRYGPSLGASGAIMT 282
PfROM6 FNYKSNVLQQKMNDQDIINICVLSSICSTIPYILLNKKNQILGASGSIMG 404
ScPCP1 SLYMNSAIAGSLFSLWYPKLARL·····AIVGPSLGASGALFG 261
RcRLP1 ILYFGSVVAGGVAQVKFWQANPSP·····NVVNHGVGSSGGVFG 239
AtRBL1 LLYMISGFGGSLLSSLFNRA·····GISVGASGALFG 201
DmRHO1 VIYMAGVFAGSLGTSVVDSE·····VFLVGASGGVYA 222
EcGlpG VITLISALLSGYVQQKFSG·····PWFGGLSGVVYA 206
HsRHBDL2 LVYLAGVIAGSLASSIFDPL·····RYLVGASGGVYA 192
PfROM1 ILYFVTGMYGNILSSSITYC·····PIKVGASTSGMG 99
PsAarA AIYIISGIGAALFSAYWQYYEISNSDLWTDS···TVYITIGVGASGAIMG 155
ScRBL2 LSALFAGILYCLLGKLLYPE·····ALVAGASGWCFT 129


TMD4
TMD5
AtPARL IMLLDIFLHPR·ATL·····YLEFFIPVPAMLLGIFLIGKDILRITEGN· 307
DmRHO7 LLAYVCTQYPD·TQL·····SILFLPALTFSAGAGIKVLMGIDFAGVVMG 305
HsPARL VLAAVCTKIPE·GRL·····AIIFLPMFTFTAGNALKAIIAMDTAGMILG 326
PfROM6 LVYILSTLKPNEVFI·····SLFPLPYLKLTALQLCHLSILTNIFFLFFR 449
ScPCP1 VLGCFSYLFPH·AK·····ILLFVFPVPGGAWVAFLASVAWNAAGCALR 304
RcRLP1 LFTAMACVAPR·TSV·····SLFFVPMPISLAIAVSLIATVGGMQGRWLP 283
AtRBL1 LLGAMLSELLTNWTIYANKVAKSSLVKQAALSMNDVSIMSLVFLHLQFAA 251
DmRHO1 LLAAHLANITLNYA·····HMKSASTQLGSVVIFVSCDLGYALYTQYFD 266
EcGlpG LMGYVWLRGERDPQS·····GIYLQRGLIIFALIWIVAGWFDLFGMS··· 248
HsRHBDL2 LMGGYFMNVLVNFQ·····EMIPAFGIFRLLIIILIIVLDMGFALYRRF 236
PfROM1 LVGIVTSELILLWH·····IIRHRERVVFNIIFFSLISFFYYFTFN··· 140
PsAarA IAAASVIYLIKVVIN·····KPNPHPVIQRRQKYQLYNLIAMIALTLING 200
ScRBL2 LFAYYSFKESQIRPR·····TRIFRTDYSIPTLYTPLVLLVAIAVVI··· 171
TMD6
AtPARL ·····SNISGSAHLGGAAVAAIAWARIRKGRFRF···· 336
DmRHO7 ·····WKFFDHAAHLGGAMFGIFWATYGAQIWAK·RIGL 338
HsPARL ·····WKFFDHAAHLGGALFGIWYVTYGHELIWKNREPL 360
PfROM6 KKK·····VNHFNIAWSAHMFGLLGGALYNIYQRKIKNNNNYYP 488
ScPCP1 ·····WGSFDYAAHLGGSMMGVLYGWYISKAVEKQRQRR 338
RcRLP1 ·····DFGHADHMGGMAFGAAWAFLVMRRGAPLSRWF 315
AtRBL1 LLTLIFIIAINLAVGILPHVDNFAHLGGFTSGFLLGFVFLIRPQYGYFNQ 301
DmRHO1 GSAFA·····KGPQVSYIAHLTGALAGLTIGFLVLKNFGHREYEQ 306
EcGlpG ·····MANGAHIAGLAVGLAMAFVDSLNARKRK··· 276
HsRHBDL2 FVPED·····GSPVSFAAHIAGGFAGMSIGYTVFSCFDKALLKD 275
PfROM1 ·····GSNIDHVGHLGGLISGISLGILYNEHMDNKPRWY 174
PsAarA L·····QSGVDNAAHIGGAIIGALISIAYILVPHKLRVAN 235
ScRBL2 ·····PGSSFWGHFFGLCVGYAIGYKESWFNKITPPGW 204
AtPARL ····· 336
DmRHO7 LNYYHDLRRTKQ·····K····· 351
HsPARL VKIWHEIRTNGP·····KKGGGSK····· 379
PfROM6 FIQLSIKNGYIDYLNSYLDLIDMLKCFCLQTKMFFSLDIKTMQSLNRKIN 538
ScPCP1 LQAAGRWF····· 346
RcRLP1 QTF····· 318
AtRBL1 RNNPRGYAAPSAKSKHKPYQYVLWITSLVLLIAGYTSFSFIMITK····· 346
DmRHO1 LIWWLALGVYCA·····FTVFAIVFNLINTVTAQLMEEQGEVITQHLLHD 351
EcGlpG ····· 276
HsRHBDL2 PRFWIAIAAYLA·····CVLFAVFFNIFLSPAN····· 303
PfROM1 NHLKIGSYISLV·····LLAIIPTVVLFTIPRTC····· 203
PsAarA LCITVIAASLLTMMIYLYSFSTNKHLLEEREFIYQEVYTELADANQ···· 281
ScRBL2 IITKIEKSLDGLIRLIPWGIKYYRDEDIDRTKDYEPLMSTETPLPLHNDN 254

