

Untersuchungen der Effekte von Iprovalicarb  
und Dimethomorph auf die Zellwand von  
*Phytophthora infestans*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität

vorgelegt von

Britta Delvos

aus Geldern

Mai 2009

Aus dem Institut für Botanik III  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. William Martin  
Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth  
Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Oomyceten.....	1
1.2 Eigenschaften und Struktur der Cellulose.....	2
1.2.1 Cellulose-Synthase.....	2
1.2.2 Struktur der Cellulose-Synthase.....	4
1.2.3 Zusammenbau des Cellulose-Synthase-Komplexes.....	5
1.2.4 Mögliche Interaktionspartner der Cellulose-Synthase.....	6
1.3 Eigenschaften und Struktur von Chitin.....	8
1.3.1 Chitin-Synthase.....	9
1.3.2 Struktur der Chitin-Synthase.....	10
1.3.3 Katalytischer Mechanismus der Chitin-Synthase.....	11
1.3.4 Lokalisation der Chitin-Synthase.....	12
1.4 Bekämpfung von <i>P. infestans</i> .....	12
1.4.1 Iprovalicarb.....	13
1.4.2 Dimethomorph.....	13
1.4.3 Metalaxyl.....	14
1.4.4 Vorhergehende Studien zum Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb.....	14
1.5 Zielsetzung.....	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 verwendete Materialien.....	16
2.1.1 Chemikalien.....	16
2.1.2 Antibiotika.....	16
2.1.3 Antikörper.....	16
2.1.4 Enzyme.....	17
2.1.4.1 Restriktionsenzyme.....	17
2.1.4.2 weitere Enzyme.....	17
2.1.5 Geräte.....	17
2.1.6 Reagenzsätze.....	18
2.1.7 Oligonukleotide.....	18
2.1.8 Vektoren.....	18
2.2 verwendete Kulturen.....	18
2.2.1 <i>Phytophthora infestans</i> .....	18
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.3 Wirkstoffe.....	19
2.3.1 Iprovalicarb.....	19
2.3.2 Dimethomorph.....	19
2.3.3 Metalaxyl.....	19
2.4 Methoden.....	19
2.4.1 Haltung von <i>Escherichia coli</i> .....	19
2.4.2 Haltung von <i>P. infestans</i> .....	20
2.4.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....	20
2.4.4 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension.....	20
2.4.5 Gelelektrophorese von DNA.....	20
2.4.6 Reinigung von Nukleinsäurelösungen.....	21
2.4.6.1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion.....	21
2.4.6.2 Präzipitation von Nukleinsäuren.....	21
2.4.7 RNA-Isolierung.....	21
2.4.8 Erstrang-cDNA-Synthese.....	21
2.4.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	21
2.4.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	22

2.4.11	Enzymatische Modifikationen von DNA.....	22
2.4.11.1	Ligation in pGEM®-T Easy.....	22
2.4.11.2	Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren.....	22
2.4.11.3	Dephosphorylierung von DNA.....	22
2.4.11.4	Phosphorylierung von DNA.....	22
2.4.11.5	Glätten von 5'-Überhängen der DNA.....	23
2.4.11.6	Restriktion von DNA.....	23
2.4.12	Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.4.13	Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i> .....	23
2.4.14	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	24
2.4.15	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.4.16	Sequenziergele.....	25
2.4.17	Präparation von <i>E. coli</i> Zell-Lysaten und Ni-NTA-Reinigung unter nativen Bedingungen.....	25
2.4.18	Präparation von <i>E. coli</i> Zell-Lysaten und Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen.....	26
2.4.19	Isolierung und Aufschluss von Inclusion Bodies.....	26
2.4.20	Dialyse von Proteinen.....	26
2.4.21	Gewinnung und Reinigung von Antikörpern.....	27
2.4.22	Herstellung eines Protein-Rohextraktes von <i>P. infestans</i> .....	27
2.4.23	Isolation von Plasmamembranen aus <i>P. infestans</i> .....	27
2.4.24	Präparation Detergenz-resistenter Membranen (DRM) aus <i>P. infestans</i> ...	28
2.4.25	Proteinbestimmung nach Bradford.....	28
2.4.26	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure.....	28
2.4.27	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	29
2.4.28	2D-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	29
2.4.28.1	Isoelektrische Fokussierung.....	29
2.4.28.2	Äquilibrierung und 2. Dimension.....	30
2.4.29	Färben von Proteinen im Gel mit Coomassie Brilliant Blau.....	30
2.4.30	Western-Transfer-Analyse.....	30
2.4.31	Immunodetektion von Proteinen.....	31
2.4.32	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen.....	32
2.4.32.1	Tryptische Spaltung von Proteinen in SDS-Gelen.....	32
2.4.32.2	Proteinsequenzierung.....	33
2.4.33	Mikroskopische Untersuchungen.....	33
2.4.33.1	Mikroskopie.....	33
2.4.33.2	Immunofluoreszenz-Mikroskopie.....	33
2.4.33.3	Färbung von Sterolen mit Filipin.....	34
2.4.33.4	Färbung von Chitin mit Texas Red-Markiertem Wheat Germ Agglutinin.....	34
2.4.34	Bioinformatische Methoden.....	34

### **3. Ergebnisse 36**

---

3.1	Herstellung von Antikörpern gegen Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase.....	36
3.1.1	Heterologe Expression und Reinigung der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Domänen.....	38
3.1.2	Produktion von Antikörpern.....	42
3.1.3	Optimierung der Antikörper im Western-Blot.....	43
3.1.4	Reinigung der Antikörper.....	44
3.1.5	Isolation Detergenz-resistenter Membranen.....	46
3.2	Immunofluoreszenzfärbung der Cellulose-Synthase.....	47
3.3	Fluoreszenzfärbung von Chitin.....	49
3.4	Immunofluoreszenzfärbung der Chitin-Synthase.....	51
3.5	Fluoreszenzfärbung von Sterolen.....	53
3.6	Proteomanalyse von <i>P. infestans</i> .....	57

3.7 Phylogenetische Analyse der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase.....	68
<b>4. Diskussion</b>	<b>70</b>
<hr/>	
4.1 Herstellung von Antikörpern gegen Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase.....	70
4.2 Lokalisation der Cellulose-Synthase.....	71
4.3 Die Rolle der Mikrotubuli bei der Synthese der Cellulose.....	72
4.4 Lokalisation der Chitin-Synthase.....	74
4.5 Lokalisation der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase in Lipid Rafts.....	75
4.6 Vergleich mit Wirkstoffen, die die Biosynthese von Cellulose beeinflussen .....	77
4.7 Analyse des Proteoms von <i>P. infestans</i> .....	81
4.7.1 Analyse des Proteoms von Dimethomorph-behandelten <i>P. infestans</i> -Kulturen.....	81
4.7.2 Analyse des Proteoms von Iprovalicarb-behandelten <i>P. infestans</i> -Kulturen.....	84
4.7.3 Analyse des Proteoms von Metalaxyl-behandelten <i>P. infestans</i> -Kulturen..	86
4.7.4 Vergleichende Analyse des mit Wirkstoff-behandelten Proteoms von <i>P. infestans</i> .....	87
4.8 Phylogenetische Verteilung der Cellulose-Synthase.....	89
4.9 Phylogenetische Verteilung der Chitin-Synthase.....	92
4.10 Ausblick.....	94
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<hr/>	
5.1 Zusammenfassung.....	96
5.2 Summary.....	98
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>100</b>
<hr/>	
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>117</b>
<hr/>	
<b>8. Anhang</b>	<b>119</b>
<hr/>	
8.1 Multiples Alignment der Cellulose-Synthase-Sequenzen.....	119
8.1 Multiples Alignment der Chitin-Synthase-Sequenzen.....	125
8.2 Zugangsnummern der verwendeten Cellulose-Synthase-Sequenzen.....	129
8.3 Zugangsnummern der verwendeten Chitin-Synthase-Sequenzen.....	131
Danksagung	
Eidesstatliche Erklärung	

## 1. Einleitung

Im Jahre 1843 trat in Nordamerika eine bis dahin unbekannte Krankheit der Kartoffel auf (Ristaino 2002), die zu beträchtlichen Ernteaufschlägen führte. Von Amerika aus breitete sich diese Krankheit auf Europa aus und führte zwischen 1845 und 1847 zu einer großen Hungersnot in Irland (Ristaino 2002), die zum Tod von über einer Million Menschen (Gomez-Alpizar *et al.* 2007) und zur Auswanderung einer weiteren Million Menschen führte. Diese als Kartoffelfäule bezeichnete Krankheit wird von dem Pathogen *Phytophthora infestans* verursacht (Judelson 1997). Die Kartoffelfäule ist nicht nur eine der verheerendsten Pflanzenkrankheiten in der menschlichen Geschichte, auch heute noch ist diese Krankheit von wirtschaftlicher Bedeutung und die Kosten weltweit aufgrund von Ernteaufschlägen und Bekämpfungsmaßnahmen werden jährlich auf Milliarden Dollar geschätzt (Duncan 1999). *P. infestans*, dessen Wirtspflanzenkreis sich nicht nur auf die Kartoffel beschränkt, sondern auch Tomaten und andere Mitglieder der *Solanaceae* umfasst, gehört zur Klasse der Oomyceten. *P. infestans* ist der am besten charakterisierte pflanzenpathogene Oomycet und dient allgemein, wie auch in dieser Arbeit als Modellorganismus.

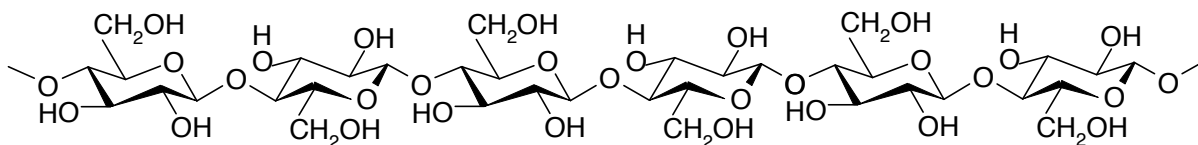
### 1.1 Oomyceten

Oomyceten wurden wegen ihres pilzähnlichen, filamentösen Aussehens lange als Pilze klassifiziert. Durch Analysen mitochondrialer Gene wurde jedoch gezeigt, dass Oomyceten enger verwandt mit Organismen aus der Gruppe der Stramenopilen sind (Avila-Adame *et al.* 2006), einer Gruppe von Algen zu denen auch die Diatomeen zählen. Die Oomyceten umfassen eine große Gruppe von Mikroorganismen, die sowohl Saprophyten als auch Pathogene von Pflanzen, Fischen, Insekten, Nematoden und Vertebraten enthalten (Phillips *et al.* 2008). Im Vergleich zu den Pilzen besitzen Oomyceten ein diploides, unseptiertes und vielkerniges Myzel (Brasier und Sansome 1975). Außerdem sind sie selbst nicht in der Lage Sterole und Thiamin zu synthetisieren (Attard *et al.* 2008). Oomyceten sind sekundäre Endosymbionten, wobei ein nicht-photosynthetischer primitiver Eukaryot einen photosynthetischen Organismus aufgenommen hat (Fry 2008). Sowohl der Zellkern als auch die Mitochondrien des photosynthetischen Organismus und später auch die Chloroplasten dieser gingen verloren (Cavalier-Smith 2000), aber das aktuelle nukleare Genom enthält Gene aller verlorenen Genome. Übereinstimmend fanden Tylor *et al.* (2006) im Genom von *P. sojae* und *P. ramorum* 855 Gene, die wahrscheinlich von einem photosynthetischen Vorgänger (Rotalge oder Cyanobakterium) stammen. Die Zellwand der Oomyceten besteht hauptsächlich aus den für photosynthetische Organismen typischen (1,3)- $\beta$ -D-Glukanen, (1,6)- $\beta$ -D-Glukanen und Cellulose (Bartnicki-Garcia 1968). Überraschend kann in Oomyceten-Zellwänden aber auch in geringen Mengen Chitin vorhanden sein, das die charakteristische Hauptkomponente der Zellwand der Pilze darstellt (Lin und Aronson 1970).

Da über die Biosynthese von Cellulose und Chitin in Oomyceten bisher wenig bekannt ist, ist der Rückgriff auf Wissen aus Pflanzen (Cellulose) und Insekten (Chitin) daher für diese Arbeit unverzichtbar.

## 1.2 Eigenschaften und Struktur der Cellulose

Cellulose ist mit einigen  $10^{11}$  Tonnen die jährlich produziert werden, das häufigste Makromolekül der Erde (Hess *et al.* 1928) und spielt als Hauptkomponente der pflanzlichen Zellwand eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellvolumens, der Aufrechterhaltung der Zellform und -größe und des Schutzes und der Abwehr gegen Pathogene. Aufgrund ihrer Häufigkeit und Eigenschaften finden Cellulose oder deren Derivate vielseitige Anwendung wie z. B. bei der Produktion von Papier und Pappe, in der Textilindustrie und bei der Herstellung von Filmen, Plastik, Pharmazeutika und Kosmetika. (Engelhardt 1995). Darüber hinaus dient Cellulose als Quelle erneuerbarer Energie (Ragauskas *et al.* 2006). Neben höheren Pflanzen wird Cellulose auch von einigen Bakterien (Ross *et al.* 1991) wie *Acetobacter xylinum* (Saxena *et al.* 1990) und *Agrobacterium tumefaciens* (Amikam und Benziman 1989), von Algen (Roberts *et al.* 2002), den Oomyceten (Grenville-Briggs *et al.* 2008), dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Blanton *et al.* 2000) und sogar von niederen Tieren wie den Urochordata synthetisiert (Matthysse *et al.* 2004).



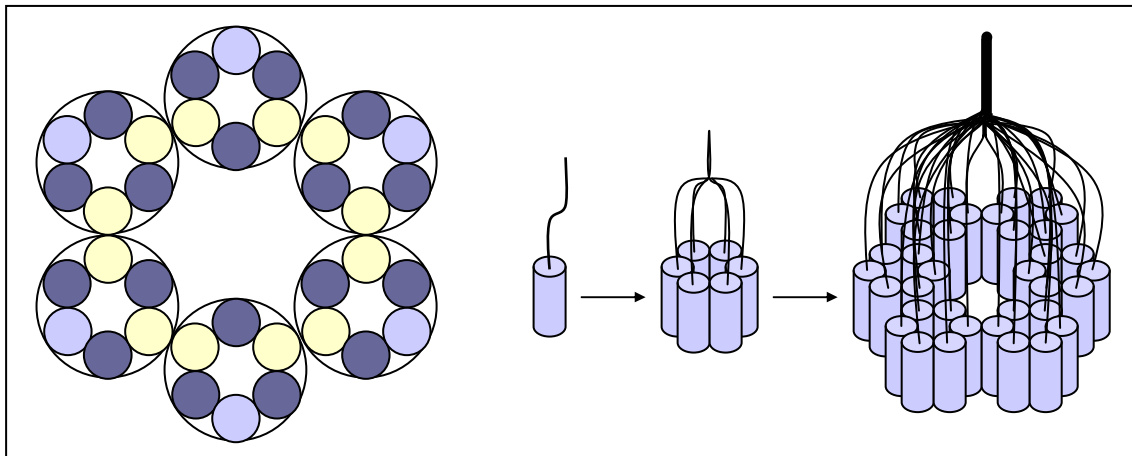
**Abb. 1.1:** Ausschnitt einer Cellulose-Kette aus  $\beta$ -1,4-verknüpften Glukose-Molekülen.

Cellulose-Mikrofibrillen sind unlösliche kabelähnliche Strukturen, die aus ungefähr 36 über Wasserstoffbrückenbindungen verbundenen parallelen Cellulose-Ketten bestehen. Diese enthalten wiederum 500-14.000  $\beta$ -1,4-verknüpfte Glukose-Moleküle (Abb. 1.1), die jeweils um  $180^\circ$  invertiert sind. Cellulose kommt in drei verschiedenen Formen vor. In der ersten und in der Natur häufigsten Form sind alle Cellulose-Ketten parallel angeordnet, während die Ketten in der zweiten Form antiparallel sind (McNeil *et al.* 1984; Somerville 2006).

### 1.2.1 Cellulose-Synthase

Die Enzymkomplexe, die für die Synthese von Cellulose verantwortlich sind, wurden erstmals in der Alge *Oocystis apiculata* als globuläre Strukturen an der Spitze sich verlängernder Mikrofibrillen entdeckt (Montezinos und Brown 1976; Montezinos und Brown 1978). Darum wurden sie als terminale Komplexe (TC) bezeichnet. TC wurden in

verschiedenen Organismen visualisiert und kommen in zwei Formen vor. Lineare TC wurden z. B. in Algen (Itoh und Brown 1984), *D. discoideum* (Grimson 1996) und dem Bakterium *A. xylinum* (Ross 1991) beobachtet und ihre Organisation unterscheidet sich von Organismus zu Organismus durch die Anzahl synthetisierender Einheiten (Roberts und Roberts 2004). Die andere Form von TC ist charakteristisch für höhere Pflanzen und wurde mittels Gefrierbruch der Plasmamembran als symmetrische Rosette aus sechs globulären Einheiten von ca. 25-30 nm Durchmesser visualisiert (Mueller und Brown 1980). Die Rosetten wurden 1999 von Kimura *et al.* mittels immunologischer Methoden als Cellulose-Synthasen identifiziert. Jede der sechs Einheiten einer Rosette besteht wiederum aus sechs Proteinen, von denen jedes an der Synthese einer  $\beta$ -1,4-Glukan-Kette involviert ist (Abb. 1.2; Herth 1983). Darum ist eine Rosette verantwortlich für die simultane Verlängerung von 36  $\beta$ -1,4-Glukan-Ketten, die zu einer Mikrofibrille kokristallisieren (Reiter 2002).



**Abb. 1.2:** Modell für die Struktur einer Rosette, die aus sechs Untereinheiten aus je sechs CESA-Polypeptiden besteht. Jedes CESA-Polypeptid synthetisiert je eine  $\beta$ -(1,4)-Glukan-Kette, so dass 36 Glukan-Ketten synthetisiert werden, die zu einer Mikrofibrille kokristallisieren (verändert nach Doblin *et al.* 2002).

Die einzigen bekannten Komponenten der Cellulose-Synthase in höheren Pflanzen sind die CESA-Proteine (Taylor 2008). Diese wurden ursprünglich durch Vergleich der Sequenzen einer Baumwollfaser cDNA-Bank mit bakteriellen Sequenzen identifiziert (Pear 1996). Der wirkliche Durchbruch gelang durch die Entdeckung, dass das Gen, welches in der temperatur-sensitiven Mutante *radial swelling 1 (rsw1)* beeinträchtigt ist, ein Mitglied der CesaA-Gene ist (Arioli 1998). Bei der restriktiven Temperatur dissoziierte die Rosette in einzelne Untereinheiten, was eine direkte Verbindung zwischen den CESA-Proteinen und der Struktur der Rosette zeigte. Außerdem weist dies darauf hin, dass eine komplette Rosette für die Synthese von Cellulose benötigt wird. Sequenzierung von Genomen zeigte, dass alle höheren Pflanzen mehrere CesaA-Gene mit konservierten Strukturen besitzen. So besitzt *Arabidopsis* zehn CesaA-Gene, die 3,5-5,5 kb groß sind und 9-13 kurze Introns enthalten (Richmond 2000). Sie erzeugen Transkripte mit einer Größe von 3-3,5 kb, die für

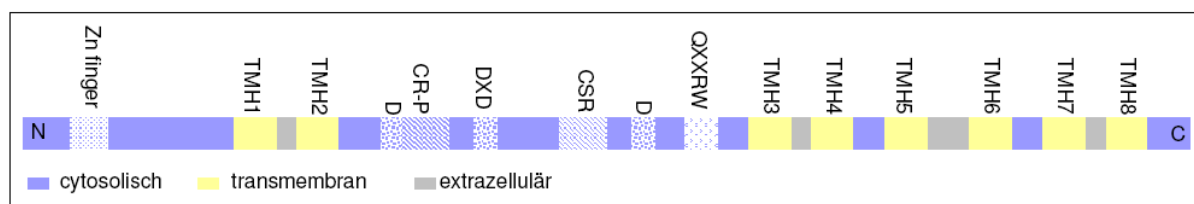


Proteine mit 53-98% Sequenzidentität untereinander kodieren (Holland *et al.* 2000). Mais besitzt mindestens zwölf CesA-Gene (Appenzeller *et al.* 2004), Gerste hat mindestens acht (Burton *et al.* 2004), während das Genom von *Populus trichocarpa* sogar 18 CesA-Gene besitzt (Djerbi *et al.* 2005).

### 1.2.2 Struktur der Cellulose-Synthase

Die CESA-Proteine von *Arabidopsis* sind 985-1088 Aminosäuren lang und haben acht mögliche transmembrane Domänen (Lerouxel *et al.* 2006; Abb. 1.3). Der N-Terminus enthält eine cytosolische Domäne von ca. 150 Aminosäuren, die als hypervariable Region bezeichnet wird und reich an sauren Aminosäuren ist (Richmond 2000). Dieser Domäne folgen zwei Transmembrandomänen, während die restlichen sechs Transmembrandomänen am carboxyterminalen Ende lokalisiert sind (Joshi und Mansfield 2007). Die aminoterminalen Region enthält eine Cystein-reiche Domäne mit einem CXXC-Motiv, das typisch für RING Zink-Finger-Domänen ist (Somerville 2006), welche an Protein-Protein-Interaktionen in Komplexen beteiligt sind (Saurin 1996).

Eine große zentrale Domäne von ca. 530 Aminosäuren liegt zwischen der zweiten und dritten Transmembrandomäne und ist cytosolisch (Delmer 1999). Die zentrale Domäne ist innerhalb der CESA-Proteine hochkonserviert (Taylor 2008), mit der Ausnahme von ca. 64-91 Resten mit schwacher Sequenzidentität. Dieser Sequenzabschnitt wurde als zweite hypervariable Region bezeichnet, bis Vergara und Carpita (2001) erkannten, dass diese Sequenz innerhalb verschiedener Spezies konserviert ist und diese Region in klassenspezifische Region umbenannt wurde. Diese Region ist also zwischen orthologen Proteinen stärker konserviert als zwischen Paralogen (Doblin und Kurek 2002). Sie enthält konservierte basische, saure und aromatische Aminosäuren und Cystein-Reste, deren mögliche Funktion in der Bindung des Substrates liegt (Saxena und Brown 2000). Die zentrale Domäne enthält das Motiv Q/RXXRW, dass mit bakteriellen Cellulose-Synthasen und anderen prozessiven Glykosyltransferasen assoziiert wird (Saxena und Brown 1997). Zusätzlich werden ein DXD-Motiv und zwei weitere Aspartat-Reste mit dieser Klasse von Enzymen assoziiert (Haigler und Blanton 1996).



**Abb. 1.3:** Schematische Darstellung der Domänen der Cellulose-Synthase der Pflanzen. TMH=Transmembranhelix, CR-P=pflanzenspezifische konservierte Region, CSR=klassenspezifische Region.

Saxena (2001) konnte durch Austausch der Aspartat-Reste in der Cellulose-Synthase von *A. xylinum* zeigen, dass diese Reste für die katalytische Aktivität benötigt werden. In einer *Arabidopsis*-Mutante führte ein Austausch des Aspartates an Position 683 in Asparagin (D683N) zu einer Inaktivierung des Enzyms (Taylor 2000).

### 1.2.3 Zusammenbau des Cellulose-Synthase-Komplexes

Die Dimerisierung von CESA-Untereinheiten stellt möglicherweise den ersten Schritt bei der Anordnung der Rosette dar (Doblin 2002) und findet auf der Außenseite des Golgi-Apparates statt (Saxena und Brown 2005). Die Rosetten werden anschließend über Exozytose zur Plasmamembran exportiert (Haigler und Brown 1986).

Die Expression der N-terminalen Domäne des CESA1-Proteins von *Gossypium hirsutum* (Gh) in *Escherichia coli* resultierte in einem rekombinanten Protein, das Zink (Zn) bindet (Kurek 2002). Mit Hilfe des Dihybridsystems der Hefe wurde gezeigt, dass die Zn-Domäne von GhCESA1 sowohl mit sich selbst als auch mit GhCESA2 interagiert. Diese Beobachtung suggeriert, dass die Zn-Domäne an der Dimerisierung von CESA beteiligt ist. Die GhCESA1 Zn-Domäne komplexiert im reduzierten Zustand zwei Zn-Ionen und existiert als Monomer. Über intermolekulare Disulfidbrücken der Cystein-Reste kann diese Domäne nach Oxidation Dimere bilden. Die Tatsache, dass reduzierende Bedingungen in Baumwollfasern zu einer partiellen Disassemblierung, aber nicht zur vollständigen Monomerisierung führen, lässt vermuten, dass an der Zusammenlagerung der Rosette ebenfalls andere Interaktionen beteiligt sind. Diese Vermutung wird durch die Tatsache bestätigt, dass die Zusammenlagerung der Rosette in der *rsw1*-Mutante gestört ist, obwohl die Mutation außerhalb der Zink-Domäne liegt. Es wird vermutet, dass die Rosetten eine relativ kurze Halbwertszeit besitzen. Rudolph *et al.* (1989) beobachteten, dass die Rosetten in der Plasmamembran von *Funaria hygrometrica* in Anwesenheit eines Vesikel-Transport-Inhibitors innerhalb von Minuten dissoziieren. Robinson und Quader (1981) beschrieben, dass die Cellulose-Synthase Komplexe von *Oocystis* eine Halbwertszeit von weniger als vier Stunden besitzen. Jacob-Wilk *et al.* (2006) bestätigten diese Ergebnisse und zeigten, dass nach einer kompletten Inhibierung der Proteinsynthese mit dem Antibiotikum Cycloheximid das CESA-Protein von *G. hirsutum* mit einer Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten abgebaut wurde und nach weniger als vier Stunden überhaupt nicht mehr detektiert werden konnte. Im Vergleich zu CESA zeigten andere Membranproteine diesen schnellen Durchsatz nicht. Jacob-Wilk *et al.* (2006) postulierten weiterhin ein Modell, in dem aktive Cellulose-Synthase-Komplexe CESA in seiner oxidierten Form enthalten, und dass der Durchsatz und der Abbau der Komplexe durch die Einführung eines reduzierenden Zinks durch ein Metallothionin vermittelt wird, gefolgt von der Proteolyse mittels einer Cystein-Protease.