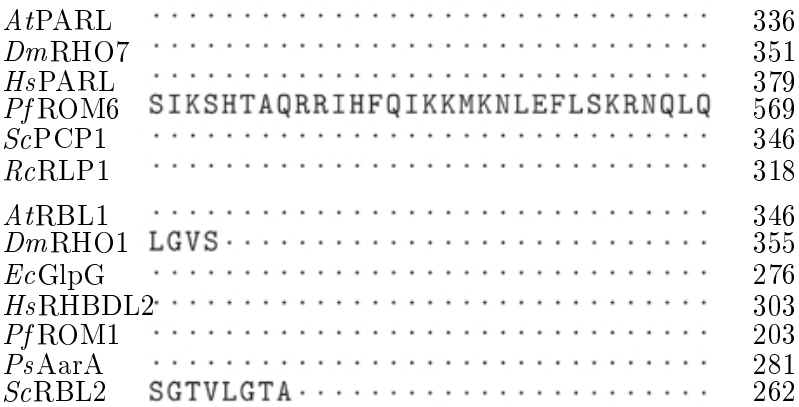
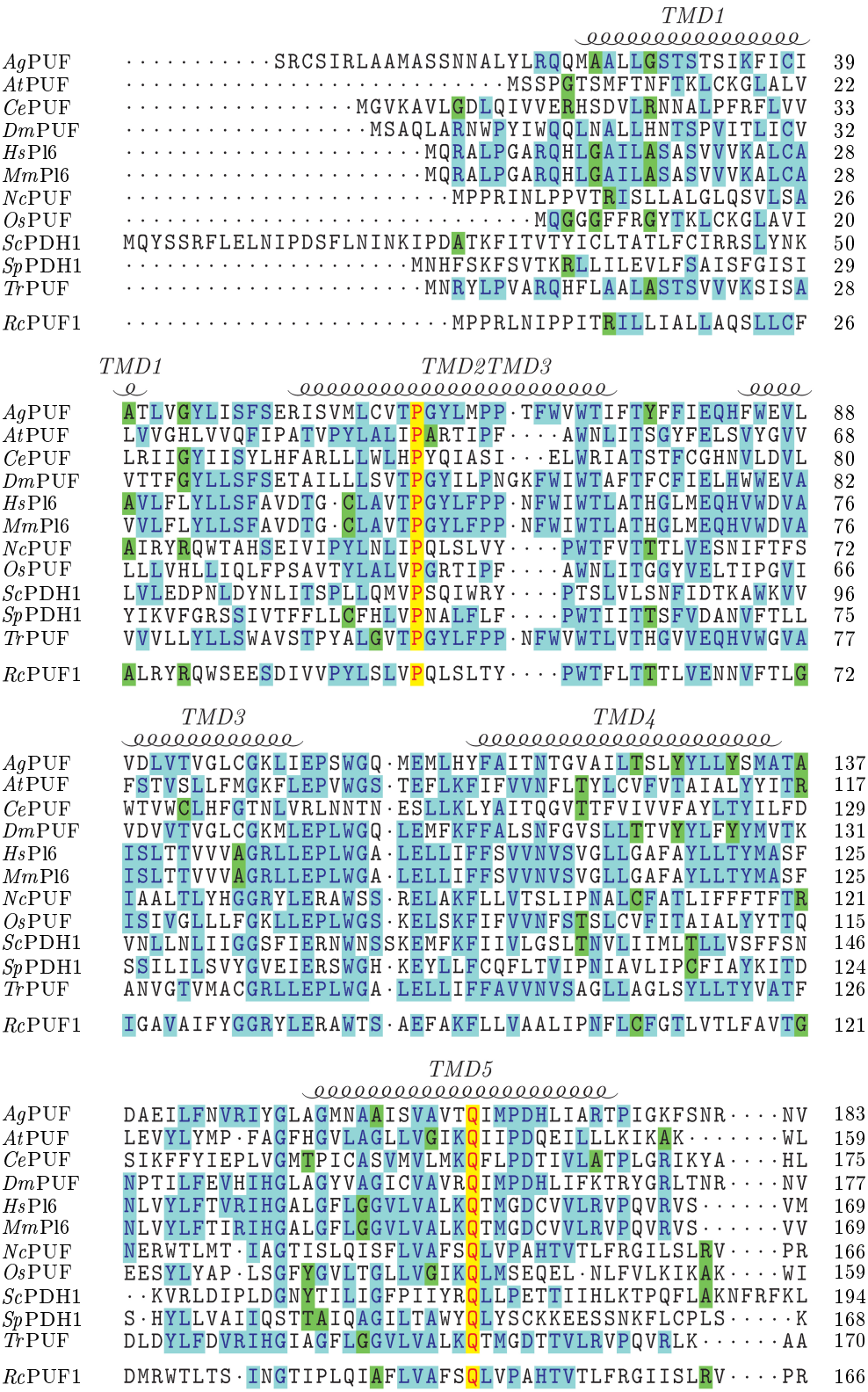
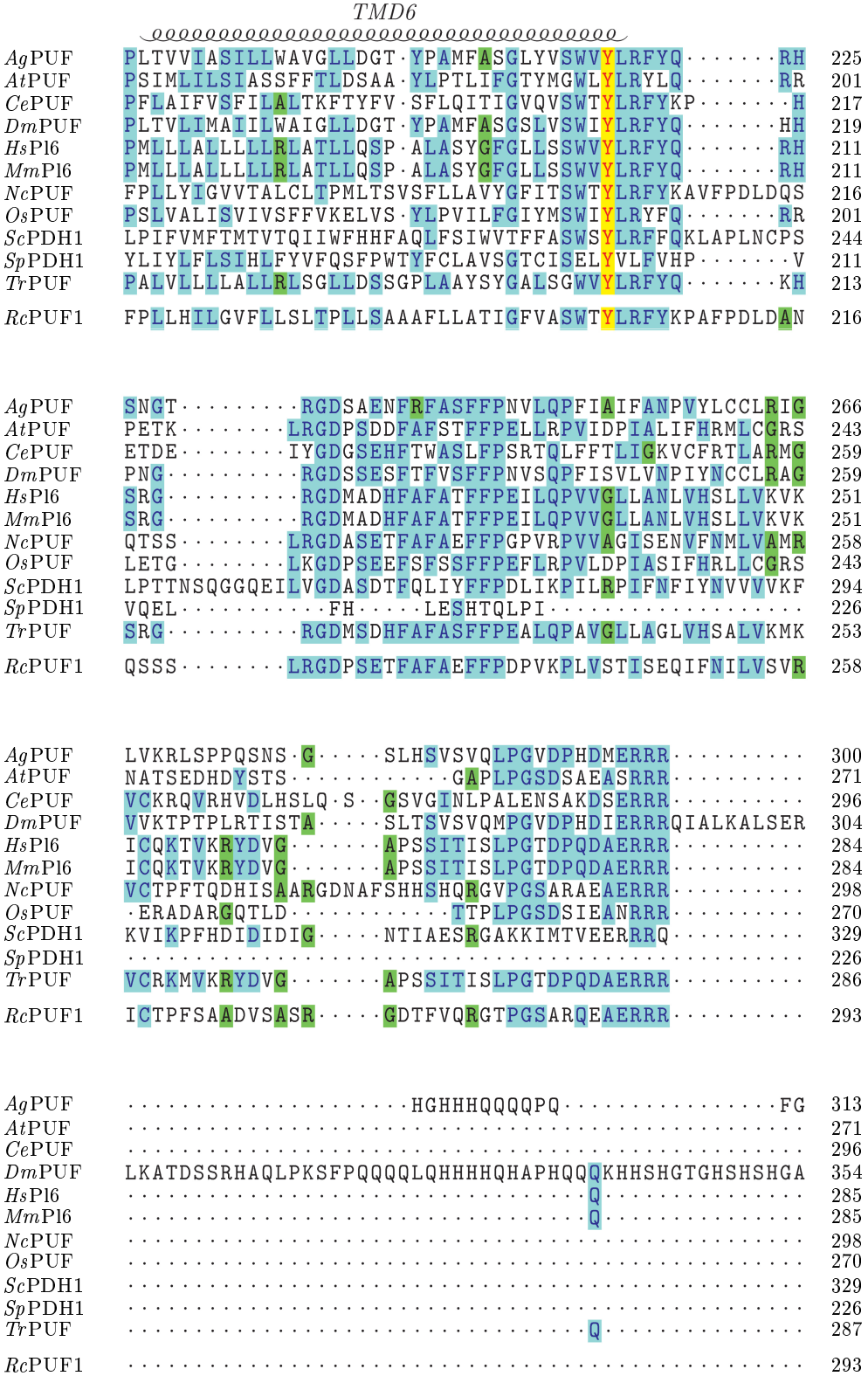