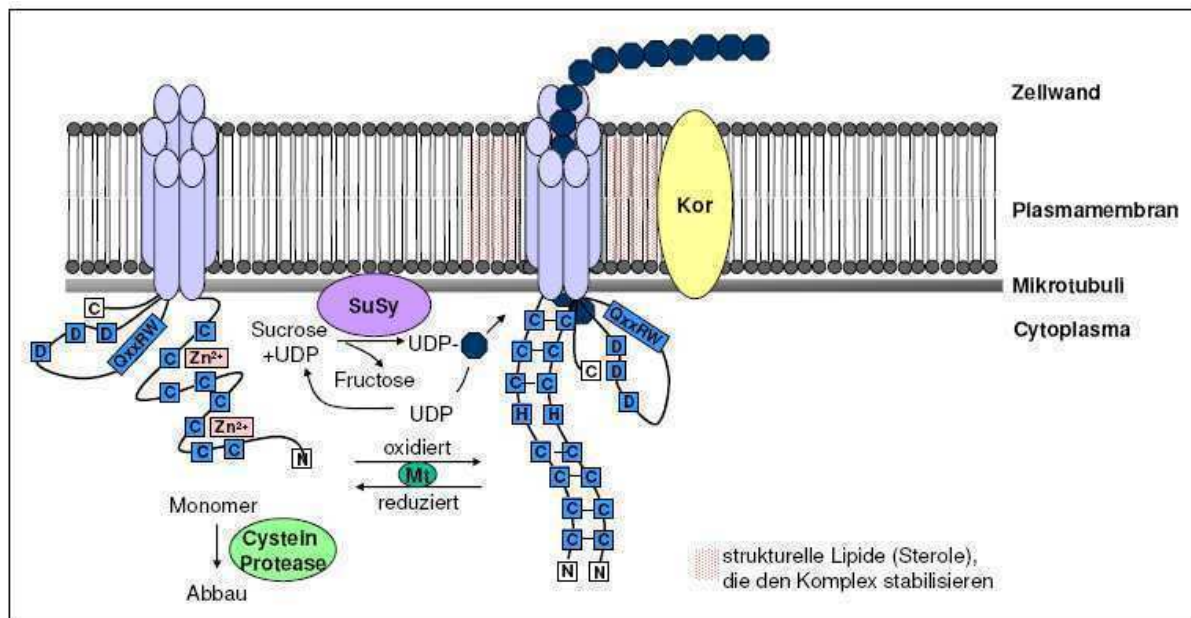
Mit Hilfe des Dihybridsystems wurde gezeigt, dass ein Metallothionin mit der Zn-Domäne von GhCESA1 interagiert. Metallothionine sind Redoxproteine und möglicherweise in der Aktivierung bzw. Deaktivierung oder der Regulation der Komplex-Bildung involviert, in dem sie das Zink-Ion an die Zink-Domäne binden oder entfernen (Doblin *et al.* 2002) und somit in den reduzierten bzw. oxidierten Zustand überführen.

In *Arabidopsis* besteht ein aktiver Cellulose-Synthase-Komplex aus einem Heterohexamer von verschiedenen CESA-Genprodukten. Außerdem wird für die Bildung der primären und sekundären Zellwand ein Komplex mit verschiedener CESA-Zusammensetzung benötigt (Mutwil *et al.* 2008). In *Arabidopsis* bilden CESA1, CESA3 und CESA6 einen Komplex, der für die Synthese von Cellulose in der primären Zellwand benötigt wird (Persson *et al.* 2007), während CESA4, CESA7 und CESA8 spezifisch an der Cellulose-Synthese in sekundären Zellwänden beteiligt sind (Taylor 2000 und 2003). Microarrays zeigten, dass die Produkte dieser drei Gene koreguliert werden (Brown 2005; Persson 2005). Einige der zehn *Arabidopsis* Cesa-Gene sind partiell redundant, so sind Cesa2 und Cesa5 partiell redundant mit Cesa6 (Desprez 2007). Cesa9 wird dagegen ausschließlich in Pollen und Embryonen exprimiert.

#### **1.2.4 Mögliche Interaktionspartner der Cellulose-Synthase**

Bis *dato* wurden verschiedene Proteine identifiziert, die wahrscheinlich mit der Cellulose-Synthase assoziiert sind oder für die Biosynthese von Cellulose benötigt werden. Sowohl in Pflanzen als auch in Bakterien wird eine Cellulase für die Synthese von Cellulose benötigt (Somerville 2006). Im Cellulose-Synthase-kodierenden Operon von *A. tumefaciens* und einer Reihe weiterer Bakterien wurde ein Gen, das für eine Endoglukanase kodiert, gefunden (Matthysse *et al.* 1995; Römling 2002). Eine membrangebundene Endo-(1,4)- $\beta$ -Glukanase, genannt Korrigan (KOR), wurde ebenfalls in Pflanzen identifiziert (Nicol *et al.* 1998). Mutationen im KOR Gen führen zu einer reduzierten Cellulose-Produktion (Sato *et al.* 2001). Nach der Synthese muss die  $\beta$ -1,4-Glukan-Kette in die Zellwand entlassen werden, wozu möglicherweise die hydrolytische Aktivität der Endoglukanase Korrigan benötigt wird. Eine andere Funktion dieses Proteins könnte die Kontrolle des Grades der Polymerisation der Cellulose-Kette oder die Freisetzung des „Primers“ sein (Molhoj 2002). Peng *et al.* (2002) vermuteten, dass in Pflanzen die Synthese von Cellulose durch Sitosterol- $\beta$ -Glukosid als „Primer“ initiiert wird. Eine weitere Endo- $\beta$ -1,4-Glukanase (SICel19C1), die direkt mit kristalliner Cellulose interagiert, wurde in der Tomate identifiziert (Urbanowicz *et al.* 2007). Ebenfalls wichtig für die primäre Cellulose Synthese ist POM1, auch Chitinase-like 1 (CTL1) genannt, das wahrscheinlich für eine  $\beta$ -1,3-Glukanase kodiert (Mutwil *et al.* 2008). Vermutlich ist diese Glukanase ein fehlerkorrigierendes Enzym für die Cellulose.

Amor *et al.* beschrieben 1995 eine membrangebundene Form der Sucrose-Synthase (SuSy). Zwei Wege führen zur direkten Synthese von UDP-Glukose, dem Substrat der Cellulose-Synthase. Erstens die Spaltung von Sucrose durch die Sucrose-Synthase, wobei UDP-Glukose und Fructose entstehen (Haigler *et al.* 2001). Es wird vermutet, dass SuSy die UDP-Glukose zur Cellulose-Synthase befördert (Somerville 2006). Der zweite Weg führt über die aktive Phosphorylierung von Glukose-1-Phosphat durch die UDP-Glukosepyro-



**Abb. 1.4:** Modell für die Biosynthese von Cellulose in Pflanzen. Die N-terminale Zn-Finger-Domäne kann sowohl als reduzierte oder oxidierte Form vorliegen und mit einem Metallothionein (Mt) und Cystein Proteasen interagieren. Unter reduzierten Bedingungen sind zwei Zink-Ionen komplexiert, unter oxidierten Bedingungen dimerisiert CESA mit sich selbst oder anderen CESA-Proteinen. Die Cellulose Korrigan (Kor), die Sucrose Synthase (SuSy), strukturelle Lipide und Mikrotubuli spielen vermutlich alle eine Rolle in der Synthese von Cellulose (verändert nach Doblin *et al.* 2002).

phosphorylase. Alternativ spaltet die Invertase Sucrose zu Glukose und Fructose, was indirekt zur Synthese von UDP-Glukose führt. Pillonel (1980) zeigte, dass die Cellulose-Biosynthese eher der Sucrose- als der lokalen UDP-Glukose-Konzentration unterliegt. Dies lässt vermuten, dass die Invertase einen regulierenden Einfluss auf die Cellulose-Synthese hat.

Da sich sowohl die katalytische Domäne von CESA als auch das Substrat auf der cytosolischen Seite befinden, muss die wachsende Glukan-Kette durch die Plasmamembran zur Zellwand gelangen. Möglicherweise bilden die acht Transmembrandomänen eine zentrale Pore durch die Membran durch die die Glukan-Kette befördert wird. Andere hypothetische Modelle involvieren eine Flippase oder Porin-ähnliche Proteine für die Translokation der Cellulose-Kette (Bessueille und Bulone 2008).

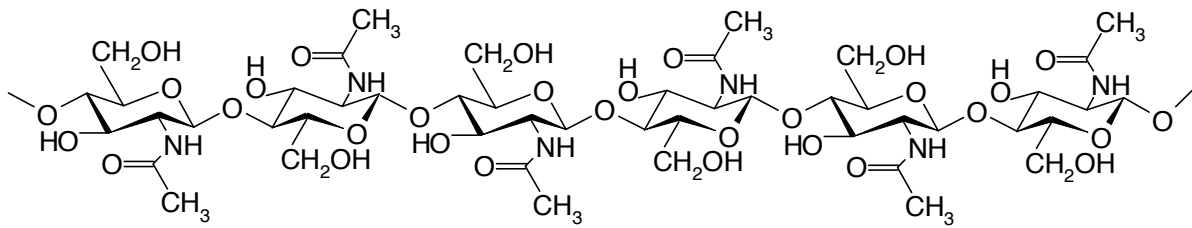
Mutationen in COBRA, das für ein Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankertes Protein kodiert, und KOBITO, das für ein Membranprotein mit unbekannter Funktion kodiert, resultieren ebenfalls in einem reduzierten Cellulose-Gehalt (Roudier *et al.* 2005; Pagant *et al.*

2002). Zu den Proteinen, die mit der Cellulose-Synthase assoziiert sind, zählen weiterhin Annexine (Hofmann 2003), putative Lipidtransferproteine, Metallothioneine, Aktin und Tubulin (Abb. 1.4).

Die Identifikation der Cytoskelett-Proteine stimmt mit vielen Berichten überein, die eine Beteiligung kortikaler Mikrotubuli in der Ausrichtung der Mikrofibrillen vermuten (Lloyd und Chan 2008). Die Zerstörung der Organisation der Mikrofibrillen durch die Anti-Spindelfaser-Droge Colchicin führte zu der Annahme, dass die Spindelfaser eine Rolle bei der Orientierung der Ausrichtung der Cellulose-Mikrofibrillen spielt (Green 1962). Kurz darauf wurden kortikale Mikrotubuli entdeckt, die parallel zu den Mikrofibrillen liegen (Hepler und Palevitz 1974). Es wird vermutet, dass Mikrotubuli entweder als molekulare Schienen dienen, die die Rosetten während der Cellulose-Synthese direkt leiten (Heath 1974) oder als passive Beschränkungen, die Kanäle formen, die die laterale Bewegung des Komplexes abgrenzen, so dass eine Koorientierung von Mikrofibrillen und Mikrotubuli resultiert (Wightman und Turner 2008).

### **1.3 Eigenschaften und Struktur von Chitin**

Chitin ist das häufigste in der Natur vorkommende Aminopolysaccharid. Die Menge an Chitin, die jährlich produziert wird, ist nur eine Größenordnung geringer als die Menge an Cellulose (Merzendorfer 2006). Chitin hat eine ähnliche molekulare Struktur wie Cellulose, mit dem Unterschied, dass der Substituent am C2-Atom der Glukose bei Chitin keine Hydroxylgruppe sondern ein Acetamid ist (Abb. 1.5; Carlstrom 1957). Trotz der daraus resultierenden unterschiedlichen physiochemischen Eigenschaften, erfüllen beide Moleküle eine ähnliche Funktion als strukturelle Komponenten. Chitin festigt hauptsächlich die Zellwände der Pilze (Van Laere und Carlier 1977; Moore und Peberdy 1975; Braun und Calderone 1978) und die Exoskelette von Arthropoden (Turnbull und Howells 1983; Ibrahim *et al.* 2000) und wurde außerdem in Nematoden (Dubinský *et al.* 1986; Harris *et al.* 2000; Veronico *et al.* 2001), Anneliden (Cohen 2001), Mollusken (Weiss *et al.* 2006; Suzuki *et al.* 2007), Oomyceten (Mort-Bontemps *et al.* 1997), *Entamoeba* (Arroyo-Begovich und Carabez-Trejo 1982) und sogar in Knochenfischen (Wagner *et al.* 1993) gefunden. Chitin ist auch in inneren Strukturen von Insekten zu finden. Es stabilisiert die Tracheenkanäle und die Speicheldrüse und kleidet die innere Oberfläche des Darms zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies, Mikroorganismen und mechanischer Schädigung aus (Lehane 1997). Chitin und dessen Derivate werden unter anderem in der Chemie, der Biotechnologie, der Medizin, dem Umweltschutz und der Textilindustrie eingesetzt (Synowiecki und Al-Khateeb 2003).



**Abb. 1.5:** Ausschnitt einer Chitin-Kette. Bis zu 10.000 N-Acetylglucosamine sind  $\beta$ -(1,4)-glykosidisch verknüpft.

Chitin ist ein lineares Polymer aus  $\beta$ -(1,4)-verknüpften N-Acetylglucosaminen (GlcNAc), wobei die Zuckereinheiten, wie bei der Cellulose, gegenüber der benachbarten um  $180^\circ$  gedreht sind (Abb. 1.5). Die einzelnen Chitin-Ketten sind untereinander über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Amino- und der Carbonylgruppe verbunden und assemblieren zu Mikrofibrillen von 3-10 nm Durchmesser und einer Länge von bis zu 2  $\mu\text{m}$  (Merzendorfer und Zimoch 2003). Der Polymerisationsgrad des Chitins liegt bei 5.000-10.000 Monomeren bei Insekten, während das Chitin der Pilze eine Länge von 100-8.000 Zuckereinheiten umfassen kann (Merzendorfer 2006). Chitin kommt in drei verschiedenen kristallinen Formen vor (Rudall und Kenchington 1973; Kramer und Koga 1986). In der  $\alpha$ -Form, die häufigste und stabilste Form, sind alle Ketten antiparallel im Bezug auf das nicht-reduzierende Ende angeordnet, in der  $\beta$ -Form parallel und in der  $\gamma$ -Form wechseln je zwei parallele Stränge mit je einem antiparallelen Strang ab. Das  $\beta$ - und  $\gamma$ -Chitin sind aufgrund der reduzierten Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Chitin-Ketten flexiblere Formen des Chitins und sind z. B. Bestandteil vieler Kokons und peritrophischer Matrices (Merzendorfer 2006).

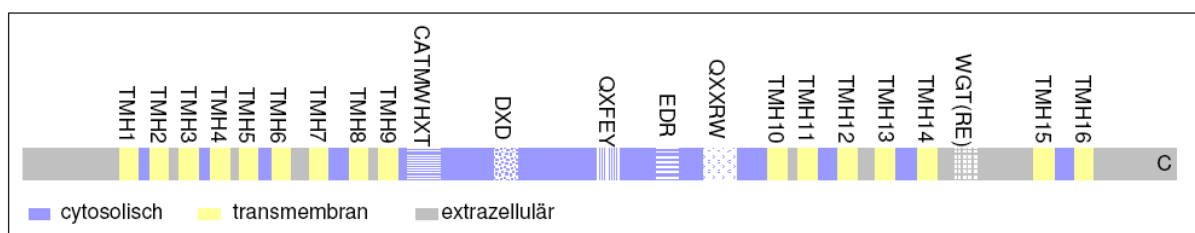
### 1.3.1 Chitin-Synthase

Chitin wird von dem integralen Membranprotein Chitin-Synthase synthetisiert, das wie die Cellulose-Synthase zur Familie zwei der prozessiven  $\beta$ -Glycosyltransferasen (GTF2) gehört (Buckeridge *et al.* 2001). Chitin-Synthase-Gene wurden erstmals in Hefe und filamentösen Pilzen isoliert und sequenziert (Bulawa *et al.* 1986; Yarden und Yanofsky 1991). Erst im Jahr 2000 wurde bei *Lucilla cuprina* das erste Gen für eine Chitin-Synthase von Insekten identifiziert (Tellam 2000). Sieben verschiedene Chitin-Synthase-Gene (CHS), welche in drei verschiedene Klassen unterteilt werden, wurden in Pilzen gefunden (Mellado *et al.* 1995). CHS1 ist für Cytokinese und die Reparatur des Chitin-Netzwerkes nach der Zellteilung verantwortlich, während CHS2 an der Trennung von Mutter- und Tochterzelle und der Bildung des primären Septums beteiligt ist. CHS3 dagegen synthetisiert mehr als 90 % des zellulären Chitins (Roncero 2002). Die Chitin-Synthasen der Insekten werden in nur zwei Gruppen, CHS-A und CHS-B, gegliedert (Arakene *et al.* 2005). Genomanalysen von *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae* und *Caenorhabditis elegans* zeigen, dass

Insekten und Nematoden nur zwei Chitin-Synthase-Gene besitzen, eines von jeder Gruppe (Adams *et al.* 2000; Holt *et al.* 2002; Zhang *et al.* 2005). Genexpressionsstudien in *Tribolium* und *Manduca* zeigten, dass CHS-A ausschließlich in der Epidermis und verwandten ektodermalen Zellen exprimiert wird, während die Expression von CHS-B auf Darmepithelzellen beschränkt ist (Tellam *et al.* 2000; Arakene *et al.* 2004; Hogenkamp *et al.* 2005; Zimoch *et al.* 2005).

### 1.3.2 Struktur der Chitin-Synthase

In Insekten ist die Chitin-Synthase ein transmembranes Protein mit einer Masse von ca. 180 kDa. Es hat eine dreiteilige Domänenstruktur mit einer zentralen katalytischen Domäne, die von zwei Transmembrandomänen flankiert wird (Tellam *et al.* 2000). Die N-terminale Domäne besitzt neun bis zehn Transmembranhelizes und ist nur schwach konserviert (Merzendorfer und Zimoch 2003). Die hochkonservierte katalytische Domäne umfaßt ungefähr 400 Aminosäuren und ist hydrophil. Es wird eine cytosolische Lokalisation der katalytischen Domäne befürwortet (Sentandreu *et al.* 1984), da dies eine ausreichende Versorgung mit Substrat aus dem intrazellulären UDP-GlcNAc-Pool gewährleistet. In den Chitin-Synthasen der Insekten besitzt der C-Terminus sieben Transmembranhelizes, von denen fünf in unmittelbarer Nähe der katalytischen Domäne liegen (Abb. 1.6). In den Chitin-Synthasen der Pilze ist die Anzahl an Transmembranhelizes wesentlich geringer als bei den Insekten (Campos-Góngora *et al.* 2004). Fast alle Chitin-Synthasen besitzen innerhalb der katalytischen Domäne sechs konservierte Regionen, die an der Katalyse beteiligt sind (Kamst und Spaink 1999). Die ersten beiden Domänen, K-( $\beta$ -Faltblatt)-DDGS und R-( $\beta$ -Faltblatt)-GKR, sind an der Bindung von UDP involviert. Die dritte konservierte Region (DXD) stellt zusammen mit der vierten Domäne (QXFEY) die Donor-Saccharid-Binderegion dar, während die fünfte Region (EDR) wahrscheinlich bei der Synthese den Akzeptor-Zuckerrest bindet. An der Bindung des Produktes ist schließlich die sechste Region (QXXRW) beteiligt (Merzendorfer 2006). Ortsgerichtete Mutagenese dieser Aminosäuren in der Chitin-Synthase 2 der Hefe zeigte, dass diese Reste für die Aktivität benötigt werden (Nagahashi 1995).



**Abb. 1.6:** schematische Darstellung der Domänen der Chitin-Synthase von Insekten. TMH=Transmembranhelix.

Sequenz-Vergleiche zwischen verschiedenen Chitin-Synthasen der Pilze führten zur Entdeckung eines zusätzlichen konservierten Motivs (S/T)WGT(K/R) innerhalb der C-terminalen Region, der zumindest bei Pilzen für die *in vitro* Aktivität des Enzyms verantwortlich ist (Cos *et al.* 1998). Substitutionen des Tryptophans und des zweiten Threonins führten zu einem Verlust der Aktivität, weshalb vermutet wurde, dass diese Reste wichtig für die katalytische Aktivität des Enzyms sind (Yabe *et al.* 1984). Sowohl bei den Pilzen als auch bei den Insekten ist diese Domäne im extrazellulären Bereich lokalisiert, und nicht wie die katalytische Domäne im Cytosol. Darum ist eine direkte Involvierung in der katalytischen Aktivität unwahrscheinlich. Cohen (2001) vermutete, dass diese Region an der Translokation des Chitin-Polymers über die Membran beteiligt ist. Die Transmembranhelices könnten dabei einen Kanal bilden, über den die Chitin-Translokation stattfindet.

### 1.3.3 Katalytischer Mechanismus der Chitin-Synthase

In Pilzen existiert die Chitin-Synthase als zymogene Form und wird durch Trypsin oder den „aktivierenden Faktor“, eine Proteinase proteolytisch aktiviert (Ulane und Cabib 1976; Shahabuddin *et al.* 1996). Mittels einer Phosphorylierung-Dephosphorylierung wird die Chitin-Synthase von der inaktiven in die aktive Form überführt und umgekehrt (Suresh und Subramanyam 1997).

Der katalytische Mechanismus der Chitin-Synthase ist noch weitgehend unbekannt. Sicher ist, dass als Substrat UDP-GlcNAc und ein divalentes Kation wie  $Mn^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  benötigt werden (Merz 1999). Möglicherweise sind die konservierten sauren Aminosäurereste der Donor- und Akzeptor-Bindestellen unter physiologischen Bedingungen negativ geladen und spielen dann eine Rolle als Base bei der nucleophilen Substitution, die zur Bildung einer glykosidischen Bindung führt. Die Chitin-Synthase verknüpft GlcNAc-Monomere mit dem nicht-reduzierenden Ende der wachsenden Chitin-Kette (Imai *et al.* 2003), wobei die Polymerisationsreaktion wahrscheinlich über einen kovalent gekoppelten „Primer“ initiiert wird. Auch lösliche „Primer“ wie GlcNAc-Glycolipide oder Chito-Oligomere sind möglich (Merz *et al.* 1999). Sowohl beim Chitin als auch bei der Cellulose sind die aufeinander folgenden Zuckermoleküle gegensätzlich orientiert. Um eine simultane Polymerisation zu ermöglichen, benötigt diese Orientierung der Zuckereinheiten zwei aktive Zentren in unmittelbarer Nachbarschaft. Übereinstimmend zu diesem Mechanismus zeigten Experimente mit Chitin-Synthase-Inhibitoren, die strukturell dimerem UDP entsprechen, eine zehnfach höhere Inhibition als die entsprechenden monomeren Hemmstoffe (Yeager und Finney 2004). Die Bildung des aktiven Zentrums könnte abhängig von der Oligomerisation verschiedener Chitin-Synthase-Moleküle sein. Bislang ist nicht bekannt, ob die Chitin-Synthase als Oligomer oder Monomer arbeitet, aber die Tatsache, dass Oligomerisations-Motive wie „coiled-coils“ konserviert sind, unterstützt eine oligomere Struktur (Merzendorfer



2006). Möglicherweise agiert die Chitin-Synthase ähnlich wie die Cellulose-Synthase erst nachdem Rosetten-ähnliche Superkomplexe gebildet werden.

#### **1.3.4 Lokalisation der Chitin-Synthase**

In Pilzen wurden cytoplasmatische Mikrovesikel, die Chitin-Synthase-Aktivität zeigten, identifiziert (Bracker *et al.* 1976; Ruiz-Herrera *et al.* 1977). Das Vorkommen dieser als Chitosomen bezeichneten Mikrovesikel an den Hyphenspitzen deutet deren Rolle im Transport der Chitin-Synthase an (Sietsma *et al.* 1996). Chitosome sind spezialisierte intrazelluläre Kompartimente mit einer einzigartigen Lipid- und Proteinzusammensetzung (Bracker *et al.* 1976; Hernandez *et al.* 1981). In der Anwesenheit von UDP-GlcNAc und Aktivatoren waren gereinigte Chitosomen von *Mucor rouxii* in der Lage Chitin-Mikrofibrillen zu synthetisieren (Bracker *et al.* 1976). Chitosom-ähnliche Vesikel wurden auch in Insekten identifiziert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der epidermalen Zellen von *Calpodes ethlius* zeigten an den Spitzen der Mikrovilli dicht gefärbte Bereiche, genannt Membranplaques (Binnington 1985). Da diese Plaques nur während der Bildung der Kutikula beobachtet werden konnten, wurden sie als Anhäufung von Chitin synthetisierenden Enzymen aufgefasst (Locke und Huie 1979). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für *Tribolium castaneum* gemacht. Ihre Chitin-Synthase war in zellfreien Präzipitaten von Rohextrakten in der Lage Mikrofibrillen zu synthetisieren, die mit Partikeln von 50-250 nm Durchmesser assoziiert waren (Cohen 1982). Die Chitosomen stammen vom endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat und enthalten zymogene Chitin-Synthase. Die Chitosomen fusionieren möglicherweise mit der Plasmamembran und die Chitin-Synthase-Einheiten werden proteolytisch aktiviert. Die Chitin-Synthase Isoformen Chs1p und Chs3p von *S. cerevisiae* sind zwischen der Plasmamembran und den Chitosomen verteilt, die daher möglicherweise als endosomales Reservoir für diese Enzyme dienen (Ziman *et al.* 1996).

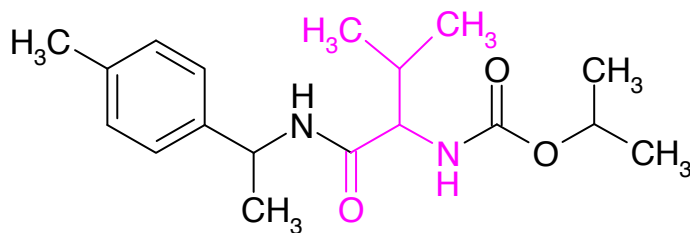
Die Chitin-Synthasen sind in Insekten nicht wahllos angeordnet, sondern existieren in Clustern innerhalb der Plasmamembran. Wie bei der Cellulose-Synthase ist das Cytoskelett möglicherweise für den Transport der Chitin-Synthasen notwendig. Zerstörung der Mikrotubuli durch Colchicin führte in Insekten zu einer Inhibierung der Chitin-Synthase.

#### **1.4 Bekämpfung von *P. infestans***

Im späten 19. Jahrhundert wurde eine Kupferkalkbrühe zur Bekämpfung von *P. infestans* eingesetzt (Millardet 1885; Ayres 2004). Die Einführung organischer Wirkstoffe eröffnete neue Möglichkeiten. Heute sind mehrere Wirkstoffe für die Bekämpfung von Oomyceten auf dem Markt erhältlich, zu denen Iprovalicarb, Dimethomorph und Metalaxyl zählen.

### 1.4.1 Iprovalicarb

Iprovalicarb ([2-methyl-1-[1-(4-methylphenylethylaminocarbonyl)propyl]carbaminosäureisopropylester) gehört zur chemischen Klasse der Aminosäureamidcarbamate (Seitz *et al.* 1999), wobei die Aminosäure Valin ist (Abb. 1.7). Iprovalicarb ist ein Oomyceten-spezifischer Wirkstoff, welcher 1998 von der Bayer AG unter dem Handelsnamen Melody in Mischung mit anderen Wirkstoffen auf dem internationalen Markt eingeführt wurde.

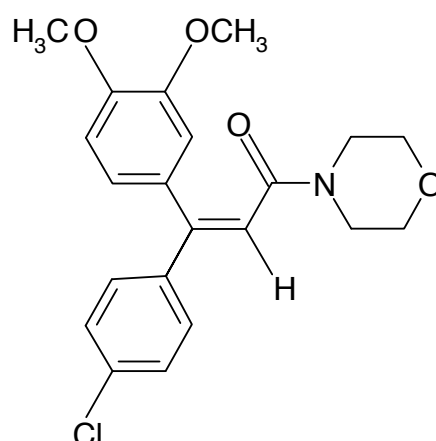


**Abb. 1.7:** Strukturformel von Iprovalicarb. Die Aminosäure Valin ist farbig hervorgehoben.

Iprovalicarb wird gegen eine große Anzahl von Pathogenen aus der Klasse der Oomyceten (Dutzmann 1999), wie zum Beispiel gegen *P. infestans* im Kartoffel- und Tomatenanbau und *Plasmopara viticola* im Weinbau eingesetzt, und zeigt Wirkung bei allen Entwicklungsstadien (Suty und Stenzel 1999). Es inhibiert sowohl das Wachstum des Keimschlauches von Zoosporen und Sporangien und das Wachstum des Myzels, als auch die Sporulation (Jende *et al.* 1999). Iprovalicarb zeigt sowohl protektive als auch kurative und eradikative Eigenschaften (Suty und Stenzel 1999) und besitzt ein ausgezeichnetes toxikologisches und ökologisches Profil, da es schnell abgebaut wird und Nützlinge nicht schädigt (Tiemann und Pflüger 1999).