Abbildung 78: Abbildung 78: Aminosäurevergleich vieler gut untersuchter Rhomboid-ähnlicher Proteasen mit der *Rc*RLP1 des *Rhynchosporium*-Isolates UK7

Im oberen Teil sind die Rhomboid-ähnlichen Proteasen des PARL-Types von den anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen abgesetzt. Über dem Vergleich sind in schwarz die Positionen der Transmembrandomänen (TMD) von *Ec*GlpG dargestellt. Diese entsprechen ungefähr den Kerndomänen der anderen Rhomboid-ähnlichen Proteasen. Die rote Transmembranhelix deutet die Position der N-Terminalen membrandurchspannenden Domäne der meisten PARL-Typ-Proteasen. Sehr stark konservierte Aminosäuren sind unter dem Vergleich mit Rhauten gekennzeichnet. Die katalytischen Aminosäuren Serin und Histidin sind mit gelben Rauten markiert. Das hochkonservierte Asparagin, welches in der *Rc*RLP1 durch ein Cystein (C179) ersetzt ist, ist durch eine rote Raute hervorgehoben. Durch den Vergleich der genomischen Sequenz der Isolate strain5 und UK7 wurde ein Aminosäureaustausch (A107V) in der ersten Transmembrandomäne entdeckt (siehe 3.2). Das Valin ist in schwarz gerahmt.