### 1.4.2 Dimethomorph

Dimethomorph (4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-acryloyl]-morpholin) wurde 1988 von Celamerck als neues systemisches Oomycetizid vorgestellt (Cohen *et al.* 1995).

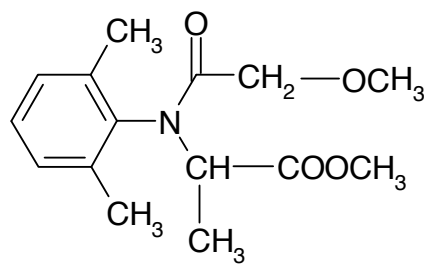


**Abb. 1.8:** Strukturformel von Dimethomorph.

Dimethomorph (Abb. 1.8), welches heute von BASF vertrieben wird, ist ein Zimtsäure-Derivat (Stein und Kirk 2004) mit einer hohen Spezifität für Mitglieder der Peronosporaceae (Hengel und Shibamoto 2000). Es besitzt sowohl protektive als auch kurative sowie antisporulative Wirkungen (Grayson *et al.* 1995) und wird vor allem gegen den falschen Mehltau (*P. viticola*) im Weinbau und gegen *P. infestans* eingesetzt (Grayson *et al.* 1996).

### 1.4.3 Metalaxyl

Das Phenylamid Metalaxyl (Abb. 1.9) ist ein systemischer Wirkstoff und kontrolliert Krankheiten die durch Peronosporales verursacht werden (Fisher und Hayes 1982). Es zeigt sowohl gute protektive als auch kurative und eradikative Eigenschaften (Runno und Koppel 2006). Metalaxyl inhibiert die Sporulation und das Myzel-Wachstum innerhalb des Wirtsgewebes, hat aber nur geringen Einfluss auf die Keimung von Sporangien oder Zoosporen (Lee *et al.* 1999).



**Abb. 1.9:** Strukturformel von Metalaxyl.

Metalaxyl inhibiert selektiv die rRNA-Synthese, indem es die Aktivität der RNA-Polymerase 1 behindert (Sukul und Spiteller 2000). Metalaxyl inhibiert in einem geringeren Maß auch die Synthese von tRNA und poly(A)<sup>+</sup>-RNA (Wollgiehn *et al.* 1984).

### 1.4.4 Vorhergehende Studien zum Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph

Obwohl in den letzten Jahren intensive Forschungen betrieben wurden, ist der biochemische Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph noch weitgehend unbekannt.

In Bayer-internen Studien zum Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb wurde gezeigt, dass der Wirkstoff keinen signifikanten Effekt auf ein spezifisches Target innerhalb der Lipidbiosynthese oder im Nucleinsäurestoffwechsel zeigt und ebenfalls keinen Einfluss auf die mitochondriale Atmung ausübt. Sowohl Iprovalicarb als auch Dimethomorph bewirkten ähnliche morphologische Veränderungen an Hyphen von *P. infestans*. In Studien von Jende (2001), die sich auf morphologische Veränderungen der Keimschläuche und der Hyphen konzentrierte, wurden nach der Behandlung mit Iprovalicarb oder Dimethomorph perlschnurartige Einschnürungen der Hyphen, globulär verdickte Hyphenspitzen sowie eine

partielle Lyse der Zellwände beobachtet. Dennoch konnte gezeigt werden, dass beide Wirkstoffe unterschiedlich in die Struktur der Zellwand eingreifen. Eine Behandlung mit Iprovalicarb veränderte die Anfärbarkeit von Mono- und Polysacchariden in den Zellwänden, was nach einer Dimethomorph-Behandlung nicht beobachtet wurde. Auch Aktin- und Tubulin-Strukturen wurden durch eine Iprovalicarb-Behandlung deutlich beeinträchtigt, während eine Behandlung mit Dimethomorph keinen Effekt zeigte (Jende *et al.* 2001).

Beide Wirkstoffe verursachten eine Verdickung der Zellwand, wobei sich die Markierungsdichte für Cellulose nach einer Behandlung mit Iprovalicarb, nicht jedoch nach einer Dimethomorph-Behandlung, signifikant erhöhte. Außerdem zeigten mikroskopische Studien regenerierender und auskeimender Protoplasten in Gegenwart von Iprovalicarb deutliche Veränderungen der Zellwandstruktur (Mehl und Buchenauer 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass Iprovalicarb und Dimethomorph die Encystierung der Zoosporen inhibieren, wird vermutet, dass der Wirkort beider Wirkstoffe im Bereich der Zellwandsynthese liegt (Cohen *et al.* 2007).

## 1.5 Zielsetzung

Mit Iprovalicarb und Dimethomorph stehen zwei Oomyceten-spezifische Wirkstoffe mit bisher unbekanntem Wirkungsmechanismus zur Bekämpfung wichtiger Pflanzenpathogene zur Verfügung. Für den optimalen Einsatz der Präparate ist ein besseres Verständnis der Wirkweise der Präparate hilfreich.

Da der Wirkort von Iprovalicarb und Dimethomorph nach den vorhergehenden Studien im Bereich der Zellwandsynthese vermutet wird, sollten im Rahmen dieser Arbeit Antikörper gegen verschiedene Domänen der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase hergestellt werden, um anschließend mittels Immunofluoreszenzmikroskopie die Lokalisation und Verteilung beider Enzyme nach einer Behandlung mit Iprovalicarb und Dimethomorph zu detektieren.

Des Weiteren sollte eine quantitative und qualitative Analyse der Proteome von unbehandelten und in Gegenwart von Wirkstoff angezogenen *P. infestans*-Kulturen Aufschluss über den Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph liefern.

Im Hinblick auf die evolutionäre Herkunft der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Gene im Kontext der sekundär nicht-photosynthetischen Lebensweise von *P. infestans* sollten diese Gene phylogenetisch analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

β-Mercapthoethanol	Roth	Imidazol	Acros Organics
Aceton	Normapure	Iodacetamid	Sigma
Acetonitril	Merck	IPTG	Roth
Agarose	Cambrex	Isoamylalkohol	Merck
Agarose-M	Amersham	Isopropanol	Merck
Ameisensäure	Roth	Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Ammoniumbicarbonat	Roth	Luminol	Sigma
Ammoniumperoxidisulfat	Merck	Magermilchpulver	Sucofin
ATP	Sigma	Magnesiumchlorid	Sigma
Bacto™ Agar	DIFCO	Magnesiumsulfat	Aldrich
Bacto™ Hefe-Extrakt	DIFCO	Manganchlorid	Roth
Bacto™ Trypton	DIFCO	Methanol	Roth
Borsäure	J.T.Baker	Natriumacetat	Acros Organics
Bradford-Reagenz	BioRad	Natriumchlorid	J.T.Baker
Bromphenolblau	Roth	Natriumdeoxycholat	Sigma
BSA	Serva	Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Calciumcarbonat	J. T. Baker	Natriumfluorid	Sigma
Calciumchlorid	Acros Organics	Natriumhydroxid	Merck
CHAPS	Roth	Natriumhypochlorid	Roth
Chloroform	Merck	Natriumpyrophosphat	Sigma
Coomassie Brilliant Blau	Merck	Ni-NTA-Agarose	Qiagen
DryStrip Cover Fluid	Plusone	Octyl-β-D-Glucopyranoside	Sigma
Dikaliumhydrogenphosphat	Merck	Para-Hydroxycoumarinsäure	Sigma
Dimethylformamid	Riedel de Haën	Phenol	Roth
Dimethylsulfoxid	Roth	PMSF	Fluka
DEPC	Roth	Ponceau S	Fluka
dNTPs	Amersham	Protease-Inhibitor-Mix	Sigma
Dodecyl-β-D-Maltoside	Biomol	Rotiphorese Gel 30	Roth
DTT	ICN Biomedicals	Saccharose	J.T.Baker
EDTA	Merck	Salzsäure	Riedel de Haën
Essigsäure	Roth	SDS	Roth
Ethanol absolut	Riedel de Haën	TEMED	Roth
Ethidiumbromid	Roth	Thioharnstoff	Merck
Filipin	Sigma	Trichloressigsäure	Roth
Formaldehyd	Sigma	Tris	Sigma
Formamid	J.T.Baker	Triton X-100	Roth
Gemüsesaft	Krings	Tween 20	Fluka
Glycin	Acros Organics	Wasserstoffperoxid	Merck
Glycerin	Roth	X-Gal	ICN Biomedicals
Glycerophosphat	Fluka	Xylencyanolblau	Merck
Harnstoff	J.T.Baker		

#### 2.1.2 Antibiotika

Ampicillin	Sigma
Tetracyclin	Boehringer Mannheim GmbH
Kanamycin	Sigma

#### 2.1.3 Antikörper

His-Tag® Monoclonal Antibody, mouse monoclonal antibody IgG<sub>1</sub>, 5 × His (Novagen)

ImmunoPure®, Goat, Anti-Mouse IgG, Peroxidase conjugated (PIERCE)

Anti-Rabbit IgG, Peroxidase conjugated (Sigma)

alexa fluor® 488, Goat, Anti-Rabbit IgG (H+L), (Invitrogen)

Monoclonal Anti-Actin, Clone AC-40, Purified Mouse Immunoglobulin (Sigma)

Anti-human  $\alpha$ -Tubulin, mouse monoclonal antibody IgG<sub>1</sub>, (Cedarlane® Laboratories)

## 2.1.4 Enzyme

### 2.1.4.1 Restriktionsenzyme

<i>Bam</i> HI	Fermentas	<i>Hin</i> CI	Fermentas
<i>Eco</i> RI	Fermentas	<i>Xho</i> I	Roche

### 2.1.4.2 Weitere Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fermentas	Lysozym	Serva
Cellulase Onozuka R-10	Serva	Polynukleotidkinase	Fermentas
Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i>	Sigma	Proteinase K	Roche
DNAse	Roche	RNase A	Promega
Driselase	Sigma	Triple Master Mix	Eppendorf
Klenow-Fragment	Fermentas	T4 DNA-Ligase	Fermentas
Lysing Enzymes	Sigma	Trypsin	Promega

## 2.1.5 Geräte

$\beta$ - $\gamma$ -Detektor	EG&G Berthold
Autoklav	Fedegari
Biofuge Fresco: Rotor 3325	Heraeus
Destille	Fissons
Eismaschine	Ziegra
Elektroblot Novablot Multiphor II	Pharmacia Biotech
Eppendorfschüttler	Eppendorf
ESI-Qq-TOF-MS/MS	Applied Biosystems QSTAR XL
Ettan IPGphor IEF Einheit	GE Healthcare
Feinwaage BP 61	Sartorius
Gelelektrophoresekammern der Serie Sub-Cell GT	Bio-Rad
Global IR <sup>2</sup> DNA Sequenzer	Lic-Cor Biosciences
Heizblock	HLC
Hoefer-Kammer	Hoefer
Inkubatoren	Heraeus
Magnetrührer IKA	Labortechnik
Megafuge 1.0R: Rotor 7075	Heraeus
Mikroliter Pipette P2, P20, P100, P200, P1000	Gilson
Mikroskop Axiophot	Zeiss
Mikrowelle Quick Cookmate	Daewoo
PCR Gerät Primus 25	PeqLab
pH-Meter	Schot
Power Supplier Power Pac 300	Bio-Rad
Schüttelinkubator	GFL
Sterilbank	HerLamin Air HLB 2472
Thermocycler Primus 96 Plus	(MWG)
Transilluminator	LTF Labortechnik
Ultraschallbad	VWR
Ultrazentrifuge	Beckman
UV/VIS Spektrophotometer Ultraspec 2000	Amersham Biotech
Vortex REAX top	Heidolph
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifuge Superspeed RC 5B Plus	Sorvall

### 2.1.6 Reagenzsätze

NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel
SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase Kit	Fermentas
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega
DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	PIERCE

### 2.1.7. Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

**Tabelle 2.1:** verwendete Oligonukleotide

	Name	Sequenz	T <sub>m</sub>
1	M13 (24) For	5'-IRD700 CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'	67,8°C
2	M13 (24) Rev	5'-IRD800 AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'	59,3°C
3	CesAforBam	5'-CCG CCG CCG ATC CAT GGA TAC TCG CGC CAG CAA GAT-3'	74,4°C
4	CesArevXho	5'-CGC CCT CGA GCT TCC ACT CCG GGT CAA AGT AC-3'	74,6°C
5	CesBforBam	5'-CCG CCG CCG ATC CAT GTC CCG CCC GAA GGT TGT GAA-3'	75,7°C
6	CesBrevXho	5'-CGC CCT CGA GGT TGG GCT TGC GGT ACT TTG G-3'	74,8°C
7	CesCforEco	5'-CCG CGA ATT CAT GTT CCT GGG TCT GCT ATT CAA C-3'	70,7°C
8	CesCrevXho	5'-CGC CCT CGA GCC GTG TAG GCA TCT TCT GTC TGG-3'	75,7°C
9	CesDforEco	5'-CCG CGA ATT CAT GCG TCT CGC TGA AGG TGC TGT GC-3'	75,3°C
10	CesDrevXho	5'-CGC CCT CGA GCT TGT TGA TCT TGC GCT TTG G-3'	72,2°C
11	ChiS1forBam	5'-CCG CCG CCG ATC CAT GTT CGC TCT AAA GGA GAG C-3'	72,2°C
12	ChiS1revXho	5'-CGC CCT CGA GTG TGC GAG CGA CCG CGT CCT TG-3'	78,5°C
13	ChiS2forBam	5'-CCG CCG CCG ATC CAT GAC TAG CAA AGG TTT CGA GAC-3'	71,9°C
14	ChiS2revXho	5'-CGC CCT CGA GAA TAG CTT CCA TGT AGT CTA G-3'	69,5°C

### 2.1.8 Vektoren

**Tabelle 2.2:** verwendete Vektoren

Nr.	Name	Beschreibung
1	pBluescript SK(+), Promega	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenzgen und Blau-Weiß-Selektion
2	pGEM-T Easy, Promega	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor mit Ampicillin-Resistenzgen und Blau-Weiß-Selektion
3	pET28a(+), Novagen	<i>E. coli</i> Expressionsvektor mit Kanamycin-Resistenzgen, vermittelt N- und C-terminalen His-Tag

## 2.2 Verwendete Kulturen

### 2.2.1 *Phytophthora infestans*

Alle Untersuchungen wurden mit *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln und der Fruchtfäule bei Tomaten durchgeführt.

## 2.2.2 *Escherichia coli*

**XL1-Blue MRF<sup>+</sup>** (Stratagene)  $\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$

**BL21(DE3)** (Invitrogen) F' ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub><sup>-</sup>)gal dcm(DE3)

## 2.3 Wirkstoffe

### 2.3.1 Iprovalicarb

Iprovalicarb ([2-methyl-1-[1-(4-methylphenyl)-ethylaminocarbonyl]-propyl]-carbaminosäure-isopropylester) gehört zur chemischen Klasse der Aminosäure-amidcarbamate und ist ein systemischer Wirkstoff gegen Oomyceten, der von der Bayer AG entwickelt wurde.

### 2.3.2 Dimethomorph

Dimethomorph (4-[3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-acryloyl]-morpholin) ist ein Vertreter der chemischen Klasse der Zimtsäurederivate, der von der Cyanamid Forschung GmbH entwickelt wurde und gegen Oomyceten eingesetzt wird.

### 2.3.3 Metalaxyl

Metalaxyl [Methyl-N-(2-methoxyacetyl)-N-(2,6-xylyl)-DL-alaninat] gehört zur chemischen Klasse der Phenylamide und wird zur Bekämpfung von Oomyceten eingesetzt. Der Wirkstoff wurde von der Ciba-Geigy GmbH entwickelt.

## 2.4 Methoden

### 2.4.1 Haltung von *Escherichia coli*

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte nach Standardprotokollen nach Sambrook *et al.* (1989). *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> bzw. BL21(DE3) Zellen einer Glycerin-Dauerkultur wurden mit Hilfe einer Impföse auf eine LB-Agarplatte [1% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt; 0,5% (w/v) NaCl; 2% (w/v) Agar] mit dem entsprechenden Antibiotikum (XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Tetracyclin 12,5 mg/l) ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37°C inkubiert, dann mit Parafilm verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

Das entsprechende Volumen LB-Medium wurde mit einer einzelnen *E. coli*-Kultur angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator angezogen.

Zur Kontrolle der Transformation wurden die *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (0,1 mg/ml), X-Gal (0,1 mM) und IPTG (0,2 mM) angezogen.

### 2.4.2 Haltung von *P. infestans*



Sämtliche Untersuchungen wurden mit *P. infestans* (Mont.) de Bary durchgeführt. Die Anzucht von *P. infestans* erfolgte auf Gemüsesaftagar [20% (v/v) Gemüsesaft; 0,24% (w/v) CaCO<sub>3</sub>; 2% (w/v) Agar] bei Raumtemperatur im Dunkeln. Zur Pathogenerhaltung wurde wöchentlich eine Myzelflocke einer sieben Tage alten Kultur auf eine frische Platte übertragen. Für die Myzelproduktion wurden je 20 ml Medium mit 250.000 Zoosporangien beimpft. Um eine Zoosporangiensuspension zu erhalten, wurde das Myzel einer sieben bis acht Tage alten Kultur in sterilem Leitungswasser suspendiert und anschließend durch mehrere Lagen Nylonnetz filtriert. Eine zweistündige Inkubation bei 4°C regte die Zoosporen zum Schlüpfen an.

#### **2.4.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die aromatischen Basen der DNA und RNA besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Somit kann eine Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm erfolgen. Dabei entspricht 1 OD<sub>260</sub> einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA oder 40 µg RNA pro ml (Sambrook *et al.*, 1989).

Proteine absorbieren mit einem Maximum bei 280 nm, während Polysaccharide ein Absorptionsmaximum bei 230 nm besitzen. Somit kann aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 230, 260 und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäurelösung abgeschätzt werden. Für eine reine Nukleinsäurelösung liegt das Verhältnis von OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bei 1:2:1.

Die Konzentrationsbestimmungen wurden am Pharmacia Biotech Ultraspec 2000 UV/VIS Spectrophotometer durchgeführt.

#### **2.4.4 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakteriensuspension**

Die Zellzahl einer Bakteriensuspension wurde durch die Lichtstreuung mit Hilfe des Photometers bestimmt, wobei die Absorption der Bakterien gegen das reine Medium als Leerwert bei 600 nm gemessen wurde. Dabei entspricht 1 OD<sub>600</sub> einer Zellzahl von ca.  $8 \times 10^8$  *E.coli*-Zellen pro ml Suspension.

#### **2.4.5 Gelelektrophorese von DNA**

Die Gelelektrophorese von DNA wurde nach Standardprotokollen von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. DNA-Fragmente wurden in 1-2%igen Agarosegelen getrennt. Die Ethidiumbromid-Konzentration im Gel betrug 10 µg/100 ml Puffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6 × Ladepuffer [10 mM Tris-HCl pH 7,6; 60% (v/v) Glycerin; 60 mM EDTA; 0,03% (w/v) Bromphenolblau; 0,03% (w/v) Xylencyanolblau] versetzt. Zusätzlich wurden 0,5 µg eines Größenstandards (GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1 × TAE-Puffer (50 × TAE; 2 M Tris-HCl; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA pH 8,0). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm

Elektrodenabstand in einer horizontalen Sub-Cell GT Flachbettkammer (Bio Rad) durchgeführt.

## **2.4.6 Reinigung von Nukleinsäurelösungen**

### **2.4.6.1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion**

Proteine wurden durch Ausschütteln mit gepuffertem Phenol aus Nukleinsäurelösungen beseitigt. Die Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol [25:24:1(v/v/v)] versetzt und gründlich geschüttelt. Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 16.300 *g* wurde die Trennung der wässrigen und der organischen Phase beschleunigt. Um alle Proteine zu entfernen, wurde der Phenolisierungsschritt wiederholt (Sambrook *et al.*, 1989).

### **2.4.6.2 Präzipitation von Nukleinsäuren**

Zur Präzipitation von Nukleinsäuren wurde die Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat pH 6,5 und zwei Volumen eiskaltem absolutem Ethanol oder ein Volumen Isopropanol versetzt. Die Fällungen erfolgten für mindestens eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Nukleinsäuren wurden durch eine Zentrifugation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 16.060 *g* für 30 Minuten sedimentiert und das Sediment mit 70% Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen (Sambrook *et al.* 1989).

## **2.4.7 RNA-Isolierung**

Für Arbeiten mit RNA wurden alle Lösungen mit DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt, um den Abbau der RNA durch RNasen zu verhindern. Plastik- und Glasgefäße, sowie Mörser, Spatel etc. wurden mit 13% Natriumhypochlorid gereinigt und anschließend autoklaviert.

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin RNA II Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers.

## **2.4.8 Erststrang-cDNA-Synthese**

Die Erststrang-cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des „SuperScript II RNase H- Reverse Transcriptase Kit“ von Invitrogen nach Angaben des Herstellers. Dabei wurden 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA und 0,5  $\mu\text{g}$  Oligo(dT)<sub>18</sub>-Oligonukleotide eingesetzt.

## **2.4.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR wurde mit 50 ng cDNA als Matrize und einer Oligonukleotidkonzentration von 2  $\mu\text{M}$  in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Der Ansatz enthielt 2 mM Magnesiumacetat; 0,25 mM je dNTP und einen Polymerase-spezifischen Puffer. Der High-

Fidelity-Puffer wurde zur Amplifizierung von Fragmenten, die kleiner als 500 bp sind, verwendet. Der Tuning-Puffer dagegen wurde bei Amplifikationen größerer Fragmente eingesetzt. Um unspezifische Amplifikationen zu vermeiden, wurde eine Hot-Start-PCR durchgeführt. Dabei wurde der Triple Master Polymerase-Mix von Eppendorf (1 Unit) erst nach Erwärmung des Ansatzes hinzu pipettiert. Die PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler Primus 25 (PeqLab) durchgeführt. Nach einer anfänglichen Denaturierung von zehn Minuten bei 98°C wurden 30 Zyklen von einer Minute bei 95°C, einer Minute bei 68°C und 75 Sekunden bei 72°C durchgeführt. Es folgten weitere zehn Minuten bei 72°C. Anschließend wurden die Reaktionen auf einem Agarosegel kontrolliert (siehe 2.4.5).

#### **2.4.10 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter langwelligem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ von Qiagen nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix gereinigt.

#### **2.4.11 Enzymatische Modifikationen von DNA**

##### **2.4.11.1 Ligation in pGEM<sup>®</sup>-T Easy**

Die Ligation in den Vektor pGEM<sup>®</sup>-T Easy wurde mit Hilfe des Kit „pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems“ von Promega nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

##### **2.4.11.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren**

Alle Ligationen wurden mit 100 ng Vektor, 1 × T4 DNA-Ligase-Puffer und 5 U T4 DNA-Ligase in einem Volumen von 15 µl durchgeführt. Das Insert wurde in einem Verhältnis zum Vektor von 10:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C im Kryostaten.

##### **2.4.11.3 Dephosphorylierung von DNA**

Vektoren wurden für die Ligation mit glatten Enden in der multiplen Klonierungsstelle mit *HincII* geschnitten und mit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA für eine Stunde bei 37°C mit 1 U Calf Intestine Alkaline Phosphatase inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen für 15 Minuten bei 85°C gestoppt.

##### **2.4.11.4 Phosphorylierung von DNA**

Für die Ligation mit glatten Enden wurde das PCR-Amplifikat durch die Polynukleotidkinase phosphoryliert und mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt.

Die Phosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde nach Zugabe von 10 mM ATP und 5 U Polynukleotidkinase pro  $\mu\text{g}$  DNA für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Das Enzym wurde durch Inkubation für zehn Minuten bei 70°C in aktiviert.

#### **2.4.11.5 Glätten von 5'-Überhängen der DNA**

Das Auffüllen von 5'-Überhängen erfolgte durch Zugabe von 2 U Klenow-Fragment pro  $\mu\text{g}$  DNA und den Desoxyribonukleotiden in Endkonzentrationen von je 0,25 mM. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37°C wurde das Enzym durch Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  0,5 M EDTA gestoppt.

#### **2.4.11.6 Restriktion von DNA**

Restriktionsspaltungen wurden in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$ , mit dem für das Enzym entsprechenden Puffer, durchgeführt, wobei je 1-5 Units Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt wurden. Die Restriktionen wurden zwei Stunden bei 37°C durchgeführt.

#### **2.4.12 Präparation von kompetenten *E.coli*-Zellen**

5 ml LB-Medium wurden mit 50  $\mu\text{l}$  einer Glycerin-Dauer-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 50 ml LB-Medium auf 37°C vorgewärmt und dann mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden auf dem Schüttler bei 37°C und 200 rpm angezogen bis eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 erreicht war. Dann wurden die Zellen für 60 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend durch eine 15minütige Zentrifugation bei 4.000  $g$  und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 25 ml eiskaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  vorsichtig durch Schwenken resuspendiert. Die Zellen wurden erneut für 60 Minuten auf Eis inkubiert und wie zuvor sedimentiert. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 100 mM  $\text{CaCl}_2$  vorsichtig resuspendiert. Dann wurde 15% (v/v) Glycerin zugegeben, gut gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zu je 100  $\mu\text{l}$  in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.4.13 Hitzeschock-Transformation von *E.coli***

100  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen wurden mit 5  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz oder 0,5  $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA gemischt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C wurden die Zellen für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurden 0,9 ml LB-Medium zugegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler regeneriert. Von den transformierten Zellen wurden je 100  $\mu\text{l}$  pro Platte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.14 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Plasmid-Isolierung wurden mehrere Kulturröhrchen mit je 5 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) mit je einer einzelnen Kolonie angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 200 rpm auf dem Schüttler angezogen.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Biofuge Fresco von Heraeus bei 16.060 g durchgeführt. 1,5 ml der Übernachtskultur wurden durch eine dreiminütige Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgegossen und das Pellet mit 500  $\mu$ l 10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen. Die Zellen wurden wie zuvor pelletiert und das Pellet in 100  $\mu$ l Lösung 1 (25 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNase) durch Vortexen resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde durch Zugabe von 200  $\mu$ l Lösung 2 [200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS] die alkalische Lyse gestartet. Nach drei Minuten auf Eis wurden 150  $\mu$ l eiskalte Lösung 3 (49,7 g Kaliumacetat; 29,5 ml konz. Essigsäure ad 200 ml H<sub>2</sub>O) zugegeben und somit die Lyse gestoppt. Die Proben wurden fünf Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit zwei Volumen absolutem Ethanol versetzt und für zehn Minuten bei -20°C gefällt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation wurde das Pellet 2  $\times$  mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Die Proben wurden fünf Minuten zentrifugiert, das Pellet an der Luft getrocknet und in 30  $\mu$ l 10 mM Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen.

Für eine Maxi-Plasmid-Präparation wurde das Kit „NucleoBond PC 500“ von Macherey-Nagel verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit 100 ml Übernachtskultur.

#### 2.4.15 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des „DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit“ der Firma Amersham Biosciences nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.* 1977). Die Sequenzierung wird in vier Reaktionsgemischen gleichzeitig durchgeführt. Jeder Ansatz unterscheidet sich nur im jeweiligen 2', 3'-Dideoxynukleotid. Den ddNTP's fehlt am 3'-C-Atom der Ribose die OH-Gruppe, so dass der Einbau eines ddNTP's zu einem Abbruch der PCR-Reaktion führt.

Für Sequenzierungen wurden 2  $\mu$ g Plasmid-DNA in einem Volumen von 18  $\mu$ l eingesetzt. Jeweils 3  $\mu$ l der mit Fluoreszenzfarbstoffen-markierten Oligonukleotide M13 for und M13 rev (je 1 pmol/ $\mu$ l) wurden zu der Plasmid-Probe gegeben. 5,5  $\mu$ l dieses Gemisches wurden in 3  $\mu$ l einer 1:3 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O des jeweiligen Terminationsmixes (0,94 mM dNTP; 250 mM Tris-HCl pH 9,5; 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 3,1  $\mu$ M ddATP bzw. ddCTP bzw. ddGTP bzw. ddTTP; Thermo Sequenase™) überführt. Alle Proben wurden mit 14  $\mu$ l Mineralöl überschichtet. Die Sequenzreaktion wurde im Thermocycler Primus 96 Plus (MWG) durchgeführt. Nach einer anfänglichen Denaturierung von drei Minuten bei 99°C Minuten

wurde die Reaktion in acht Zyklen von einer Minute bei 99°C, fünf Minuten bei 35°C und vier Minuten bei 69°C durchgeführt.

Nach der Reaktion wurden die Proben mit 7  $\mu$ l Stop/Ladepuffer [95% (v/v) Formamid; 10 mM EDTA; 0,1% (w/v) Fuchsin basisch; 0,01% (w/v) Bromphenolblau] versetzt und für drei Minuten bei 70°C denaturiert.

#### **2.4.16 Sequenziergele**

Je 2  $\mu$ l der Sequenzier-Reaktion wurden auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Sequenziergele (2,1 g Harnstoff; 4,66 ml 40% Rapid Gel XL; 5 ml 10  $\times$  TBE; 24 ml H<sub>2</sub>O; 333  $\mu$ l APS; 33  $\mu$ l TEMED) hatten eine Länge von 66 cm und eine Dicke von 0,2 mm. Die Elektrophorese wurde in einem Long Reader 4200 der Firma Li-Cor Biosciences durchgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Spannung von 3000 V, einer Leistung von 75 W, einer Stromstärke von 30 mA und einer Temperatur von 45°C. Der Vorlauf dauerte 30 Minuten, die Auftrennung der DNA-Fragmente 14 Stunden. TBE (90 mM Tris-Borat; 2 mM EDTA) diente als Laufpuffer. Die Oligonukleotide wurden durch einen Infrarot-Laser zur Fluoreszenz angeregt, wodurch die DNA-Fragmente detektiert wurden. So entstanden für jede Probe vier zeitaufgelöste Fluoreszenzspektren, aus deren Überlagerung sich die DNA-Sequenz ergab. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Programmes „e-Seq“ (LiCor Biosciences).

#### **2.4.17 Präparation von *E. coli* Zell-Lysaten und Ni-NTA-Reinigung unter nativen Bedingungen**

Für die heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3) wurde 1 l LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,6 bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Kultur durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach Wachstum für vier Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation (4.000 g, 10 min, 4°C) geerntet. Die pelletierten Zellen wurden bei 4°C eingefroren.

Das Zellpellet wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann in 4 ml Lysispuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol; pH 8,0) pro g Frischgewicht resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschallbehandlung (6  $\times$  10 Sekunden, 10%; 10 Sekunden Pause zwischen den Pulsen) auf Eis. Das Lysat wurde für 30 Minuten bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert und der Überstand mit 1 ml 50% Ni-NTA-Agarose (in Lysispuffer äquilibriert) pro 4 ml Lysat versetzt und für eine Stunde bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Das Lysat-Ni-NTA-Gemisch wurde eine Minute bei 2.000 g zentrifugiert und das Ni-NTA-Pellet zwei Mal mit Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0) gewaschen. Die rekombinanten Proteine wurden 4  $\times$  mit 0,5 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,0) eluiert.

#### **2.4.18 Präparation von *E. coli* Zell-Lysaten und Ni-NTA-Reinigung unter denaturierenden Bedingungen**

Das Pellet einer 50 ml Bakterienkultur wurde mit 4 ml Lysispuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; pH 8,0) pro g Frischgewicht resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 20 Minuten bei 10.000 *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml in Lysispuffer äquilibrierter 50% Ni-NTA-Agarose versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert.

Das Lysat-Ni-NTA-Gemisch wurde eine Minute bei 5.000 rpm zentrifugiert, das Ni-NTA-Pellet zwei Mal mit Waschpuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; pH 6,3) gewaschen und das rekombinante Protein vier Mal mit je 0,5 ml Elutionspuffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; pH 4,5) eluiert.

#### **2.4.19 Isolierung und Aufschluss von Inclusion Bodies**

Das Pelett einer 50 ml Bakterienkultur wurde in 600  $\mu$ l Lösung 1 [50 mM Tris, pH 8,0; 25% (w/v) Saccharose; 1 mM EDTA] resuspendiert und 10 mg/ml Lysozym zugegeben. Der Ansatz wurde zunächst für 30 Minuten und dann nach Zugabe von 83  $\mu$ l Lösung 2 [100 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MnCl<sub>2</sub>; 100  $\mu$ g/ml DNase I; 1% (w/v) Na-Deoxycholat] weitere 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Es wurden 1,5 ml Lösung 3 [20 mM Tris, pH 7,5; 200 mM NaCl; 1% (v/v) Triton X-100] zugegeben, gemischt und zehn Minuten bei 16.060 *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die cytosolischen Proteine enthält, wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml Lösung 4 [0,5% (v/v) Triton X-100; 1 mM EDTA] resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 16.060 *g* für zehn Minuten. Dieser Waschvorgang wurde fünf Mal wiederholt und das Pellet anschließend in 300  $\mu$ l Lösung 5 (10 mM Tris, pH 8; 8 M Harnstoff; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) resuspendiert.

#### **2.4.20 Dialyse von Proteinen**

Die Dialyse von Proteinen erfolgte über Nacht bei 4°C gegen 5 l des entsprechenden Puffers (10 mM Tris, pH 8; 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Am nächsten Morgen wurde erneut gegen frischen Puffer für zwei Stunden dialysiert. Als Dialysemembran dienten die „Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Dialysis-Kassetten“ von der Firma PIERCE. Die Kassetten besaßen eine Ausschlussgröße von 7.000 Da und eine Kapazität von 3-15 ml. Die Proben wurden mit Hilfe der „Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> -5 ml-Spritzen und Nadeln in die Kassette gegeben.

#### **2.4.21 Gewinnung und Reinigung von Antikörpern**

Die Gewinnung von Antikörpern wurde von der Firma Eurogentec (Liège, Belgien) durchgeführt. Die Immunisierung wurde über 87 Tage durchgeführt und als Versuchstiere dienten Kaninchen. Es wurden vier Immunisierungen subcutan am Nacken durchgeführt, wobei die zweite Immunisierung zwei Wochen nach der ersten erfolgte, die dritte weitere zwei Wochen später, während die letzte Immunisierung 56 Tage nach der ersten Immunisierung durchgeführt wurde. Blut zur Kontrolle der Immunantwort wurde direkt vor der ersten Immunisierung und je zehn Tage nach der dritten und vierten Immunisierung entnommen.

Die Reinigung der Antikörper erfolgte mit Hilfe des „Melon<sup>TM</sup> Gel IgG spin Purification“ Kit von PIERCE nach Angaben des Herstellers. Die Reinigung wurde in zwei Schritten vollzogen.

#### **2.4.22 Herstellung eines Protein-Rohextraktes von *P. infestans***

Für die Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus *P. infestans* wurden die Hyphen durch Mörsern aufgeschlossen. Zunächst wurde eine Flüssigkultur durch mehrere Lagen Mull filtriert und das Myzel mehrmals mit Wasser gewaschen, um Rückstände des Mediums zu entfernen. Dann wurde das Myzel in einem vorgekühlten Mörser auf Eis in flüssigem Stickstoff bis zur Homogenität zerkleinert. Der erhaltene Zellextrakt wurde mit 3 ml Aufschluss-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA; 0,2 mM PMSF; 1  $\mu$ l/ml Protease-Inhibitor-Mix, Sigma) pro g Frischgewicht versetzt, gut geschüttelt und für zehn Minuten bei 4°C und 4.000 g in einer Megafuge 1.OR (Roter 7075) Zentrifuge zentrifugiert.

#### **2.4.23 Isolation von Plasmamembranen aus *P. infestans***

Wie in 2.4.22 beschrieben wurde ein Rohextrakt hergestellt und dieser mit 3 ml pro g Frischgewicht TNE-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM NaF; 30 mM Na-Pyrophosphat; 10 mM Glycerophosphat; 150 mM NaCl; 1  $\mu$ l/ml Protease-Inhibitor-Mix, Sigma) lysiert. Das Lysat wurde 30 Minuten bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert und anschließend für zehn Minuten bei 4.000 g und 4°C in einer Beckman Zentrifuge zentrifugiert. Durch eine zweistündige Zentrifugation bei 100.000 g und 4°C im Beckman Rotor Vti50 wurden die Plasmamembranen sedimentiert. Die pelletierten Plasmamembranen wurden in TNE-Puffer mit 2% (v/v) Triton X-100 und 1  $\mu$ l/ml Protease-Inhibitor-Mix resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert.



#### **2.4.24 Präparation Detergenz-resistenter Membranen (DRM) aus *P. infestans***

Die Isolierung von DRM wurde nach einem modifizierten Protokoll von Fiedler *et al.* (1993) durchgeführt.

Für die Präparation von DRM wurden zunächst Proteinrohextrakte hergestellt und Plasmamembranen isoliert (siehe 2.4.22 und 2.4.23), welche anschließend in kaltem TNE-Puffer mit 2% (v/v) Triton X-100 resuspendiert wurden. Die Extraktion erfolgte durch vorsichtiges Schütteln bei 4°C für eine Stunde. Die Triton X-100 solubilisierten Membranen wurden mit  $\frac{3}{4}$  Volumen 60% OptiPrep® Density Gradient Medium (Sigma-Aldrich) gemischt, so dass eine 45%ige Lösung erhalten wurde. Diese Lösung wurde dann mit 35% und 5% OptiPrep® überschichtet und für zwei Stunden im Beckman Rotor Sw50 Ti bei 200.000 *g* für zwei Stunden bei 4°C zentrifugiert. Die DRM, die als weiße Bande an der Grenzfläche zwischen 35% und 5% sichtbar sind, wurden abgenommen und durch Zugabe von 50 mM Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside und 50 mM Dodecyl- $\beta$ -D-Maltoside und durch vorsichtiges Schütteln bei 4°C für eine Stunde solubilisiert. Die Proteine wurden mit Hilfe von „Amicon® Ultra centrifugal filter devices“ der Firma (Millipore) durch Zentrifugation bei 4°C und 2.500 *g* bis zum gewünschten Volumen konzentriert. Die Konzentratoren hatten ein Ausschlussvolumen von 10.000 Da.

#### **2.4.25 Proteinbestimmung nach Bradford**

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford werden Proteine mit dem Farbstoff Coomassie-Blue G250 angefärbt. Der Farbstoff besitzt eine negative Ladung, die mit den positiven Ladungen eines Proteins eine Bindung eingeht. Durch diese Bindung geht der rote Farbstoff in die blaue Form über, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Diese Änderung des Absorptionsverhaltens wird zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen genutzt (Bradford, 1976).

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1–10  $\mu$ l des Proteinrohextraktes mit einer 1:5-Verdünnung des Farbreagenzes (Bio-Rad Protein Assay) auf 1 ml aufgefüllt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei  $\lambda = 595$  nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde durch den Vergleich mit einer Eichgerade, welche mit bekannten BSA-Konzentrationen erstellt wurde, ermittelt. Die Messungen wurden mit Hilfe der Software Swift/Quantification der Firma Biochrom Ltd. durchgeführt.

#### **2.4.26 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Für die Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) wurde 1 ml Proteinlösung mit 600  $\mu$ l kaltem 100%igem Aceton und 160  $\mu$ l kalter 50%iger TCA gemischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zehn Minuten bei 4°C und 16.060 *g*

zentrifugiert und das Proteinsediment zwei Mal mit 1 ml kaltem 50%igem Aceton gewaschen. Das Proteinsediment wurde für circa 15 Minuten auf Eis getrocknet.

#### **2.4.27 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Das Trenngel [12%: 9,9 ml H<sub>2</sub>O; 12 ml Rotiphorese Gel 30; 7,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 ; 0,3 ml 10% (w/v) SDS; 0,3 ml 10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat; 0,012 ml TEMED] wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol dekantiert und die Phasengrenze mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Sammelgel [5%: 6,8 ml H<sub>2</sub>O; 1,7 ml Rotiphorese Gel 30; 3 ml 1 M Tris-HCl pH 6,8; 0,1 ml 10% (w/v) SDS; 0,1 ml 10% (w/v) Ammoniumperoxidsulfat; 0,01 ml TEMED] wurde über das Trenngel gegossen.

Die Proteinproben wurden mit 5 × Lämmli-Ladepuffer [250 mM DTT; 5% (w/v) SDS; 37% (v/v) Glycerin; 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,015% (w/v) Bromphenolblau] versetzt, für zehn Minuten bei 95°C denaturiert und mit einer Hammilton-Spritze aufgetragen. Als Größenstandard diente entweder der „Protein Ladder“ von MBI Fermentas oder der „Precision Plus Protein™ Standard“ von Bio-Rad, als Laufpuffer wurde 1 × Tris-Glycin [5 × Tris-Glycin: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS] verwendet. Die Auftrennung erfolgte in einer Höfer-Kammer bei einer konstanten Spannung von 40 V über Nacht.

#### **2.4.28 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese**

Bei der 2D-Gelelektrophorese werden Proteine in der ersten Dimension in einer isoelektrischen Fokussierung nach ihrem isoelektrischen Punkt und in der zweiten Dimension, der SDS-PAGE, nach ihrem Molekulargewicht getrennt.

##### **2.4.28.1 Isoelektrische Fokussierung**

Das Proteinsediment (siehe 2.4.26) wurde in 380 µl Rehydratisierungspuffer [7 M Harnstoff; 2 M Thioharnstoff; 2% (w/v) CHAPS; 1% (w/v) DTT; 0,5% (v/v) IPG Puffer pH 4-7; 0,002% (w/v) Bromphenolblau] resuspendiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei mehrfach vorsichtig gemischt wurde. Anschließend wurde zehn Minuten bei 16.060 g und Raumtemperatur zentrifugiert und mit dem Überstand ein IPG Strip (*Immobiline Dry Strips*, GE Healthcare, pH 4-7, 18 cm) beladen. Dazu wurde die Proteinlösung in die Mitte einer Keramik-Kammer (Strip Holder, GE Healthcare) pipettiert und der IPG-Strip mit der Gelseite nach unten in die Lösung überführt. Anschließend wurde der Strip mit Cover Fluid überschichtet.

Die Rehydratation und isoelektrische Fokussierung erfolgte in der Ettan IPGphor IEF Einheit (GE Healthcare) bei 20°C und 5 µA pro IEF-Streifen. Die IPG-Strips wurden für 12

Stunden rehydratisiert. Die isoelektrische Fokussierung wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt: 100 V, 1h; 200 V, 1h; 500 V, 1h; 1.000 V, 1h; linearer Gradient 1000-2000 V, 1h; 2.000 V, 5h.

#### **2.4.28.2 Äquilibrierung und 2. Dimension**

Nach Beendigung des Protokolls wurde der IPG Strip 15 Minuten in 10 ml Äquilibrierungslösung [50 mM Tris-HCl pH 8,8; 6 M Harnstoff; 30% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 0,002% (w/v) Bromphenolblau] mit 1% DTT bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde die Äquilibrierungslösung durch neue Lösung mit 2,5% Iodacetamid ersetzt und erneut 15 Minuten unter Schütteln inkubiert.

Der IPG Strip wurde mit der Plastikseite an der Glasplatte auf ein denaturierendes 12%iges Trenngel (siehe 2.4.27) platziert und mit Agarose Sealing Solution [1 × Tris-Glycin-Puffer; 0,5% (w/v) Agarose-M; 0,002% (w/v) Bromphenolblau] überschichtet. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 40 V pro Gel.

Die so erstellten Coomassie-gefärbten (siehe 2.4.29) 2D-Gele wurden eingescannt und mit der Software Progenesis SameSpots v2.0 (nonlinear dynamics, Newcastle upon Tyne, UK) ausgewertet. Die Gele wurden mit manueller Hilfe zur Überlagerung gebracht, ein Mittelwert-Gel wurde für jede Gruppe von Gelen erzeugt und die betreffenden Spots auf den verschiedenen Gelen quantitativ verglichen.

#### **2.4.29 Färben von Proteinen im Gel mit Coomassie Brilliant Blau**

Für die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau wurde das Gel bis zur Farbsättigung unter Schütteln in Farbelösung [7,5% (v/v) Essigsäure; 50% (v/v) Methanol; 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau] inkubiert und anschließend in 10% Essigsäure/50% Methanol entfärbt.

#### **2.4.30 Western-Transfer-Analyse**

Die durch SDS-PAGE getrennten Proteine wurden mittels der „Semidry-Blotting-Methode“ (Khyse-Anderson 1984) auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dazu wurden sechs Lagen 3 MM-Whatman-Papier und eine Hybond C-extra Nitrocellulosemembran auf die Größe des Trenngels zurechtgeschnitten. Die Membran und die Whatman-Papiere wurden mit Transferpuffer [39 mM Glycin; 48 mM Tris; 0,037% (w/v) SDS; 20% (v/v) Methanol] getränkt und der Blot wie folgt zusammengebaut: auf die Anode wurden luftblasenfrei drei 3MM-Whatman-Papiere, die Nitrocellulosemembran, das SDS-Gel und wieder drei 3MM-Whatman-Papiere gelegt. Der Aufbau wurde mit der Kathode der Blot-Apparatur abgeschlossen.

Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von  $0,65 \text{ mA/cm}^2$  für eine Stunde. Die Effizienz des Transfers wurde durch Färbung der Membran mit Ponceau S [0,5% (w/v) Ponceau S; 1% (v/v) Essigsäure] überprüft. Die Entfärbung erfolgte mit Leitungswasser. Das Gel wurde zur Kontrolle mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt.

#### **2.4.31 Immunodetektion von Proteinen**

Um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzusättigen, wurde die Membran für eine Stunde im Blocking-Reagenz [TBS mit 3% (w/v) BSA] geschwenkt. Dann wurde die Membran 2 × zehn Minuten mit TTBS [0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,05% (v/v) Tween 20; 0,2% (v/v) Triton X-100] und 1 × zehn Minuten mit TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) gewaschen. Die Membran wurde zusammen mit dem ersten Antikörper im Blocking-Reagenz für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Die Membran wurde wie zuvor gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur und unter Schütteln mit dem sekundären Antikörper in TBS mit 5% Magermilchpulver. Anschließend wurde die Membran 3 × zehn Minuten mit TTBS gewaschen.

Die Nachweisreaktion der Meerrettich-Peroxidase erfolgte durch Mischen von 3 ml Lösung A (0,1 M Tris-HCl, pH 8,6; 1,25 mM Luminol) mit 300  $\mu\text{l}$  Lösung B (6 mM para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) und 0,9  $\mu\text{l}$  30% (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Das Gemisch wurde auf die Membran gegeben, gleichmäßig auf dieser verteilt und zwei Minuten lang inkubiert. Die Membran wurde aus der Lösung genommen, luftblasenfrei zwischen 2 Klarsichthüllen gepackt und in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Chemiluminescent Detection Film (Roche) aufgelegt. Nach einer zweiminütigen Inkubation wurde der Film fünf Minuten in Entwicklerlösung [GBX-Entwickler und -Fixierer (Kodak), 1:5 verdünnt] geschwenkt, gewaschen und fünf Minuten fixiert.

Die folgenden Antikörper wurden in der Immunodetektion eingesetzt: His-Tag<sup>®</sup> Monoclonal Antibody, mouse monoclonal antibody IgG<sub>1</sub>, 5 × His (Novagen), 1:2:000; Anti-Ces und Anti-Chi, 1:1.000-1:5.000; Monoclonal Anti-Actin, Clone AC-40, Purified Mouse Immunoglobulin (Sigma), 1:500; Anti-human  $\alpha$ -Tubulin, mouse monoclonal antibody IgG<sub>1</sub>, (Cedarlane<sup>®</sup> Laboratories), 1:500; Immunopure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Peroxidase gekoppelt, 1:30.000; Anti-Rabbit IgG, Peroxidase gekoppelt (Sigma), 1:70.000.

## 2.4.32 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen

### 2.4.32.1 Tryptische Spaltung von Proteinen in SDS-Gelen

Die tryptische Spaltung von Proteinen erfolgte nach dem Protokoll von Jensen *et al.* (1998). Die zu analysierenden Proteinbanden wurden mit einem Skalpell aus einem Coomassiegefärbten SDS-Gel geschnitten. Die Gelstücke wurden zunächst zweimal für 15 Minuten in einem Schüttelinkubator mit zwei Volumen 50% Acetonitril und dann einmal mit einem Volumen 100% Acetonitril gewaschen (ein Volumen entspricht dabei der Menge, die das Gelstück vollständig bedeckt). Dann wurden die Gelstücke für fünf Minuten mit einem Volumen 100 mM Ammoniumbicarbonat versetzt, anschließend ein Volumen Acetonitril zugegeben und weitere 15 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgenommen und die Proben in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Zur Reduzierung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine wurden zwei Volumen 10 mM DTT (in 100 mM Ammoniumbicarbonat) zugegeben und 45 Minuten bei 56°C inkubiert. Das Gelstück wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt und die Flüssigkeit vollständig dekantiert. Zur Verhinderung von Protein-Aggregaten wurde eine irreversible Alkylierung der Cysteinreste mit Iodacetamid durchgeführt. Die Proben wurden mit zwei Volumen 55 mM Iodacetamid (in 100 mM Ammoniumbicarbonat) versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach der Reduktion und Alkylierung wurde das Gelstück erneut mit einem Volumen 100 mM Ammoniumbicarbonat für 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Zugabe von einem Volumen Acetonitril wurde der Waschvorgang für 15 Minuten weitergeführt. Anschließend wurde das Gelstück erneut in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Zum Gelstück wurden 10 µl Trypsin (1 ng/µl in 50 mM Ammoniumbicarbonat) zur Spaltung der Carboxylgruppe von Lysin und Arginin gegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt bis das Gelstück aufgequollen war. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Probe nach Zugabe von einem Volumen 25 mM Ammoniumbicarbonat über Nacht bei 37°C proteolytisch zersetzt.

Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert und zur Extraktion der Peptidfragmente aus dem Gel für zwei Minuten im Ultraschallbad inkubiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das restliche Gelstück erst für 20 Minuten mit einem Volumen 25 mM Ammoniumbicarbonat und dann für 15 Minuten mit einem Volumen Acetonitril unter Schütteln inkubiert. Es folgte erneut eine zweiminütige Behandlung im Ultraschallbad. Der Überstand wurde zum zuvor gesammelten hinzugegeben und die tryptische Spaltung durch eine zweimalige Behandlung mit je einem Volumen 5% Ameisensäure/Acetonitril (1:1) gestoppt. Die Überstände wurden ebenfalls gesammelt und die vereinigten Überstände dann bei 60°C in der Vakuumzentrifuge eingengt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 2.4.32.2 Proteinsequenzierung

Vor der Proteinsequenzierung wurden die Peptide in 4% (v/v) Methanol/1% (v/v) Ameisensäure gelöst, über C18-Zip Tips (Millipore) entsalzt und in 60% (v/v) Methanol/1% (v/v) Ameisensäure eluiert. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung eines (ESI)-Qq-TOF-MS/MS (Applied Biosystems QSTAR XL). Borosilikat-Kapillare mit Gold/Palladium-Überzug von Proxeon wurden dabei als ESI-Quelle verwendet. Übersichtsspektren in einem Massenbereich von 350-1000 m/z bei positiver Polarität wurden mit Hilfe des Programms *Analyst QS* (Applied Biosystems) aufgenommen. Durch kollisionsinduzierten Zerfall wurden zweifach und dreifach geladene Peptide (Vorläuferionen) fragmentiert und die resultierenden Spektren der Produkte mit dem Programm *Analyst QS* ausgewertet. Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden durch BLASTp-Suche in der *P. infestans* Datenbank ([http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/phytophthora\\_infestans/Downloads.html;jsessionid=DFC9AE845B7659CC7F5A97B92BE46776](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/phytophthora_infestans/Downloads.html;jsessionid=DFC9AE845B7659CC7F5A97B92BE46776)) identifiziert.

### 2.4.33 Mikroskopische Untersuchungen

#### 2.4.33.1 Mikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Axiophot Mikroskop von Zeiss (Deutschland) durchgeführt. Das Mikroskop verfügte über Objektive mit 2,5-, 10-, 20-, 40- und 100-facher Vergrößerung und war mit der Kamara „Olympus DP50“ ausgerüstet. Die Bilder wurden mit der Software ANALYSIS 3.0 (sis, Münster, Germany) bearbeitet.

Alternativ wurden mikroskopische Untersuchungen mittels der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie durchgeführt. Dazu diente das Mikroskop Axio und das LSM 510 Meta Laser Module von Zeiss. Das Mikroskop war mit Objektiven mit 10-, 40-, 63- und 100-facher Vergrößerung ausgestattet. Mit der Software LSM Image Browser (Zeiss) wurden die Bilder anschließend bearbeitet.

#### 2.4.33.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde nach dem Protokoll von Toquin *et al.* (2006) durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen in 1 × PBS (Lösung aus 0,01 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> mit 0,15 M NaCl durch Zugabe einer Lösung mit 0,01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit 0,15 M NaCl auf einen pH-Wert von 6,8 einstellen) mit 4% Formaldehyd für 30 Minuten fixiert und anschließend drei Mal zehn Minuten mit 1 × PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellwände durch eine zehnmündige Inkubation mit 2 mg/ml Driselase (Sigma), 2 mg/ml Cellulase „Onozuka R-10“ (Serva) und 2 mg/ml Lysing Enzymes (Sigma) in 1 × PBS angedaut. Nach dreimaligem Waschen mit 1 × PBS wurde die Membran durch eine Behandlung mit 0,5% Triton X-100 für

zehn Minuten permeabilisiert und erneut drei Mal gewaschen. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit 1 × PBS mit 3% Milchpulver blockiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper in 1 × PBS mit 3% Milchpulver wurde bei Raumtemperatur für zwei Stunden durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 × PBS wurden die Zellen für zwei Stunden mit dem sekundären Antikörper (Alexa fluor goat anti rabbit IgG, invitrogen) in 1 × PBS mit 3% Magermilchpulver im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurden die Zellen 3 x mit 1 × PBS gewaschen. Für die Mikroskopie wurden Myzelstücke in einen Tropfen 1 × PBS überführt und mit dem 100-er Objektiv untersucht. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte mit dem Laser der Anregungswellenlänge von 495 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei einer Wellenlänge von 519 nm.