Z.4.3 Aminosäurevergleich der 11 Proteine mit Domäne DUF1751 und der *Rc*PUF1




TMD6
AgPUF PLTVVIASILLWAVGLLDGT·YPAMFASGLYVSWVYLRFYQ·····RH 225
AtPUF PSIMLILSIASSFFTLDSAA·YLPTLIFGTYMGWLYLRYLQ·····RR 201
CePUF PFLAIFVSFILALTKFTYFV·SFLQITIGVQVSWTYLRFYKP·····H 217
DmPUF PLTVLIMAIILWAIGLLDGT·YPAMFASGSLVSWIYLRFYQ·····HH 219
HsPl6 PMLLLALLLLLRLATLLQSP·ALASYGFGLLSSWVYLRFYQ·····RH 211
MmPl6 PMLLLALLLLLRLATLLQSP·ALASYGFGLLSSWVYLRFYQ·····RH 211
NcPUF FPLLYIGVVTALCLTPMLTSVSFLLAVYGFITSWTYLRFYKAVFPDLDQS 216
OsPUF PSLVALISVIVSFFVKELVS·YLPVILFGIYMSWIYLRYFQ·····RR 201
ScPDH1 LPIFVMFTMTVTQIIWFHHFAQLFSIWVTFFASWSYLRFFQKLAPLNCPS 244
SpPDH1 YLIYLFLSIHLFYVFQSFPWTYFCLAVSGTCISELYVLFVHP·····V 211
TrPUF PALVLLLLALLRLSGLLDSSGPLAAYSYGALSGWVYLRFYQ·····KH 213
RcPUF1 FPLLHILGVFLLSLTPLLSAAAFLLATIGFVASWTYLRFYKPAFPDLDAN 216
AgPUF SNGT·····RGDSAENFRFASFFPNVLQPFIAIFANPVYLCCLRIG 266
AtPUF PETK·····LRGDPSDDFAFSTFFPELLRPVIDPIALIFHRMLCGRS 243
CePUF ETDE·····IYGDGSEHFTWASLFPSRTQLFFTLIGKVCFRTLARMG 259
DmPUF PNG·····RGDSSESFTFVSFFPNVSQPFISVLVNPIYNCCLRAG 259
HsPl6 SRG·····RGDMADHFAFATFFPEILQPVVGLLANLVHSLLVKVK 251
MmPl6 SRG·····RGDMADHFAFATFFPEILQPVVGLLANLVHSLLVKVK 251
NcPUF QTSS·····LRGDASETFAFAEFFPGPVRPVVAGISENVFNMLVAMR 258
OsPUF LETG·····LKGDPSEEFSFSSFFPEFLRPVLDPIASIFHRLLCGRS 243
ScPDH1 LPTTNSQGGQEILVGDASDTFQLIYFFPDLIKPILRPIFNFIYNVVVVKF 294
SpPDH1 VQEL·····FH·····LESHTQLPI····· 226
TrPUF SRG·····RGDMSDHFAFASFFPEALQPAVGLLAGLVHSALVKMK 253
RcPUF1 QSSS·····LRGDPSETFAFAEFFPDPVKPLVSTISEQIFNILVSVR 258
AgPUF LVKRLSPPQSNS·G·····SLHSVSVQLPGVDPHDMERRR····· 300
AtPUF NATSEDHDYSTS·····GAPLPGSDSAEASRRR····· 271
CePUF VCKRQVRHVDLHSLQ·S··GSVGINLPALENSAKDSERRR····· 296
DmPUF VVKTPTPLRTISTA·····SLTSVSVQMPGVDPHDIERRRQIALKALSER 304
HsPl6 ICQKTVKRYDVG·····APSSITISLPGTDPQDAERRR····· 284
MmPl6 ICQKTVKRYDVG·····APSSITISLPGTDPQDAERRR····· 284
NcPUF VCTPFTQDHISAARGDNAFSHHSHQRGVPGSARAEAERRR····· 298
OsPUF ·ERADARGQTLD·····TTPLPGSDSIEANRRR····· 270
ScPDH1 KVIKPFHDIDIDIG·····NTIAESRGAKKIMTVEERRRQ····· 329
SpPDH1 ····· 226
TrPUF VCRKMVKRYDVG·····APSSITISLPGTDPQDAERRR····· 286
RcPUF1 ICTPFSAADVSASR·····GDTFVQRGTPGSARQEAERRR····· 293
AgPUF ·····HGHHHQQQQPQ·····FG 313
AtPUF ····· 271
CePUF ····· 296
DmPUF LKATDSSRHAQLPKSFPQQQQLQHHHHQHAPHQQQKHHSHGTGHSHSHGA 354
HsPl6 ·····Q····· 285
MmPl6 ·····Q····· 285
NcPUF ····· 298
OsPUF ····· 270
ScPDH1 ····· 329
SpPDH1 ····· 226
TrPUF ·····Q····· 287
RcPUF1 ····· 293