#### **2.4.33.3 Färbung von Sterolen mit Filipin**

Die Zellen wurden fixiert und die Zellwände partiell angedaut (siehe 2.4.33.2). Nach dreimaligem Waschen mit 1 × PBS wurden die Zellen für zwei Stunden im Dunkeln mit 25 µg/ml Filipin (Sigma, Stammlösung in Methanol) in 1 × PBS inkubiert. Anschließend wurde drei Mal 15 Minuten mit 1 × PBS gewaschen.

#### **2.4.33.4 Färbung von Chitin mit Texas Red-markiertem Wheat Germ Agglutinin**

Für den Nachweis von  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)<sub>3</sub> wurde Texas Red-markiertes Wheat Germ Agglutinin (Molecular Probes) verwendet. Dazu wurden 5 mg in 2,5 ml 1 × PBS gelöst. Vor der Markierung wurde diese Lösung mit 1 × PBS auf 0,1 mg/ml verdünnt und Myzelstücke nach der Fixierung 30 Minuten in der Suspension inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit 1 × PBS wurde überschüssige Färbelösung entfernt. Die Anregung des Farbstoffes erfolgte mit dem Laser der Anregungswellenlänge von 543 nm. Als Emissionsfilter diente der Filter 575-640. Das Myzel in einem Tropfen 1 × PBS wurde mit dem 100-er Objektiv analysiert.

#### **2.4.34 Bioinformatische Methoden**

Sequenzvergleiche und Datenbanksuchen wurden mittels BLAST-Analyse (Altschul *et al.* 1997) durchgeführt. Dazu wurde die Sequenz-Datenbank von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) genutzt.

Nukleinsäuresequenzen wurden mit Hilfe des Programms „revseq“ revers komplementiert und mit dem Programm „merger“ zur Überlappung gebracht. Für die Übersetzung von Nukleinsäuresequenzen in ihre sechs möglichen Leseraster wurde das Programm „transeq“ genutzt. Das Programm „Protstats“ diente der Ermittlung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punktes von Proteinen. Mit Hilfe des

Programmes „Tmap“ wurden transmembrane Regionen vorhergesagt. Diese Programme gehören zum EMBOSS-Programmpaket (<http://www.emboss.org/>). Alternativ wurde das Programm SeqMan von DNASTar zur Assemblierung verschiedener Sequenzen bzw. Protean von DNASTar zur Identifizierung möglicher hydrophober Bereiche genutzt (<http://www.dnastar.com/>). Globale, multiple Alignments wurden mit Hilfe des Programmes Clustal W (Thompson *et al.* 1994) oder mit MUSCLE erstellt (Edgar 2004). Das Programm „Neighbor-net“ (Bryant *et al.* 2004) diente zur Erstellung eines Netzwerkes. Mit dem Programm SplitsTree 4 wurde das Netzwerk graphisch dargestellt.



### 3. Ergebnisse

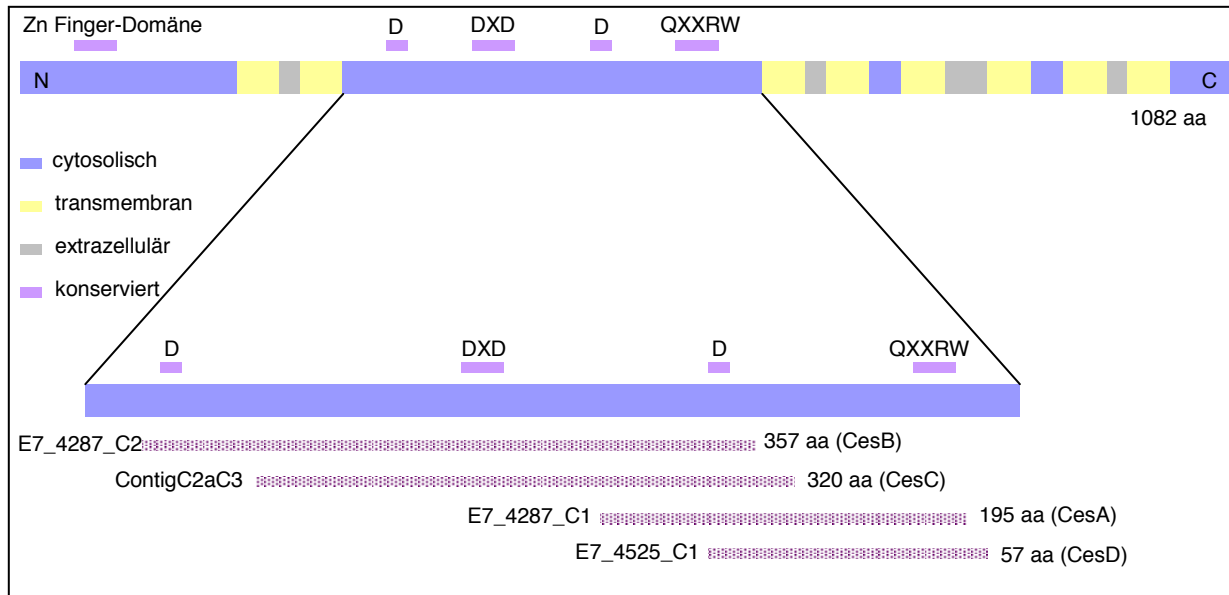
Trotz intensiver Forschungen zum biochemischen Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph ist dieser noch weitgehend unbekannt. Sowohl Iprovalicarb als auch Dimethomorph bewirken ähnliche morphologische Veränderungen von *P. infestans*, wie perlschnurartige Einschnürungen der Hyphen, globulär verdickte Hyphenspitzen und eine partielle Lyse der Zellwände. Beide Wirkstoffe verursachten eine Verdickung der Zellwand, wobei sich die Markierungsdichte für Cellulose nach einer Behandlung mit Iprovalicarb, nicht jedoch nach einer Dimethomorph-Behandlung, signifikant erhöhte (Jende 2001). Diese Ergebnisse zusammen mit der Tatsache, dass die Encystierung der Zoosporen durch Iprovalicarb und Dimethomorph inhibiert wird, deuten darauf hin, dass der Wirkort beider Wirkstoffe im Bereich der Zellwandsynthese liegt (Cohen *et al.* 2007).

Aufgrund dieser Vermutung sollte die Wirkung von Iprovalicarb auf das Enzym, das die Hauptkomponente der Zellwand synthetisiert, die Cellulose-Synthase, untersucht werden. Dazu sollten Antikörper gegen den cytosolischen Bereich dieses Membranprotein-Komplexes hergestellt werden, um die Lokalisation und Verteilung des Enzyms nach einer Behandlung mit Iprovalicarb detektieren zu können.

#### 3.1 Herstellung von Antikörpern gegen Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase

Zu Beginn dieser Arbeit war das Genom von *P. infestans* noch nicht vollständig sequenziert und die Sequenz der Cellulose-Synthase von *P. infestans* war nicht bekannt. Darum wurde mit der Cellulose-Synthase-Sequenz von *Anabaena* (Zugangsnr. Q8YQR2) eine BLAST-Suche in der Datenbank *P. infestans* Unigenes Syngenta durchgeführt. Es wurden sechs Treffer detektiert (E7.3169.C2, E7.3169.C3, E7.4287.C1, E7.4287.C2, E7.4311.C1 und E7.4525.C1), von denen fünf Ähnlichkeiten zur Cellulose-Synthase besaßen (E7.3169.C2, E7.3169.C3, E7.4287.C1, E7.4287.C2, E7.4525.C1). Diese fünf Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms DNASTar SeqMan zur Überlagerung gebracht und ein Contig (Contig\_C2aC3) ausgesucht. Basierend auf den Informationen des CESA1-Proteins von *Arabidopsis* (SwissProt/TrEMBL Nr. 048946) und eines multiplen Alignments (siehe Anhang) mit zehn *A. thaliana* CESA-Sequenzen, der Cellulose-Synthase-Sequenz von *Anabaena*, den *P. infestans* Treffer-Sequenzen (E7.4287.C1, E7.4287.C2, E7.4525.C1) und dem Contig Contig\_C2aC3 wurde die cytosolische Domäne identifiziert, welche für die Produktion von Antikörpern bevorzugt wird. Die cytosolische Domäne von *A. thaliana* CESA1 umfasst die Aminosäurereste 321-856.

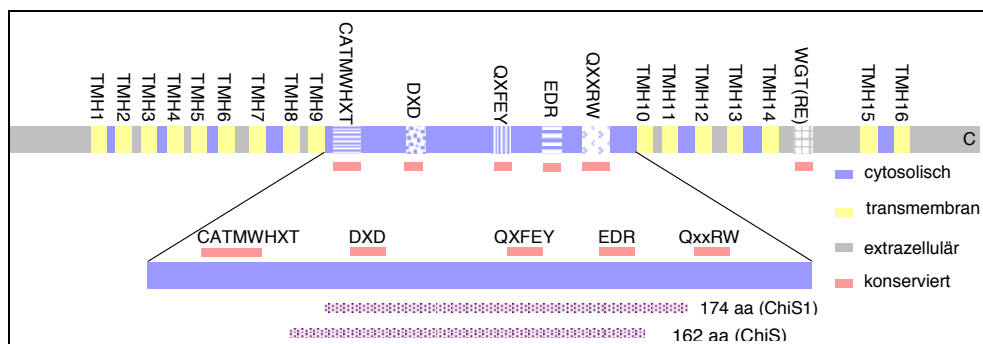
Basierend auf diesen Sequenzen wurden Oligonukleotide generiert. Mögliche hydrophobe Bereiche wurden mit Hilfe des Programms DNASTar Protean ausgeschlossen. In Abb. 3.1 sind schematisch die Bereiche dargestellt, gegen die Antikörper hergestellt wurden.



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Cellulose-Synthase höherer Pflanzen und der ausgewählten cytosolischen Bereiche gegen die Antikörper hergestellt wurden.

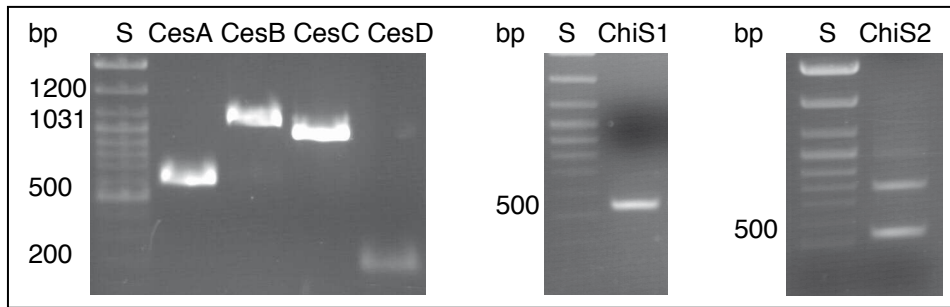
Da die Zellwände von Oomyceten neben Cellulose auch Chitin enthalten, wurden auch Antikörper gegen cytosolische Bereiche der Chitin-Synthase hergestellt (Abb. 3.2).

Zimoch und Merzendorfer (2002) haben Antikörper gegen ein 119 Aminosäuren langes Fragment der Chitin-Synthase von *Manduca sexta*, welches der Aminosäureposition 97-215 der *Drosophila* CS-1-Sequenz (Zugangsnr. AF227729) entspricht, hergestellt und diese Antikörper erfolgreich in Immunlokalisationen eingesetzt. Darum wurden die entsprechenden Bereiche der Chitin-Synthase-Sequenzen von *P. infestans* für die Antikörper-Produktion gewählt. Ein multiples Alignment mit ClustaW wurde erstellt (siehe Anhang). Dabei wurden die konservierten Bereiche der Chitin-Synthase-Sequenzen, die Zimoch und Merzendorfer in ihrem Alignment verwendet haben, und die Sequenzen Contig1 (BE776988) und Contig2 (CV947070) von *P. infestans*, die Ähnlichkeit zur Chitin-Synthase besitzen, verwendet (Abb. 3.3). Auf diesem Alignment basierend wurden die Bereiche gegen die Antikörper hergestellt wurden, ausgesucht und Oligonukleotide generiert. Mit Hilfe des Programms „Tmap“ des Emboss-Programmpaketes wurden mögliche hydrophobe Bereiche ausgeschlossen.



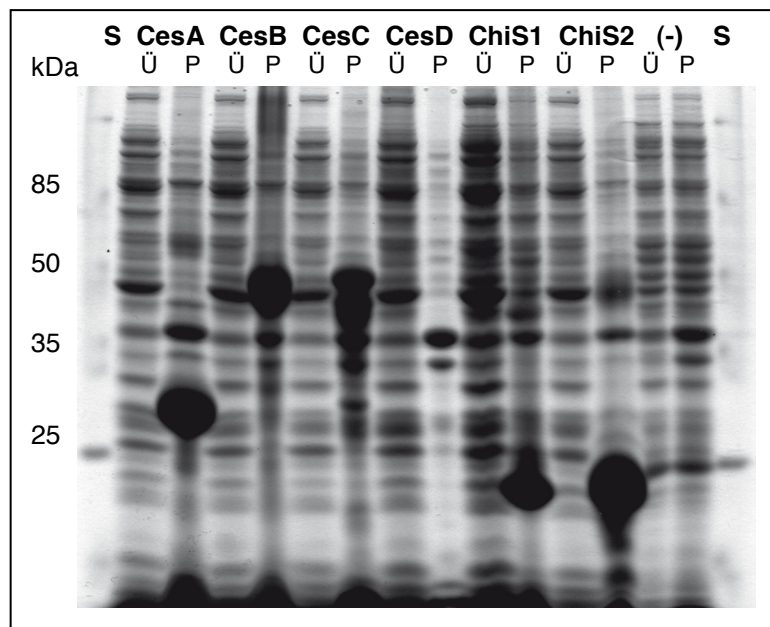
**Abb. 3.2:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Chitin-Synthase der Insekten und der ausgewählten cytosolischen Bereiche gegen die Antikörper hergestellt wurden.



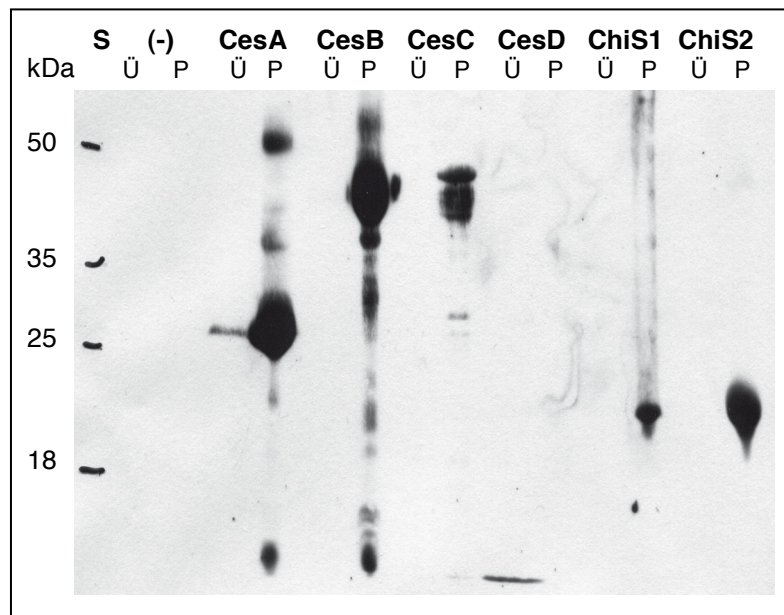


**Abb. 3.4:** 1,2% Agarose-Gel einer PCR der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Domänen von *P. infestans*. S=DNA-Größenstandard [bp].

Die PCR-Fragmente wurden in den Expressionsvektor pET28a(+) ligiert, so dass am C-terminalen Ende eine Fusion von sechs Histidinen angefügt wurde. Als Expressionswirt diente der Stamm *E. coli* BL21(DE3) und als Negativ-Kontrolle der Stamm BL21(DE3) mit dem leeren Vektor pET28a(+). Erste Expressionsversuche mit 1 mM IPTG für vier Stunden bei 37°C zeigten, dass alle rekombinanten Proteine exprimiert wurden, aber lediglich CesD löslich im Cytosol vorlag (Abb. 3.5 und 3.6), während sich sowohl CesA, CesB und CesC als auch ChiS1 und ChiS2 ausschließlich in der Pelletfraktion als „Inclusion Bodies“ (engl. Einschlusskörperchen) befanden (Abb. 3.7 und 3.8). Die rekombinanten Cellulose-Synthase-Domänen besitzen Größen von circa 11,5 kDa (CesD), 26,9 kDa (CesA), 41,3 kDa (CesC), 45,0 kDa (CesB), während die exprimierten Chitin-Synthase-Domänen circa 19,2 kDa (ChiS2) und 19,9 kDa (ChiS1) groß sind.



**Abb. 3.5:** Coomassie-gefärbte 12% SDS-PAGE der heterologen Expression der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Domänen aus *P. infestans* in *E. coli*. Pellets und Überstände eines Aufschlusses von *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen in 50 ml LB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C. Die Zellen waren mit dem Vektor pET28a(+)+CesA, CesB, CesC, CesD bzw. ChiS1, ChiS2 transformiert. S=Größenstandard [kDa], Ü=Überstand, P=Pellet.



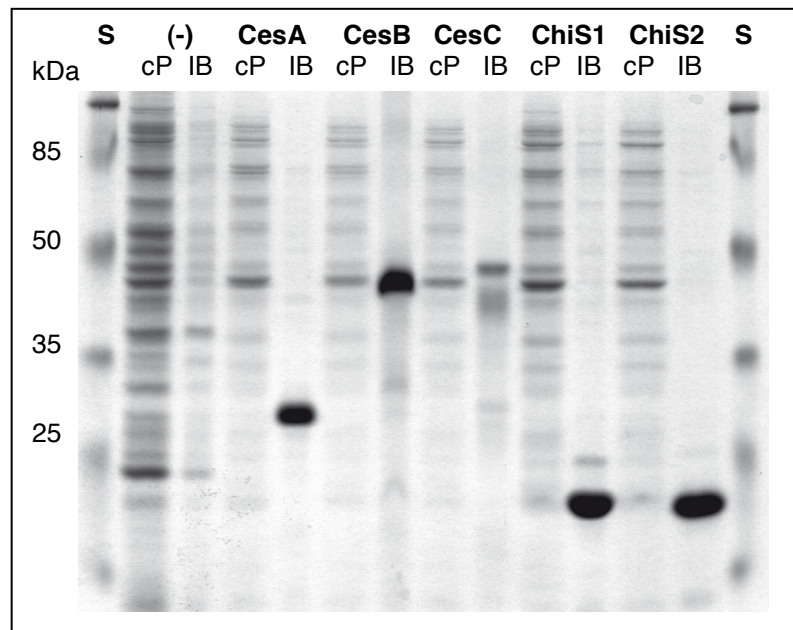
**Abb. 3.6:** Western Blot und Immunodetektion des His-Tags der Cellulose-Synthase- bzw. Chitin-Synthase-Konstrukte in pET28a(+) mit *E. coli* BL21(DE3) als Expressionsstamm. Pellets und Überstände eines Aufschlusses von *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen in 50 ml LB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C. S = Größenstandard [kDa], Ü = Überstand, P = Pellet.

Sowohl eine 12% SDS-PAGE (Abb. 3.5) als auch eine Immunodetektion mit Anti-His-Tag-Antikörpern (Abb. 3.6) zeigten für jedes rekombinante Protein eine spezifische Bande mit der erwarteten Größe, welche in der Negativ-Kontrolle nicht beobachtet werden konnte.

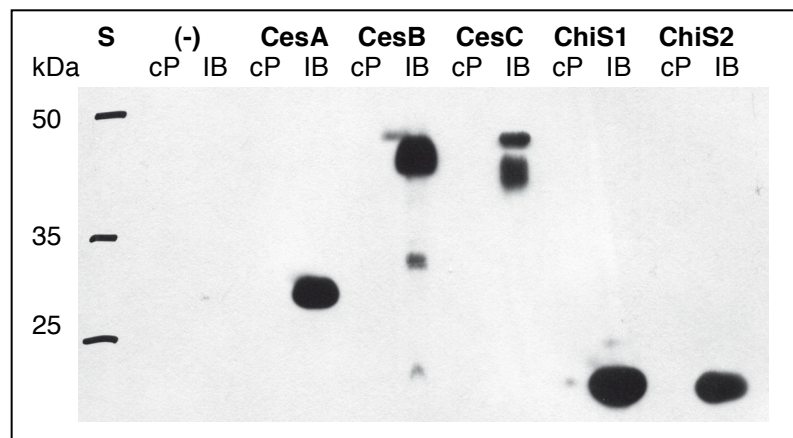
Weder Variationen der Inkubationszeit und –temperatur noch Änderungen der IPTG-Konzentration erzielten eine Verbesserung hinsichtlich der Lokalisation der exprimierten Proteine in Inclusion Bodies.

Aus diesem Grund wurde für CesaA, CesaB und CesaC sowie ChiS1 und ChiS2 die Reinigung und der Aufschluss von Inclusion Bodies mit 8 M Harnstoff und 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol durchgeführt (Abb. 3.7 und 3.8). Der Erfolg der Reinigung wurde durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung sowie durch einen Western Transfer mit Immunodetektion des His-Tags überprüft. Abb. 3.7 zeigt die Coomassie-gefärbte SDS-PAGE. In den Fraktionen der gereinigten Inclusion Bodies sind noch Verunreinigungen mit anderen Proteinen vorhanden, aber die exprimierten Proteine liegen dennoch schon in einer hohen Reinheit vor, weshalb von weiteren Reinigungsschritten abgesehen wurde.

Der Nachweis des His-Tags mittels Immunodetektion zeigte für alle fünf Proteine eine hochspezifische Bande der erwarteten Größe (Abb. 3.8).



**Abb. 3.7:** Coomassie-gefärbte 12% SDS-PAGE der Reinigung von Inclusion Bodies nach Expression der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Domänen aus *P. infestans* in *E. coli* BL21(DE3). Cytosolische Proteine und Inclusion Bodies einer Reinigung aus *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen in 50 ml LB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C. S=Größenstandard [kDa], cP=cytosolische Proteine, IB=Inclusion Bodies.

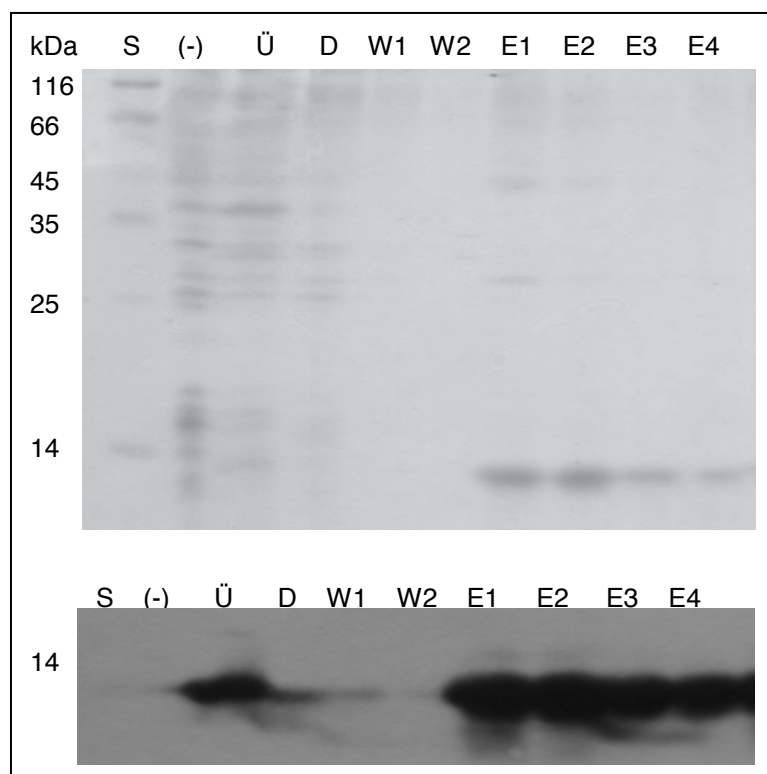


**Abb. 3.8:** Western Blot und Immunodetektion des His-Tags der Cellulose-Synthase- bzw. Chitin-Synthase-Konstrukte in pET28a(+) mit *E. coli* BL21(DE3) als Expressionsstamm. Cytosolische Proteine und Inclusion Bodies einer Reinigung aus *E. coli* BL21(DE3)-Kulturen in 50 ml LB-Medium nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 h bei 37°C. S = Größenstandard [kDa], cP=cytosolische Proteine, IB=Inclusion Bodies.

Um eine Rückfaltung der denaturierten Proteine zu ermöglichen, wurde eine Dialyse über Nacht durchgeführt, wobei die löslichen Proteine jedoch wieder zu Inclusion Bodies aggregierten und ausfielen. Darum wurden für die Immunisierung (siehe 3.1.2) je acht Mal 100  $\mu$ g der denaturierten Proteine auf einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden aus dem Coomassie-gefärbten Gel geschnitten.



Für die Reinigung von CesD dagegen wurden die Zellen von 100 ml Expressionskulturen unter nativen Bedingungen lysiert und die Proteine mit His-Anhang über Ni-NTA-Agarose gereinigt (Abb. 3.9). Der Reinigungserfolg wurde ebenfalls durch SDS-PAGE mit folgender Coomassie-Färbung und durch einen Western Transfer mit anschließender Immunodetektion des His-Tags überprüft. In den Eluaten ist eine CesD/His-Bande zu erkennen. Vor allem in den Eluaten 3 und 4 liegen kaum Verunreinigungen mit anderen Proteinen vor. Da das Protein jedoch nur in geringen Mengen exprimiert wurde, konnten selbst aus mehreren Litern Kultur keine für eine Immunisierung ausreichende Menge an CesD-Protein gereinigt werden.



**Abb. 3.9:** Coomassie-gefärbte 15% SDS-PAGE und Western Blot und Immunodetektion des His-Tags der Reinigung von CesD über Ni-NTA-Agarose. S=Größenstandard [kDa], (-)=Negativ-Kontrolle, Ü=Überstand, D=Durchlauf, W1=Waschschrift 1, W2=Waschschrift 2, E1-E4=Eluat 1-4.

### 3.1.2 Produktion von Antikörpern

Die Herstellung spezifischer Antikörper gegen Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase wurde in Kooperation mit der Firma Eurogentec (Liege, Belgien) durchgeführt. Je gereinigtem Protein wurden zwei Immunisierungen durchgeführt.

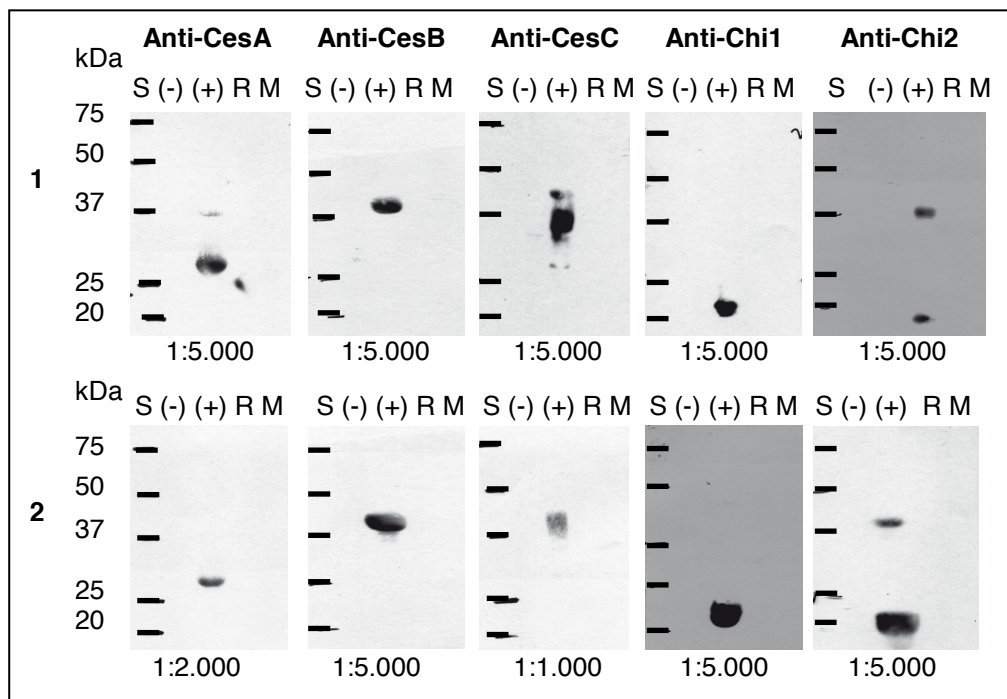
Die Immunisierung wurde über 87 Tage durchgeführt und als Versuchstiere dienten Kaninchen. Es wurden vier Immunisierungen mit je 100  $\mu$ g Protein durchgeführt, wobei die zweite Immunisierung zwei Wochen nach der ersten erfolgte, die dritte weitere zwei Wochen später, während die letzte Immunisierung 56 Tage nach der ersten Immunisierung

durchgeführt wurde. Blut zur Kontrolle der Immunantwort wurde direkt vor der ersten Immunisierung und je zehn Tage nach der dritten und vierten Immunisierung entnommen.

Zum Test der erhaltenen Präimmunsereen und Antikörper wurde ein Gesamtzellextrakt von *E. coli* (Negativ-Kontrolle), die in *E. coli* überexprimierten Proteine, ein Gesamtzellextrakt sowie eine Membranfraktion von *P. infestans* in einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die spezifischen Antikörper bzw. die Präimmunsereen wurden zunächst in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt, als sekundärer Antikörper diente ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper in einer 1:70.000 Verdünnung. Für die Präimmunsereen wurden keine Signale detektiert, während schon nach 38 Tagen Immunisierung spezifische Signale für die gereinigten Proteine erzielt wurden (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.1.3 Optimierung der Antikörper im Western-Blot

Der finale Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen im Western-Blot getestet, um die optimalen Konzentrationen zu ermitteln. Ein Gesamtzellextrakt sowie eine Membranfraktion von *P. infestans* wurden auf einem 10% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Gesamtzellextrakt von *E. coli*, als Positiv-Kontrolle die in *E. coli* exprimierten rekombinanten Proteine aufgetragen.

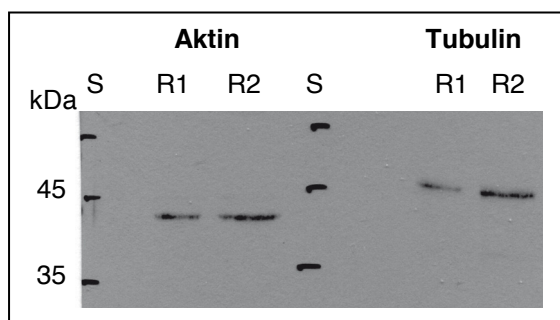


**Abb. 3.10:** Test der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Antikörper mittels Immunodetektion. S=Größenstandard [kDa], (-)=Negativ-Kontrolle=*E. coli*-Rohextrakt, (+)=exprimierte, gereinigte Proteine, R=*P. infestans*-Rohextrakt, M=*P. infestans* Membranfraktion.



Die spezifischen Antikörper wurden in unterschiedlichen Verdünnungen eingesetzt; als sekundärer Antikörper diente ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper in einer 1:70.000 Verdünnung. Die Abbildung 3.10 zeigt für alle Antikörper deutliche, hoch spezifische Signale für die gereinigten Proteine, jedoch weder Signale in Rohextrakten noch in Membranfraktion von *P. infestans*. Andererseits wurden auch keine unspezifischen Signale in der Negativ-Kontrolle oder dem Gesamtzellysate detektiert. Die optimalen Konzentrationen lagen mit Ausnahme von Anti-CesA2 (1:2.000) und Anti-CesC2 (1:1.000) bei 1:5.000.

Um die Effizienz der Präparation des Gesamtzellextraktes von *P. infestans* zu überprüfen, wurde ein Western Blot mit anschließender Immunodetektion mit monoklonalen Anti-Aktin- und Anti-Tubulin-Antikörpern durchgeführt. Dazu wurden je 50  $\mu\text{g}$  und 100  $\mu\text{g}$  Gesamtzellextrakt von *P. infestans* auf einem 12% SDS-Gel aufgetrennt.



**Abb. 3.11:** Western Blot und Immunodetektion von Aktin und Tubulin. S = Größenstandard [kDa], R1 = 50  $\mu\text{g}$  Gesamtzellextrakt von *P. infestans*, R2 = 100  $\mu\text{g}$  Gesamtzellextrakt von *P. infestans*.

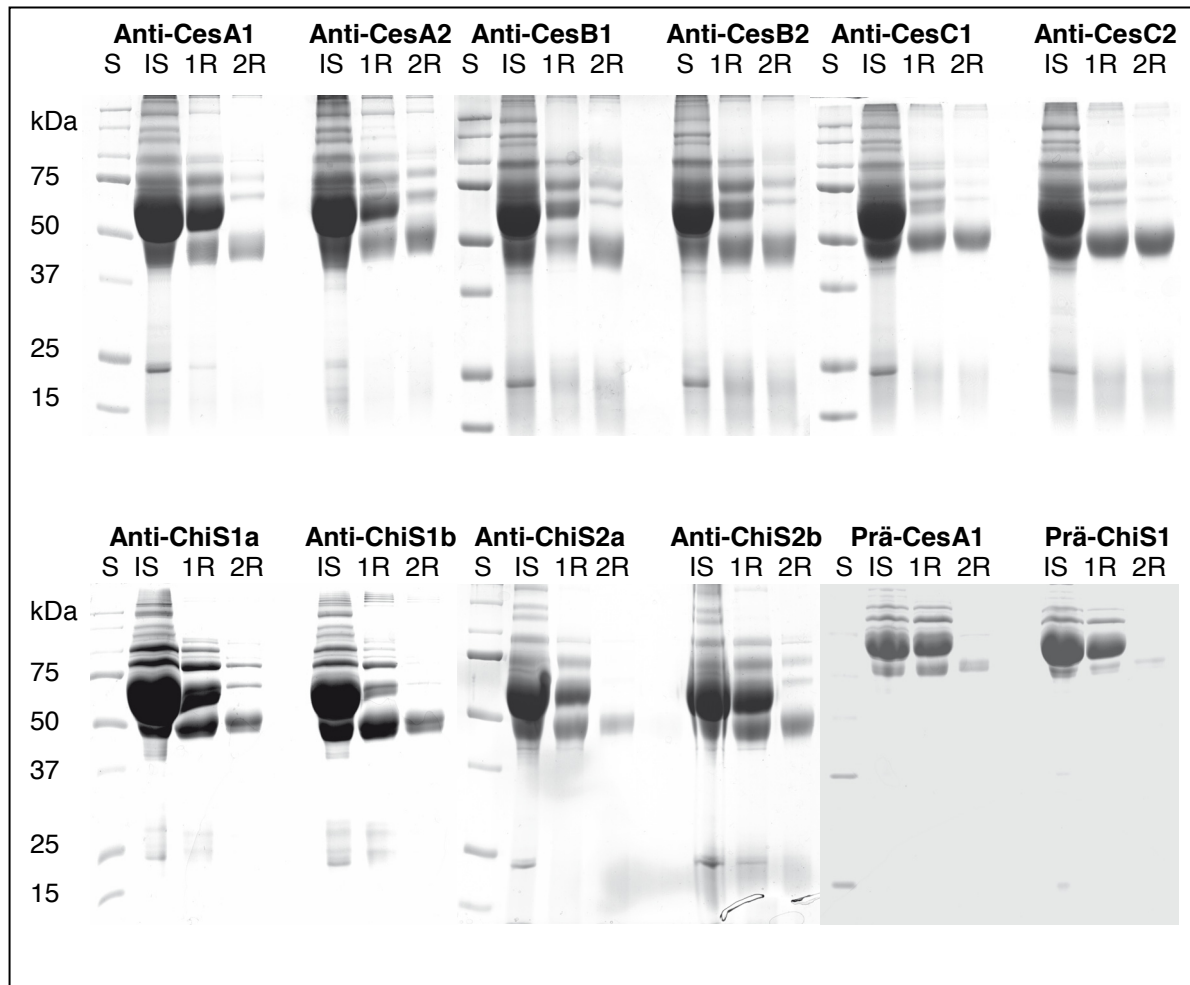
Nach der Immunodetektion mit Anti-Aktin- bzw. Anti-Tubulin-Antikörpern sind bei den entsprechenden Größen hochspezifische, wenn auch schwache Signale zu erkennen (Abb. 3.11). Aktin besitzt eine Größe von ca. 42 kDa, während Tubulin ca. 55 kDa groß ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Präparation des Gesamtzellextraktes von *P. infestans* ausreichend ist.

### 3.1.4 Reinigung der Antikörper

Da die Antikörper bei einer Immunofluoreszenzfärbung unspezifische Bindungen zeigten, wurden alle Antikörper mit Hilfe des „Melon™ Gel IgG spin Purification“ Kit von PIERCE aus dem Immunsereum gereinigt, wobei alle Nicht-Antikörper-Proteine, wie z. B. Serumalbumin, an der Gelmatrix gebunden werden, so dass sich die Antikörper im Durchlauf befinden. Die Reinigung wurde in zwei Schritten vollzogen.

Der Erfolg der Reinigung wurde mit einer 12% SDS-PAGE überprüft (Abb.3.12). In den Immunsereen ist eine große Menge anderer Proteine enthalten, wobei das Serumalbumin mit

einer Größe von 69 kDa den Hauptanteil ausmacht. Das ImmunglobulinG ist ein Tetramer aus je zwei identischen schweren Ketten mit einer Größe von je 50 kDa und zwei identischen kleinen Ketten mit einer Größe von 25 kDa. Beide Ketten sind auf der SDS-PAGE deutlich zu erkennen. Nach einer einfachen Reinigung mit dem Kit lagen noch viele Verunreinigungen, vor allem durch das Serumalbumin, vor. Erst nach einer zweiten Reinigung wiesen die Antikörper eine ausreichende Reinheit auf (Abb. 3.12). Als Negativ-Kontrolle für weitere Experimente wurden auch die Präimmunseren einer Reinigung unterzogen.

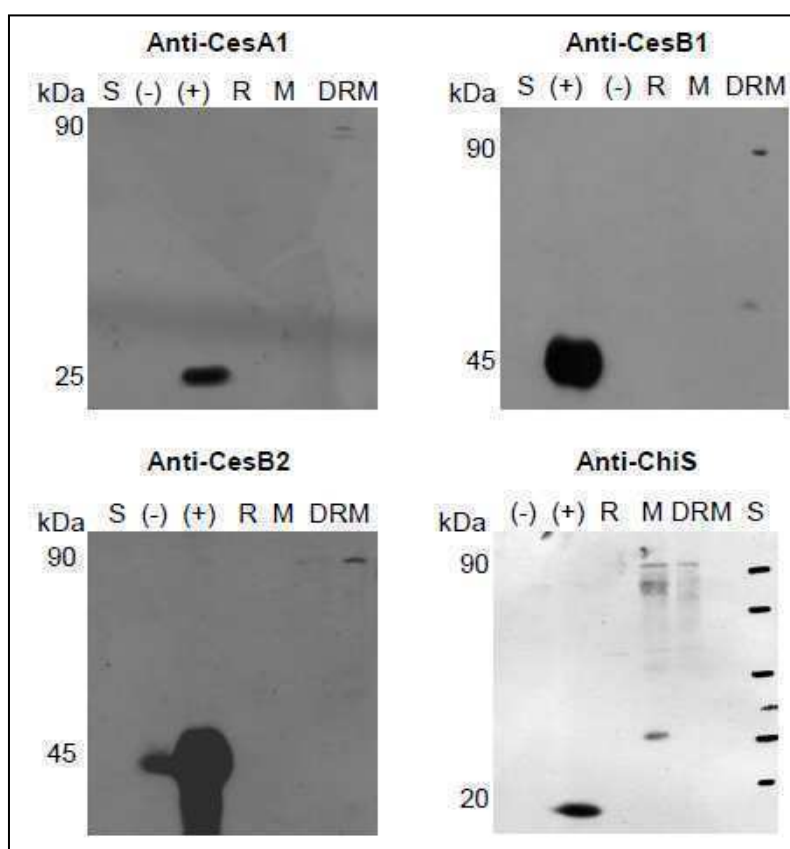


**Abb. 3.12:** Coomassie-gefärbte 12% SDS-PAGE der Reinigung der Antikörper mit Hilfe des Melon™ Gel IgG spin Purification Kit von PIERCE. S=Größenstandard [kDa], IS=Immunsereum, 1R=erste Reinigung, 2R=zweite Reinigung, Prä=Präimmunsereum.

Die gereinigten Antikörper wurden wiederum im Western Transfer getestet, zeigten jedoch wiederum lediglich spezifische Signale für die gereinigten Proteine (Daten nicht gezeigt).

### 3.1.5 Isolation Detergenz-resistenter Membranen

Für diverse Membranproteine, wie z.B. die Transporter CaMdr1p und CaCdr1p von *Candida albicans* (Pasrija *et al.* 2008) wurde eine Lokalisation in Detergenz-resistenten Membranen (DRM) beschrieben. Darum wurden diese aus *P. infestans* Rohextrakten isoliert. Dazu wurden zunächst Zellextrakte von *P. infestans* hergestellt, dann Plasmamembranen isoliert und diese durch Ultrazentrifugation in Triton X-100 lösliche Membranproteine und DRM getrennt. Die DRM wurden durch Zugabe von Octyl- $\beta$ -D-Glucopyranosiden und Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosiden solubilisiert. Anschließend wurde erneut ein Western Transfer und eine Immunodetektion mit den Anti-Ces- und Anti-Chi-Antikörpern durchgeführt.



**Abb. 3.13:** Test der Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Antikörper mittels Immunodetektion. S=Größenstandard [kDa], (-)=Negativ-Kontrolle=*E. coli*-Rohextrakt, (+)=exprimierte, gereinigte Proteine, R=*P. infestans*-Rohextrakt, M=*P. infestans* Membranfraktion, DRM=Detergenz-resistente Membranen. Von den gereinigten Proteinen wurden je 0,5  $\mu$ g, ansonsten wurden jeweils 50  $\mu$ g Protein aufgetragen.

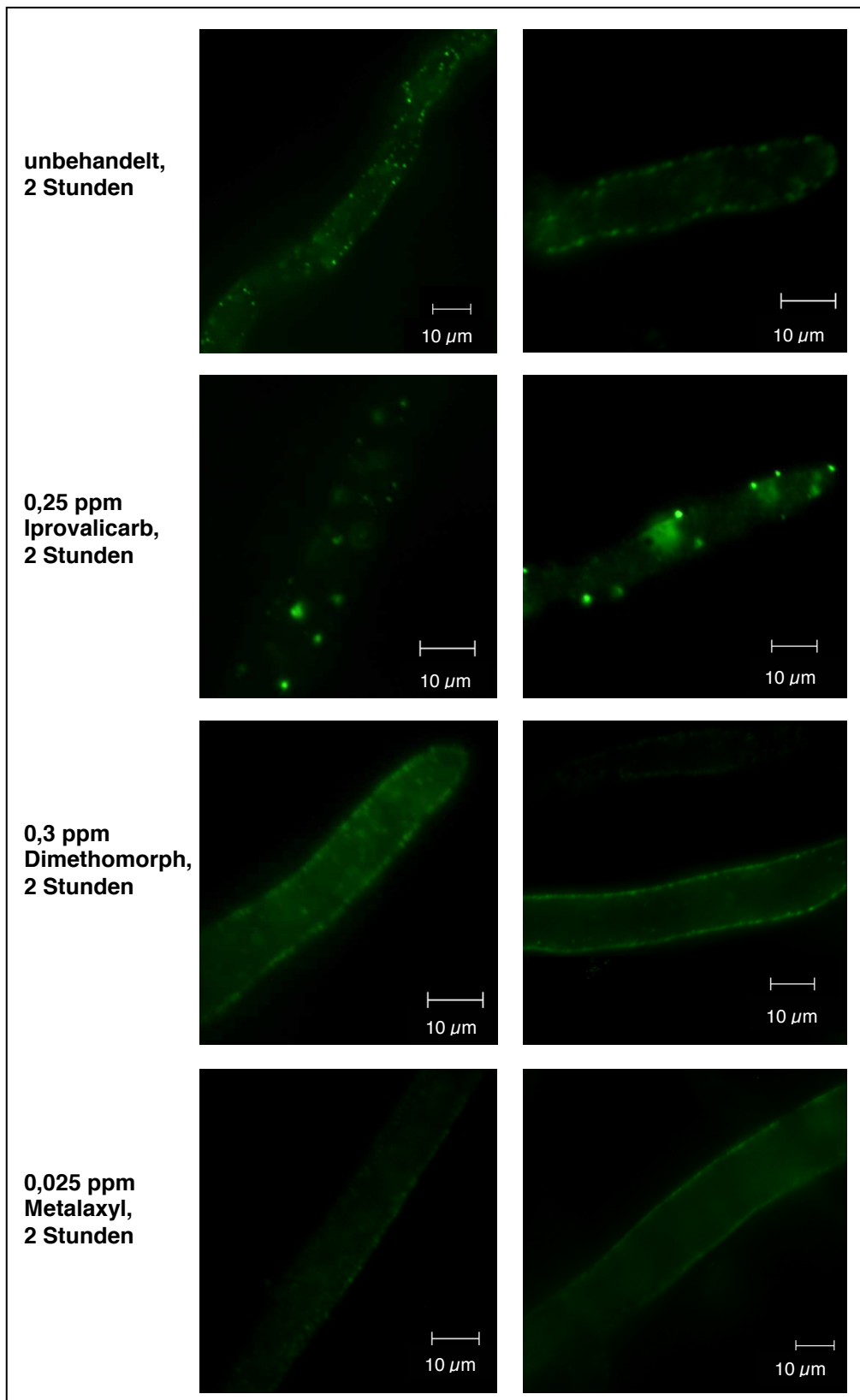
Mit den Antikörpern Anti-CesA2, Anti-CesC1, Anti-CesC2, Anti-ChiS1b, Anti-ChiS2a und Anti-ChiS2b konnten keine Signale in der Fraktion der Detergenz-resistenten Membranen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Aber die Antikörper Anti-CesA1, Anti-CesB1, Anti-CesB2 und Anti-ChiS1a zeigten schwache Signale mit einer Größe von ungefähr 100 kDa in dieser Fraktion (Abb. 3.13). Da die Antikörper Anti-CesB2 und Anti-ChiS1a die stärksten

Signale zeigten, wurden diese in den nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt.

### 3.2 Immunfluoreszenzfärbung der Cellulose-Synthase

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde Myzel einer sechs Tage alten unbehandelten *P. infestans*-Kultur für ein, zwei, vier oder 24 Stunden mit 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,3 ppm Dimethomorph bzw. 0,025 ppm Metalaxyl behandelt. Die unbehandelten Kontrollen wurden mit der entsprechenden Konzentration (0,05%) des Lösungsmittels DMSO versetzt. Anschließend wurden die Kulturen mit 4% Formaldehyd fixiert, die Zellwände durch eine Inkubation mit Cellulase, Driselase und „Lysing Enzymes“ partiell angedaut und die Membranen mit Triton X-100 permeabilisiert. Nach einer Inkubation über Nacht im Blocking-Reagenz wurde der primäre Anti-CesB1-Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 zugegeben. Als sekundärer Antikörper diente der Alexa fluor® 488 Anti-Rabbit IgG (H+L)-Antikörper. Als Negativ-Kontrolle wurde das Präimmunserum genutzt, welches weder bei Myzel noch bei Zoosporangien ein Fluoreszenzsignal zeigte.

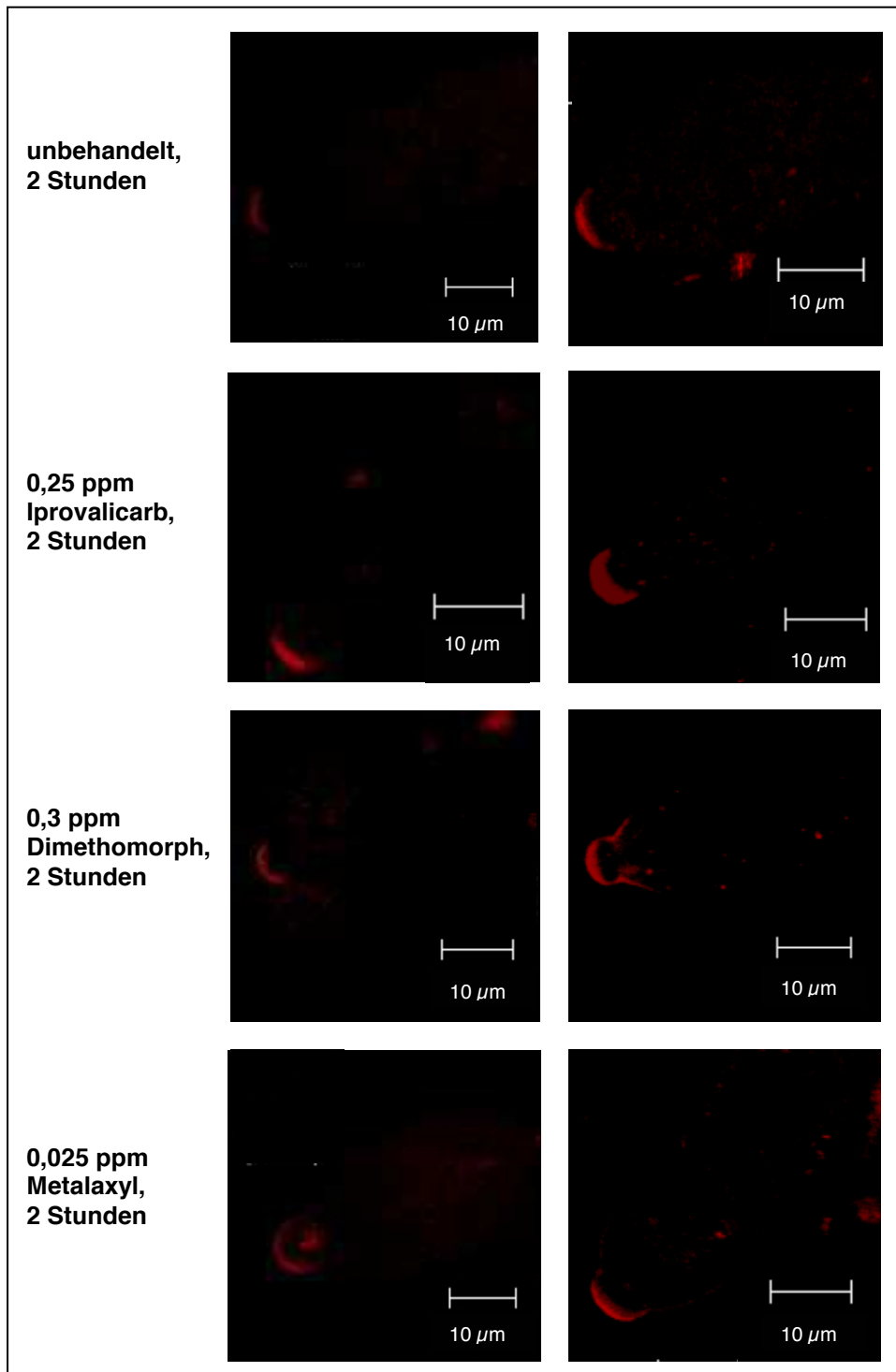
In Zoosporangien von *P. infestans* konnte mit Hilfe des Antikörpers Anti-CesB1 keine Cellulose-Synthase lokalisiert werden. In der Plasmamembran von Hyphen allerdings war nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe dieses Antikörpers eine punktförmige Färbung um das gesamte Hyphenlumen zu beobachten (Abb. 3.14). Es wurde keine besondere Anreicherung der Cellulose-Synthase an den Hyphenspitzen detektiert. Nach einer Behandlung war eine gleichmäßige-punktförmige Färbung der Hyphen nicht mehr detektierbar. Stattdessen waren stärker fluoreszierende vereinzelte Punkte zu beobachten, die auf eine partielle Akkumulation der Cellulose-Synthase hindeuten. Eine zweistündige Behandlung mit Dimethomorph und Metalaxyl hatte jedoch keine signifikante Änderung der Fluoreszenzfärbung der Cellulose-Synthase im Vergleich zur Kontrolle zur Folge (Abb. 3.14).



**Abb. 3.14:** Immunofluoreszenzfärbung der Cellulose-Synthase mit Hilfe des Anti-CesB1-Antikörpers in den Zellwänden von Hyphen von *P. infestans* nach zweistündigem Wachstum in 0,25 ppm Iprovalicarb-; 0,3 ppm Dimethomorph- bzw. 0,025 ppm Metalaxyl-haltigem oder freiem Medium.

### 3.3 Fluoreszenzfärbung von Chitin

Chitin wurde durch Färbung mit Texas Red-markiertem Wheat Germ Agglutinin sichtbar gemacht. Wheat Germ Agglutinin bindet selektiv an N-Acetylglukosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Reste (Bloch und Burger 1974). Auf die Fixierung des Myzels und der Zoosporangien mit Formaldehyd folgte eine Inkubation mit dem Farbstoff.



**Abb. 3.15:** Nachweis von  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglukosamin)<sub>3</sub> ≥  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglukosamin)<sub>2</sub>N-Acetylneuraminsäure mit Texas Red-markiertem Wheat Germ Agglutinin (WGA) in den Zellwänden von Zoosporangien von *P. infestans* nach zweistündigem Wachstum in 0,25 ppm Iprovalicarb-; 0,3 ppm Dimethomorph- bzw. 0,025 ppm Metalaxyl-haltigem oder freiem Medium.

In den Zellwänden von Hyphen und Sporangien konnten mit Hilfe des Fluoreszenzmarkierten Wheat Germ Agglutinin keine N-Acetylglukosamin- und N-Acetylneuraminsäurereste nachgewiesen werden. Etwa 50% Zoosporangien zeigten an der Spitze, wo sie auskeimen, eine fluoreszierende Kappe, eine Akkumulation des Farbstoffes (Abb. 3.15).