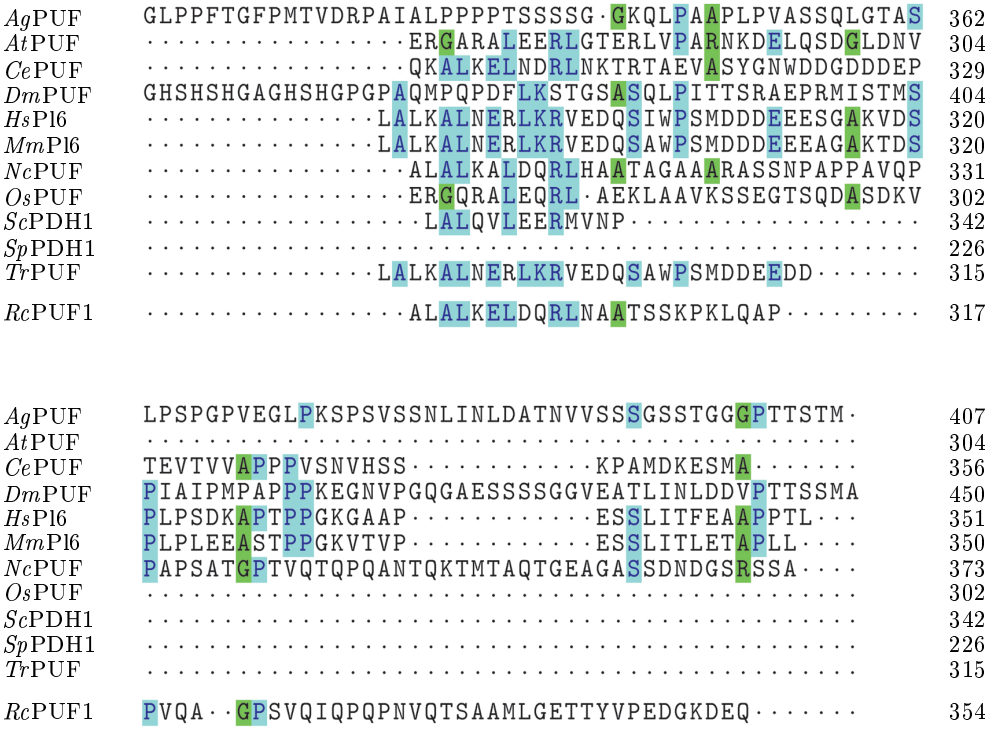


Abbildung 79: Abbildung 79: Aminosäurevergleich der 11 Proteine mit Domäne DUF1751 und der *Rc*PUF1

Über dem Aminosäurevergleich sind die Positionen der prognostizierten Transmembrandomänen von *Rc*PUF1 (TMHMM-Algorithmus) gekennzeichnet. Die genutzten Sequenzen sind unter folgenden Akzessionsnummern zugänglich: *Ag*PUF - XP_307858(*Anopheles gambiae*), *AtPUF* – NP_566326(*A. thaliana*), *CePUF* – NP_502292(*C. elegans*), *DmPUF* – NP_609033(*D. melanogaster*), *HsPl6* – *Q*12893(*H. sapiens*), *MmPl6* – *Q*9*WUH*1(*M. musculus*), *NcPUF* – XP_963680(*N. crassa*), *OsPUF* – $NP_001060496$(*O. sativa*), *ScPDH*1 – *O*42826(*S. cerevisiae*), *SpPDH*1 – *Q*12239(*Schizosaccharomyces pombe*), *TrPUF* – *SINFRUP*160030(*Takifugu rubripes*).

BILDUNGSGANG

Claudia Mönchmeier

Geboren am 12. Februar 1982 in Erfurt

11/2005 - 01/2011	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Wissenschaftliche Mitarbeiterin im SFB 648 Promotion zum Thema: Funktionelle Charakterisierung von RLP1, einem Rhomboid-ähnlichen Protein des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune* Angestrebter Abschluss: Dr. *rer. nat.*
10/2000 - 09/2005	Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Fachbereich Biochemie/Biotechnologie Studium der Biochemie Vertiefungsrichtungen: Ökologische Biochemie und Biochemie der Pflanzen Diplomarbeit zum Thema: Charakterisierung einer Histidin-proteinkinase (Rs*HPK1*) aus *Rhynchosporium secalis* Abschluss: Diplom
09/1992 - 06/2000	Martin-Luther-Gymnasium Erfurt Abschluss: Abitur

PUBLIKATIONEN

Poster: Mönchmeier, C., Rödiger, A., Brandt, W. & Knogge, W. 2007 (May). The World of *Rhynchosporium* looks Rhomboid. *International Meeting Communication in Plants and their Response to the Environmentöf the collaborative research center SFB 648* Halle (Saale), Germany.

Poster: Mönchmeier, C., Brandt, W. & Knogge, W. 2008 (June). The Rhomboid-like Protease *Rs*Rlp1 of *Rhynchosporium secalis. Gordon Research Conference Cellular & Molecular Fungal Biology"* Holderness, USA.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrads bewerbe, die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst,nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale), im Januar 2011

Claudia Mönchmeier