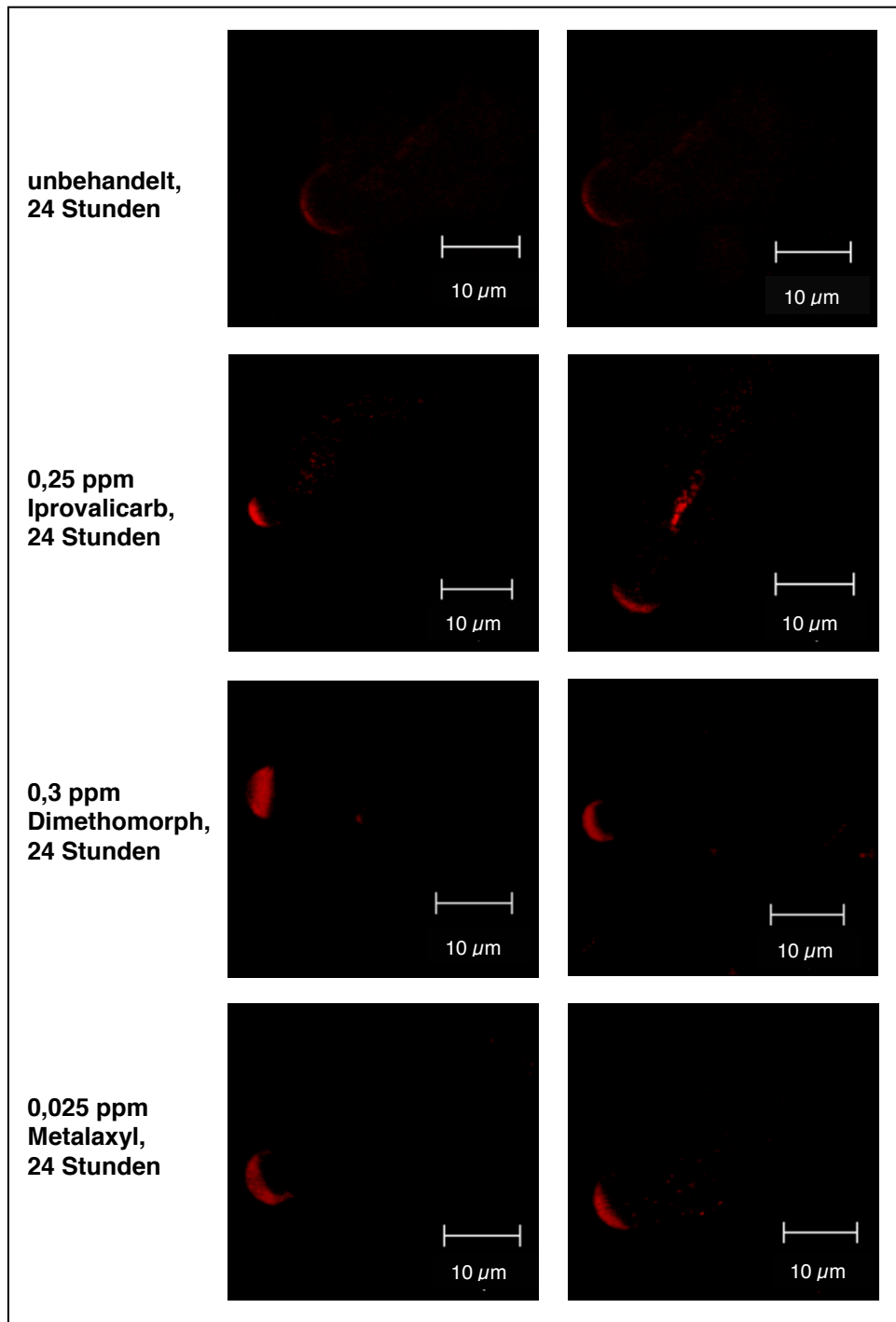


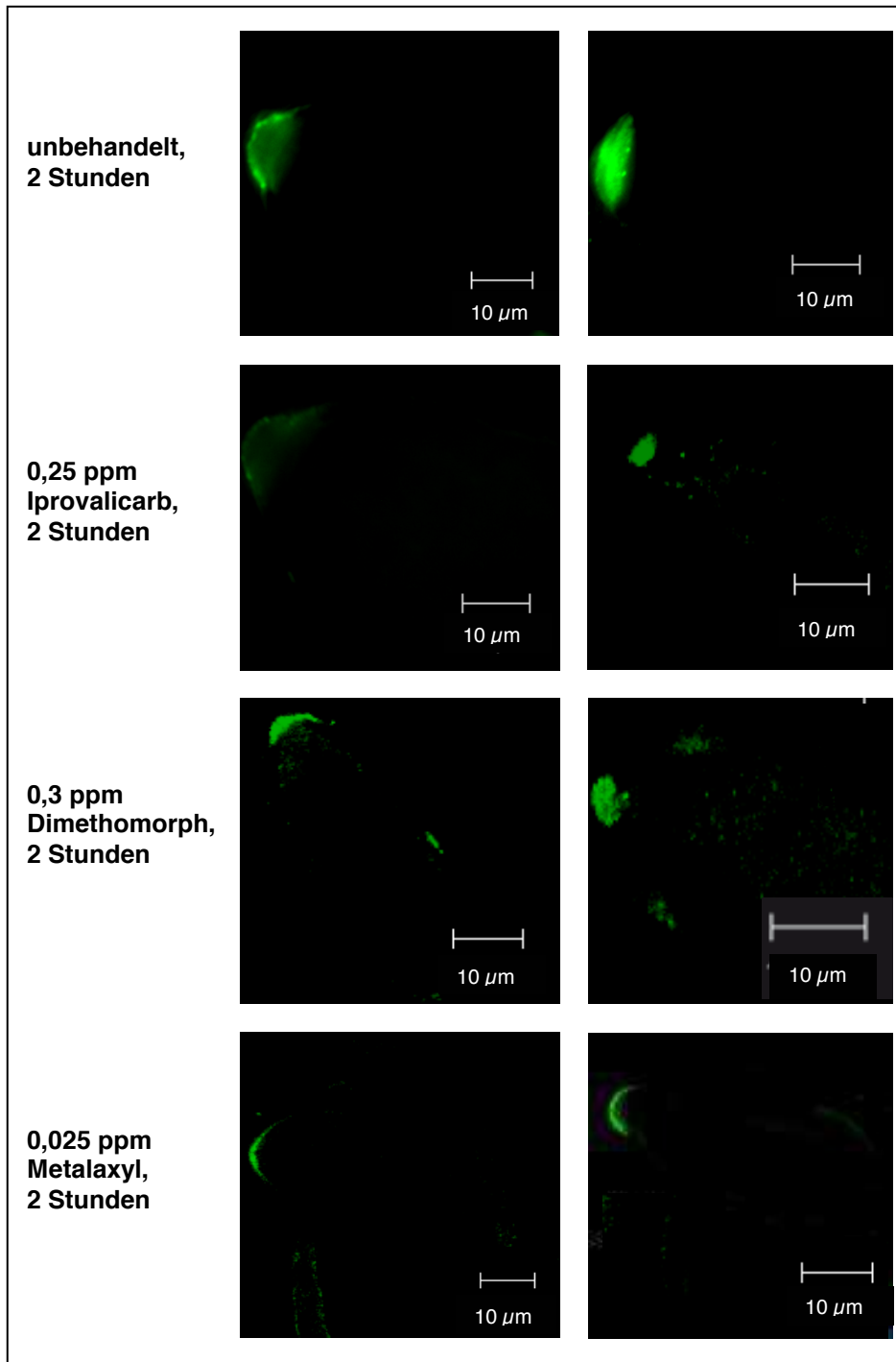
Abb. 3.16: Nachweis von  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglukosamin)<sub>3</sub>  $\geq$   $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglukosamin)<sub>2</sub>N-Acetylneuraminsäure mit Texas Red-markiertem Wheat Germ Agglutinin (WGA) in den Zellwänden von Zoosporangien *P. infestans* nach 24stündigem Wachstum in 0,25 ppm Iprovalicarb-; 0,3 ppm Dimethomorph- bzw. 0,25 ppm Metalaxyl-haltigem oder freiem Medium.

Iprovalicarb, Dimethomorph bzw. Metalaxyl hatten keinen Einfluss auf den Nachweis von N-Acetylglukosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Resten. Weder nach einer zweistündigen Behandlung mit den Wirkstoffen noch nach einer Behandlung von 24 Stunden konnte eine Änderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 3.15 und 3.16).

### **3.4 Immunofluoreszenzfärbung der Chitin-Synthase**

Die Immunolokalisation der Chitin-Synthase wurde entsprechend der Immunofluoreszenzfärbung der Cellulose-Synthase durchgeführt. Dabei wurde der Antikörper ChiS1a in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle diente wiederum das entsprechende Präimmenserum. Dieses führte weder bei Myzel noch bei Zoosporangien zu einer Fluoreszenz. Wie nach der Färbung der N-Acetylglukosamin- und N-Acetylneuraminsäure-Reste zu erwarten war, konnte in den Zellwänden von Hyphen und Zoosporangien keine Chitin-Synthase nachgewiesen werden. Jedoch war nach der Immunofluoreszenzfärbung an der Keimungsspitze eine Fluoreszenz zu beobachten (Abb. 3.17). Weder eine Behandlung mit Iprovalicarb und Dimethomorph noch mit Metalaxyl für zwei Stunden hatte eine Änderungen in der Lokalisation der Chitin-Synthase zur Folge.



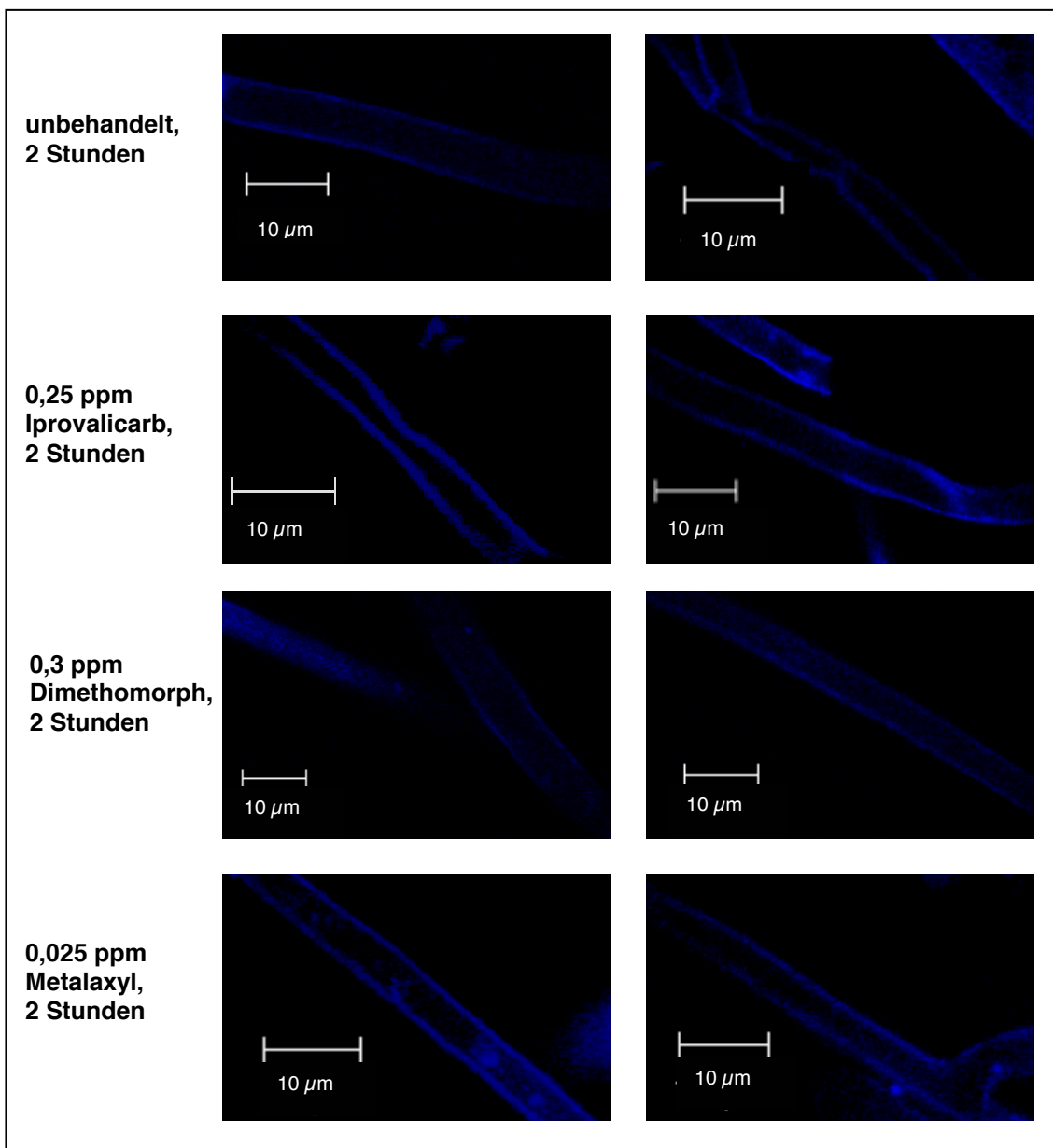


**Abb. 3.17:** Immunofluoreszenzfärbung der Chitin-Synthese mit Hilfe des Anti-ChiS1a-Antikörpers in den Zellwänden von Zoosporangien von *P. infestans* nach zweistündigem Wachstum in 0,25 ppm Iprovalicarb-; 0,3 ppm Dimethomorph- bzw. 0,025 ppm Metalaxyl-haltigem oder freiem Medium.

### 3.5 Fluoreszenzfärbung von Sterolen

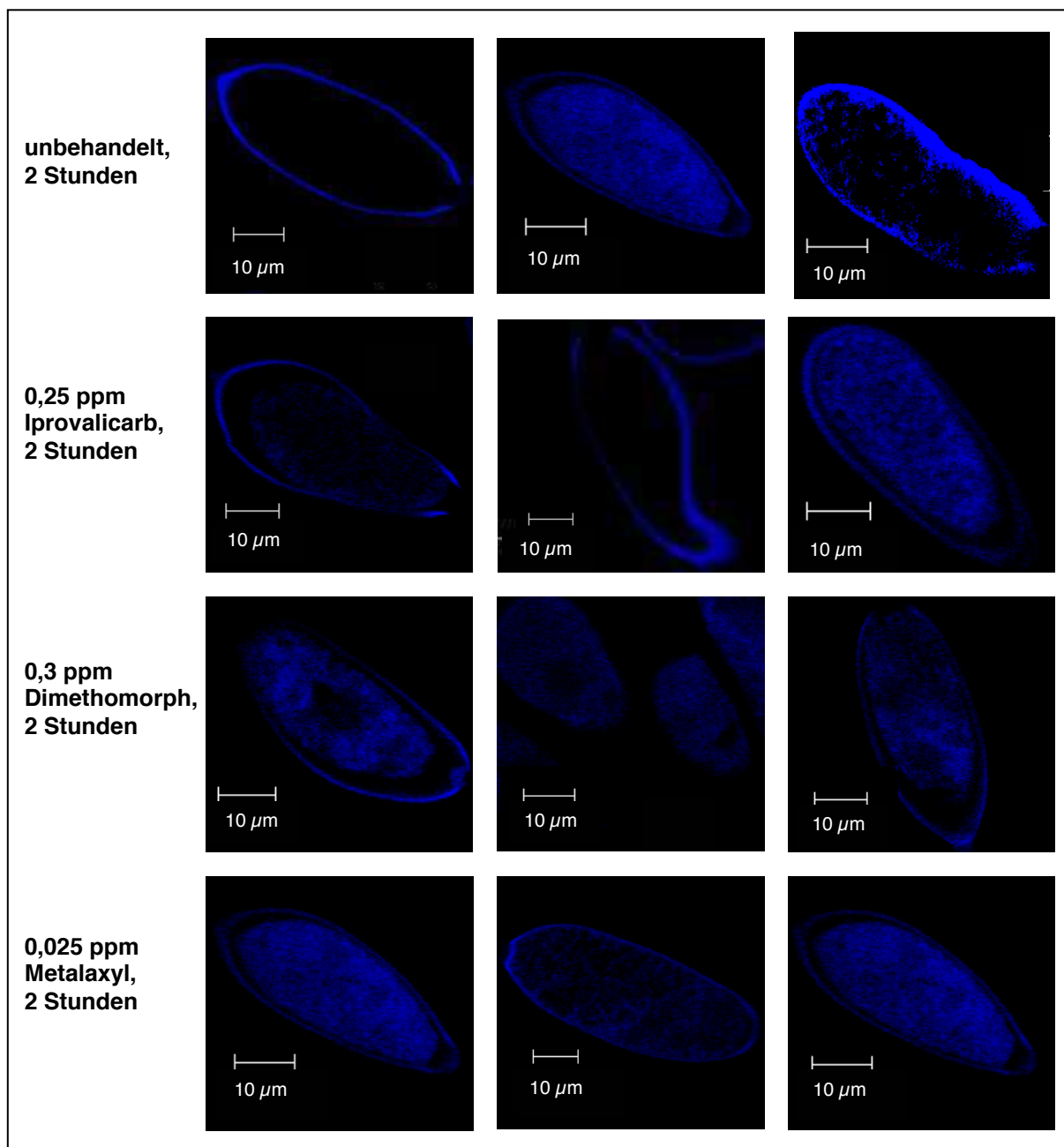
Aufgrund der Lokalisation der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase in Sterol-reichen Detergenz-resistenten Membranen wurde eine Färbung von Sterolen durchgeführt, um den Einfluss der Wirkstoffe auf die Verteilung der Sterole zu untersuchen.

Die Färbung von Sterolen erfolgte mit dem Antibiotikum Filipin, das aus dem Aktinomyceten *Streptomyces filipinensis* isoliert wird und spezifisch an Sterole bindet (Ginsbach und Fahimi 1987). Nach der Behandlung von *P. infestans* mit den Wirkstoffen wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und die Zellwände partiell lysiert. Das Myzel wurde für zwei Stunden mit Filipin inkubiert.



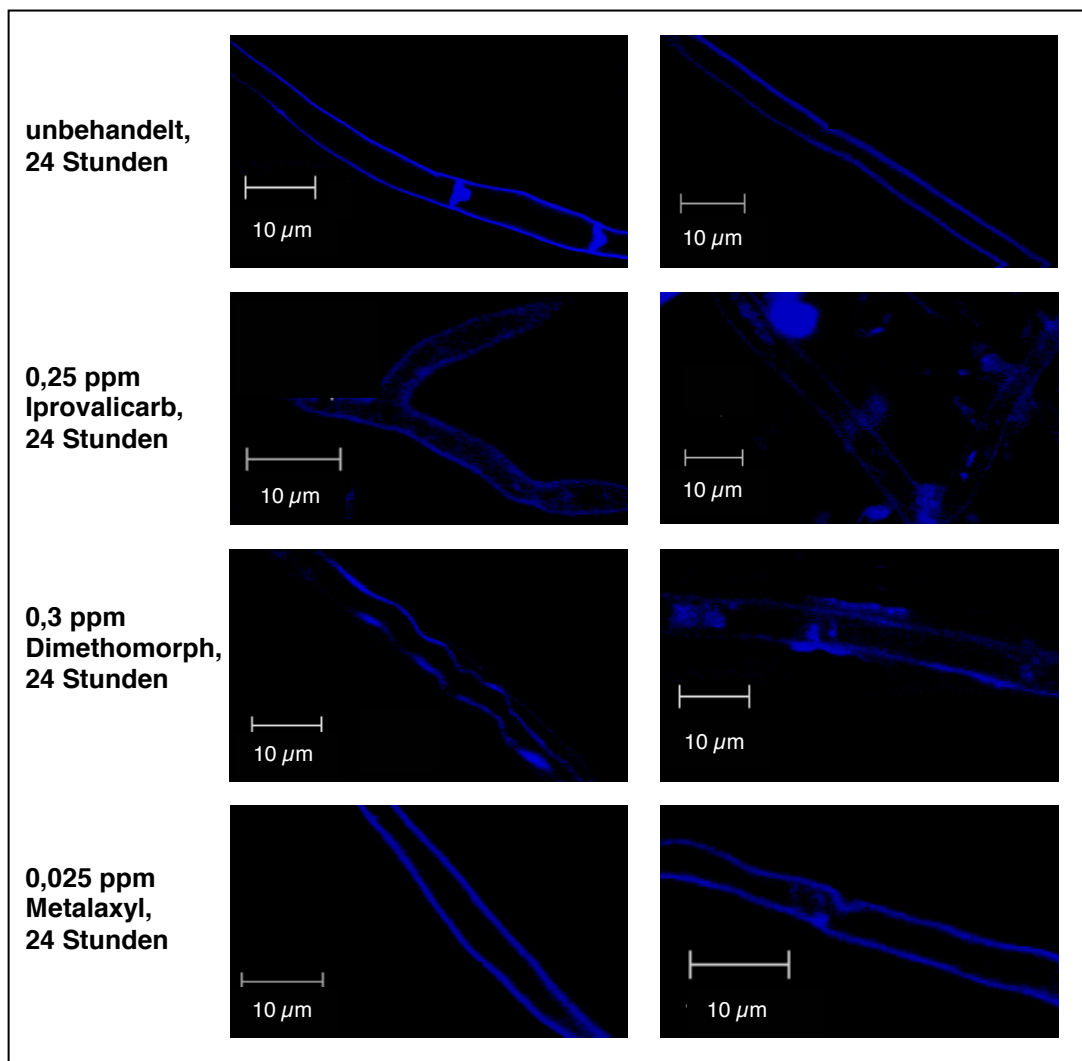
**Abb. 3.18:** Nachweis von Sterolen mit Filipin in den Zellwänden von *P. infestans*-Hyphen nach zweistündigem Wachstum in freiem Medium oder mit 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,3 ppm Dimethomorph und 0,025 ppm Metalaxyl.

Mit Hilfe von Filipin ließen sich sowohl Hyphen als auch Zoosporangien sehr deutlich anfärben (Abb. 18-21). An Zoosporangien und Hyphen, die in Wirkstoff-freiem Medium gewachsen waren, lagert sich das Filipin gleichmäßig über den gesamten Bereich der Membran an (Abb. 18 und Abb. 19). Des Weiteren zeigen ca. 50% der Zoosporangien in unterschiedlicher Ausprägung eine diffuse Färbung im Inneren (Abb. 19). Auch an Hyphen und Zoosporangien, die in Anwesenheit von Iprovalicarb, Dimethomorph bzw. Metalaxyl gewachsen waren, war eine Färbung der Sterole möglich. Eine zweistündige Behandlung der Kulturen mit den Wirkstoffen führte jedoch weder bei Hyphen (Abb. 18) noch bei Zoosporangien (Abb. 19) zu einer Änderung in der Verteilung der Sterole.

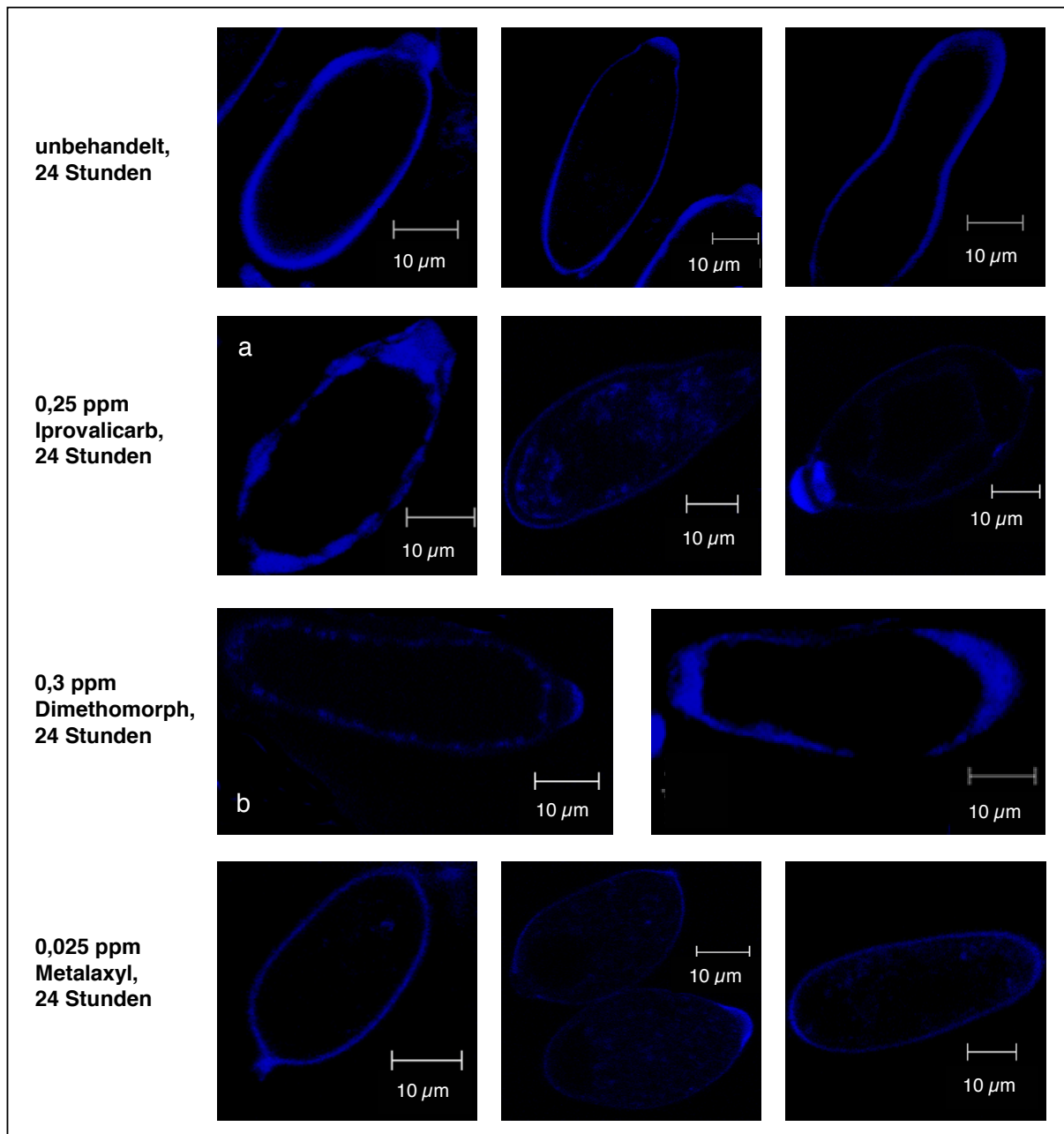


**Abb. 3.19:** Nachweis von Sterolen mit Filipin in den Zellwänden von Zoosporangien von *P. infestans* nach zweistündigem Wachstum in freiem Medium oder mit 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,3 ppm Dimethomorph und 0,025 ppm Metalaxyl.

Nach einer 24stündigen Behandlung mit Iprovalicarb, Dimethomorph bzw. Metalaxyl konnte an den Hyphen von *P. infestans* bezüglich der Färbung von Sterolen ebenfalls kein Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 20).



**Abb. 3.20:** Nachweis von Sterolen mit Filipin in den Zellwänden von *P. infestans*-Hyphen nach 24-stündigem Wachstum in freiem Medium oder mit 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,3 ppm Dimethomorph und 0,025 ppm Metalaxyl.



**Abb. 3.21:** Nachweis von Sterolen mit Filipin in den Zellwänden von Zoosporangien von *P. infestans* nach 24-stündigem Wachstum in freiem Medium oder mit 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,3 ppm Dimethomorph und 0,025 ppm Metalaxyl.

Auch die Zoosporangien von *P. infestans* zeigten nach einer 24stündigen Behandlung mit den Wirkstoffen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Änderungen in der Verteilung der Sterole (Abb. 21). Lediglich vereinzelte Zoosporangien zeigten nach der 24stündigen Behandlung mit Iprovalicarb bzw. Dimethomorph eine fragmentierte Färbung der Sterole (Abb. 21a und 21b).

### 3.6 Proteomanalyse von *P. infestans*

Für die Proteomanalyse von *P. infestans* wurden Proteine aus Myzel unbehandelter und in Gegenwart von Wirkstoff angezogener sechs Tage alter Flüssigkulturen extrahiert. Der Wirkstoff Iprovalicarb wurde dabei in einer Konzentration von 0,125 ppm und 0,25 ppm eingesetzt, während die Dimethomorph-Konzentration 0,15 ppm und 0,3 ppm betrug. Diese Werte wurden in einem radialen Myzelwachstumstest von Mehl (2006) als EC50- bzw. EC50/2-Konzentrationen ermittelt. Nach sechs Tagen wurde das Myzel geerntet und Rohextrakte hergestellt. In einer ersten Dimension wurden die extrahierten Proteine durch isoelektrische Fokussierung in einem kontinuierlichen pH-Gradienten von 4-7 getrennt. In der zweiten Dimension erfolgte die Trennung in 12%igen denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen. Dabei wurden für jede Wirkstoffkonzentration bzw. für die Kontrolle je fünf unabhängige Versuche durchgeführt. D. h. es wurden je fünf unabhängige Kulturen angezogen, so dass fünf unterschiedliche Rohextrakte in fünf 2D-Gelelektrophoresen getrennt wurden.

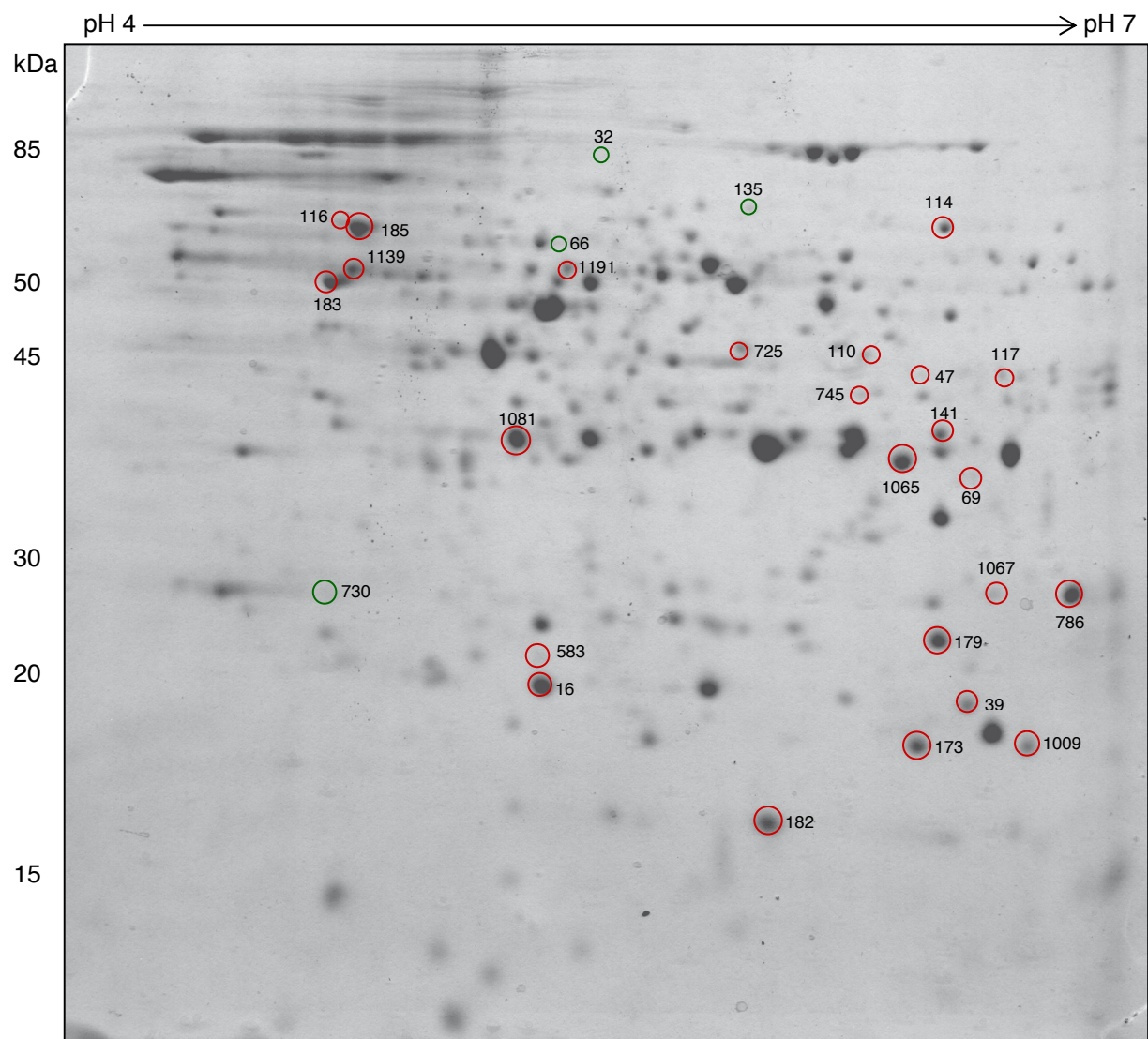


**Abb. 3.22:** Zweidimensionale Gelelektrophorese des Proteoms einer unbehandelten, sechs Tage alten Kultur von *P. infestans* im Bereich pH 4-7. Aufgetragen sind 1 mg Gesamtprotein. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.



In Abbildung 22 ist stellvertretend ein Coomassie-gefärbtes Gel des Proteoms einer unbehandelten, sechs Tage alten *Phytophthora*-Kultur im Bereich pH 4-7 dargestellt.

Mit Hilfe der Software Progenesis SameSpots (nonlinear dynamics) wurden alle 25 Coomassie-gefärbten 2D-Gele mit manueller Hilfe zur Überlagerung gebracht, so dass jeder Spot an der gleichen Position angeordnet war. Für jede Gruppe von Gelen (unbehandelt; 0,125 ppm Iprovalicarb; 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,15 ppm Dimethomorph und 0,3 ppm Dimethomorph) wurde ein Mittelwert-Gel erzeugt und diese miteinander verglichen. Für jeden Spot wurde ein Volumen berechnet, so dass die Volumenzunahme oder -abnahme jedes Spots berechnet werden konnte (Tabelle 3.1; 3.2 und 3.5). Die Spots von Interesse wurden aus dem Gel geschnitten und mit Trypsin im Gel proteolytisch gespalten. Die resultierenden Peptide wurden mit Hilfe der Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektrometrie an einem Q-TOF2 und QSTAR XL Massenspektrometer sequenziert.



**Abb. 3.23:** Zweidimensionale Gelelektrophorese des Proteoms einer mit Iprovalicarb (0,25 ppm) behandelten, sechs Tage alten Kultur von *P. infestans* im Bereich pH 4-7. Aufgetragen sind 1 mg Gesamtprotein. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle ein verringertes Volumen zeigten sind grün markiert, solche mit einem erhöhten Volumen rot.

Die generierten Peptidsequenzen wurden in einer BLASTp-Analyse gegen die *P. infestans* Datenbank (Broad Institut) identifiziert (Tabelle 3.3; 3.4 und 3.6).

Für die zwei verschiedenen Konzentrationen jedes Wirkstoffes konnte ein Trend für die Volumina der Proteine beobachtet werden. Eine höhere Konzentration führte zu einer Abnahme bzw. Zunahme des Volumens. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3.22), zeigten die 2D-Gele des Proteoms von Iprovalicarb-behandelten *P. infestans* Kulturen wenige Unterschiede (Abb. 3.23). Ausschließlich für zwölf Spots konnte eine Volumenzunahme bzw. -abnahme von mehr als 30% detektiert werden, wobei die höchste Volumenänderung nur 63,1% betrug (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1:** Proteine von *P. infestans*, die nach Behandlung mit 0,25 ppm Iprovalicarb im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mindestens 20% abweichen.

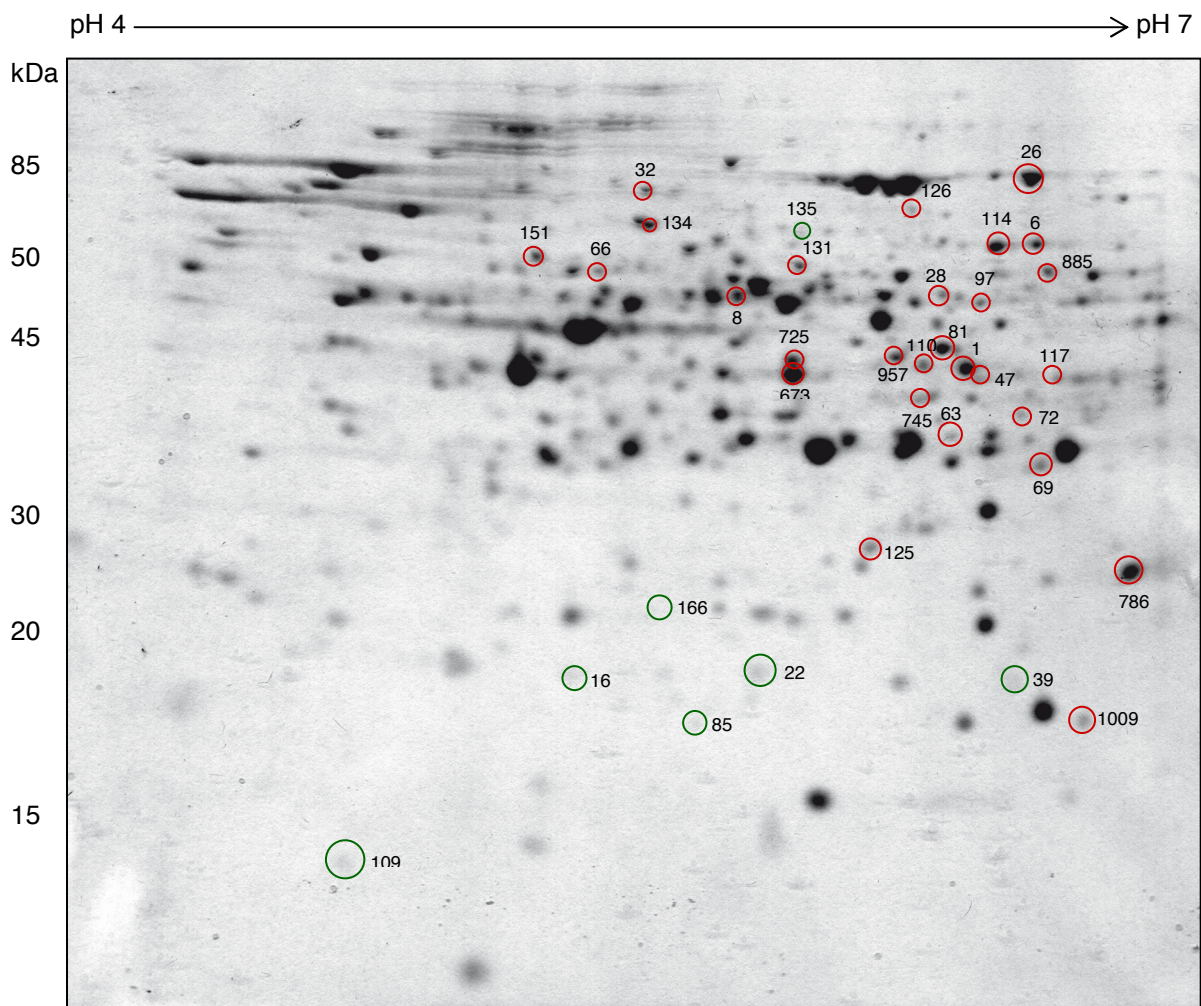
Protein- Nummer	Kontrolle		0,25 ppm Iprovalicarb		
	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen- STD [%]	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen- STD [%]	Volumen- änderung [%]
16	2.517	19,2	3.488	9,7	+38,6
32	319	24,6	239	36,6	-25,1
39	840	34,8	1.257	17,3	+49,6
47	164	10,0	219	29,2	+33,3
66	255	18,9	193	13,7	-24,5
69	427	20,7	530	22,8	+24,1
110	512	9,2	677	28,3	+32,1
114	820	13,3	1.054	17,0	+28,5
116	153	35,4	196	23,3	+28,0
117	278	27,6	351	32,6	+26,3
135	434	18,6	303	11,6	-30,2
141	817	15,7	1.121	16,6	+37,2
173	1.575	16,7	2.247	18,2	+42,6
179	2.112	18,4	2.672	13,7	+26,5
182	2.752	27,2	3.580	13,0	+30,1
183	2.269	24,3	2.966	9,5	+30,7
185	2.259	31,8	2.900	9,2	+28,4
583	323	26,6	527	35,4	+63,1
725	773	22,9	973	24,2	+25,8
730	1.145	17,9	830	22,5	-27,6
745	398	11,6	578	33,8	+45,5
786	1.921	21,9	2.687	15,9	+39,9
1009	926	29,4	1.166	12,5	+25,9
1065	2.382	21,5	2.875	13,8	+20,7
1067	401	22,6	522	26,1	+29,9
1081	3.654	26,2	4.446	11,8	+21,6
1139	1.770	30,1	2.197	18,9	+24,1
1191	1.073	15,9	1.351	26,8	+25,9

Die 2D-Gele des Proteoms von Dimethomorph-behandelten *P. infestans* Kulturen zeigten sogar schon bei der niedrigeren Konzentration von 0,15 ppm Dimethomorph im Vergleich zur Kontrolle mehrere Spots mit signifikant veränderten Volumina (Abb. 3.24 und Tabelle 3.2). Daher wurden nur die Proteine tryptisch verdaut und sequenziert, die schon bei der EC50/2-Konzentration eine deutliche Änderung des Volumens zeigten. Insgesamt wurden 15 Spots mit einer Volumenänderung von mehr als 50% detektiert, wobei drei Spots sogar eine



Volumenzunahme von mehr als 100% zeigten. Zusätzliche 15 Spots zeigten eine Volumenzunahme von mehr als 30%.

Vierzehn Proteine zeigten eine erhöhte Akkumulation sowohl als Antwort auf eine Behandlung mit Iprovalicarb als auch auf eine Behandlung mit Dimethomorph, und sieben dieser waren identisch zu denen, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die größten Volumenänderungen nach einer Behandlung mit Iprovalicarb zeigten. Insgesamt waren die Volumenänderungen, die durch Dimethomorph verursacht wurden allerdings deutlich höher als die Änderungen in Antwort auf eine Behandlung mit Iprovalicarb.



**Abb. 3.24:** Zweidimensionale Gelelektrophorese des Proteoms einer mit Dimethomorph (0,15 ppm) behandelten, sechs Tage alten Kultur von *P. infestans* im Bereich pH 4-7. Aufgetragen sind 1 mg Gesamtprotein. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle ein verringertes Volumen zeigten sind grün markiert, solche mit einem erhöhten Volumen rot.

Zum Beispiel zeigte die Glukose-6-Phosphat-1-Dehydrogenase (Spot 114) eine Volumenzunahme von +28,5% in Gegenwart von Iprovalicarb, während die Änderung nach einer Behandlung mit Dimethomorph +71,9% betrug. Ein hypothetisches Protein mit Ähnlichkeit zu einer D-Lactat-Dehydrogenase (Spot 69) zeigte nach einer Behandlung mit Iprovalicarb eine Volumenzunahme von nur +24%, während die Zunahme des Volumens als Antwort auf Dimethomorph +88,1% betrug. Die Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (Spot 47) zeigte in

Anwesenheit von Iprovalicarb eine Volumenzunahme von +33.3%, aber eine dreifach höhere Änderung (+96.8%) nach Behandlung mit Dimethomorph.

**Tabelle 3.2:** Proteine von *P. infestans*, die nach Behandlung mit 0,15 ppm Dimethomorph im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mindestens 20% abweichen.

Protein- Nummer	Kontrolle		0,15 ppm Dimethomorph		
	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen- STD [%]/Gele	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen- STD [%]/Gele	Volumen- änderung [%]
1	588	19,0	1.732	10,9	+194,8
6	223	12,1	678	11,1	+203,9
16	2.517	19,2	1.437	24,4	-42,9
22	2.965	19,6	1.465	9,2	-50,6
26	1.088	11,6	1.906	21,3	+75,2
28	192	29,9	403	16,5	+109,5
32	319	24,6	501	33,5	+57,3
39	840	34,8	591	17,3	-29,7
47	164	10,0	323	12,8	+96,8
63	106	23,3	164	15,5	+55,6
66	255	18,9	350	21,1	+37,1
69	427	20,7	804	10,1	+88,1
72	86	27,0	145	6,7	+67,5
81	817	23,8	1.512	16,3	+85,0
85	1.196	14,2	791	38,9	-33,8
87	660	16,5	960	15,4	+45,5
97	472	17,1	754	23,8	+59,9
109	2.019	32,2	1.319	31,1	-34,7
110	512	9,2	879	15,3	+71,5
114	820	13,3	1.409	16,8	+71,9
117	278	27,6	393	14,9	+41,5
125	608	18,3	814	23,0	+33,9
131	442	19,2	712	26,0	+61,0
134	825	14,9	1.069	25,3	+29,5
141	817	15,7	1.055	16,3	+29,2
151	963	19,5	1.344	25,3	+39,5
166	1.222	17,0	935	20,4	-23,5
673	1.851	25,8	2.693	14,1	+45,5
725	773	22,9	1.117	30,0	+44,5
745	398	11,6	584	17,3	+47,0
786	1.921	21,9	2.682	6,5	+39,6
885	498	16,9	651	21,1	+30,8
957	760	19,4	965	19,7	+27,0
1191	1.073	15,9	1.221	10,6	+37,6

Außerdem waren einige Proteine nach einer Behandlung mit Iprovalicarb hochreguliert, während sie als Antwort auf Dimethomorph herunterreguliert waren, bzw. umgekehrt. Die Glutathion-S-Transferase (GST; Spot 16) zum Beispiel zeigte nach einer Behandlung mit Iprovalicarb eine Volumenzunahme von +38,6%, aber eine Volumenabnahme von -42,9% in Antwort auf eine Behandlung mit Dimethomorph. Nur zwei Proteine, die Phosphoglycerat-Mutase (Spot 786; 39%) und die Xenobiotik-Reduktase (Spot 745; 46 %) zeigten ungefähr die gleiche Volumenzunahme nach einer Behandlung mit Iprovalicarb und Dimethomorph.

**Tabelle 3.3:** Mittels ESI-Qq-TOF identifizierte Proteine von *P. infestans*, die nach Behandlung mit 0,25 ppm Iprovalicarb im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mindestens 20% abweichen.

Spot-Nr.	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen-änderung [%]	ID-Nummer	IEP	MW [kDa]	Protein-Identität
16	3.488	+38,6	PITT_05582	5,37	22,28	konserviertes hypothetisches Protein
32	239	-25,1	PITT_18538	5,42	76,47	konserviertes hypothetisches Protein
39	1.257	+49,6	PITT_07048	7,83	24,49	Superoxid-Dismutase, mitochondrialer Vorläufer
47	219	+33,3	PITT_08445	6,56	44,10	Cystathionin-γ-Lyase
69	530	+24,1	PITT_01408	6,68	36,38	hypothetisches Protein, ähnlich zu D-Lactat-Dehydrogenase
110	677	+32,1	PITT_21806	6,43	46,73	Fumarylacetoacetase
114	1.054	+28,5	PITT_00146	6,86	62,05	Glukose-6-phosphat 1-Dehydrogenase
117	351	+26,3	PITT_03226	6,66	46,56	konserviertes hypothetisches Protein
135	303	-30,2	PITT_05778	6,06	66,28	konserviertes hypothetisches Protein
141	1.121	+37,2	PITT_15476	6,53	36,41	Malat-Dehydrogenase
173	2.247	+42,6	PITT_13761	6,35	20,84	vom Protoplast sekretiertes Protein 2, Vorläufer
179	2.672	+26,5	PITT_17406	5,48	27,75	Enoyl-CoA-Hydratase, mitochondrialer Vorläufer
182	3.580	+30,1	PITT_09596	5,66	16,97	Nukleosid-Diphosphat-Kinase B
183	2.966	+30,7	PITT_06595	5,21	50,59	ATP-Synthase beta- Untereinheit, mitochondrialer Vorläufer
185	2.900	+28,4	PITT_11966	5,17	63,27	Chaperon CPN60-1, mitochondrialer Vorläufer
725	973	+25,8	PITT_05117	6,61	45,72	Glycin-Amidino-transferase, mitochondrialer Vorläufer
730	830	-27,6	PITT_07903	4,68	29,64	konserviertes hypothetisches Protein
745	578	+45,5	PITT_12788	6,80	41,27	hypothetisches Protein, ähnlich zu Xenobiotik-Reduktase B
786	2.687	+39,9	PITT_07400	6,98	29,29	2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat-Mutase
1009	1.166	+25,9	PITT_13761	6,35	20,84	vom Protoplast sekretiertes Protein 2, Vorläufer
1065	2.875	+20,7	PITT_13614	6,86	35,44	Malat-Dehydrogenase
1081	4.446	+21,6	PITT_02785	5,42	43,34	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase
1139	2.197	+24,1	PITT_00156	4,49	50,11	Tubulin β-Kette
1191	1.351	+25,9	PITT_06118	5,29	57,79	vakuoläre ATP-Synthase B-Untereinheit, Isoform 1

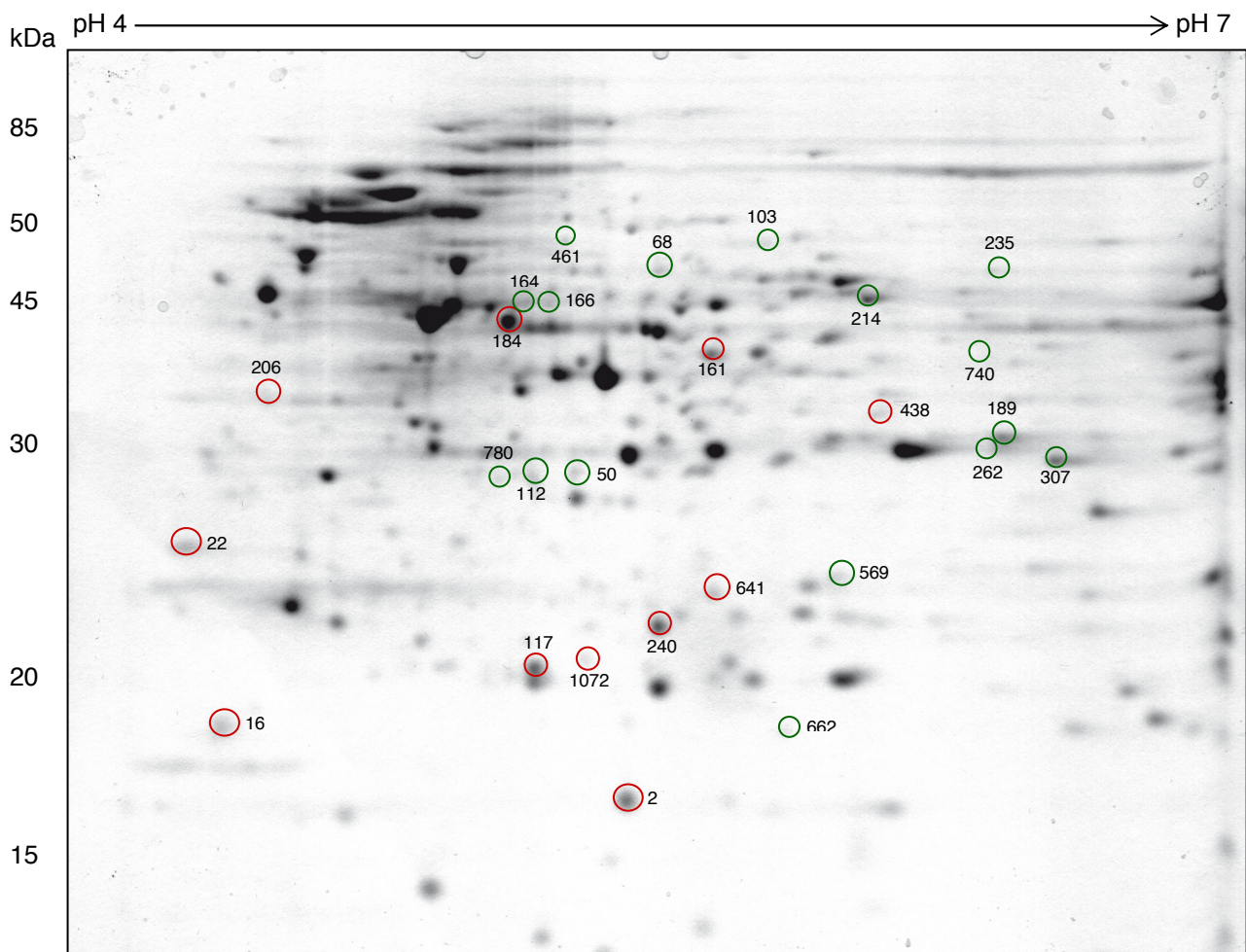
Neun Proteine zeigten eine vermehrte Akkumulation in Antwort auf Iprovalicarb, aber nicht nach Behandlung mit Dimethomorph. Lediglich zwei dieser Spots wurden herabreguliert. Die Malat-Dehydrogenase (Spot 141 und 1065), die Quinon-Oxidoreduktase (Spot 173 und 1009) und die Nukleosid-Diphosphat-Kinase B (Spot 182) wurden z. B. hochreguliert, während das Wd-repeat Protein (Spot 135) und die 26S Proteasom regulatorische Partikel Nicht-ATPase Untereinheit 12 (Spot 730) im Vergleich zur Kontrolle ein verringertes Volumen aufwiesen.

**Tabelle 3.4:** Mittels ESI-Qq-TOF identifizierte Proteine von *P. infestans*, die nach Behandlung mit 0,15 ppm Dimethomorph im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mindestens 20% abweichen.

Spot-Nr.	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen-änderung [%]	ID-Nummer	IEP	MW [kDa]	Protein-Identität
1	1.732	+194,8	PITT_07056	6,89	47,88	Isocitrat-Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer
6	678	+203,9	PITT_03750	6,32	66,75	konserviertes hypothetisches Protein
16	1.437	-42,9	PITT_05582	5,37	22,28	konserviertes hypothetisches Protein
22	1.465	-50,6	PITT_07328	6,30	23,92	Superoxid-Dismutase
26	1.906	+75,2	PITT_01072	5,98	84,97	5-Methyltetrahydropteroyltriglutamat-Homocystein-Methyltransferase
28	403	+109,5	PITT_00804	6,43	57,26	T-Komplex-Protein1 δ-Untereinheit
32	501	+57,3	PITT_18538	5,42	76,47	konserviertes hypothetisches Protein
39	591	-29,7	PITT_07048	7,83	24,49	Superoxid-Dismutase, mitochondrialer Vorläufer
47	323	+96,8	PITT_08445	6,56	44,10	Cystathionin-γ-Lyase
63	164	+55,6	PITT_13265	6,32	37,22	Adenosin-Kinase
69	804	+88,1	PITT_01408	6,68	36,38	hypothetisches Protein, ähnlich zu D-Lactat-Dehydrogenase
81	1.512	+85,0	PITT_02049	6,70	52,22	Citrat-Synthase, mitochondrialer Vorläufer
85	791	-33,8	PITT_13763	5,60	20,84	konserviertes hypothetisches Protein
87	960	+45,5	PITT_03856	5,62	52,44	konserviertes hypothetisches Protein
97	754	+59,9	PITT_03593	6,42	54,10	Alanin-Aminotransferase 2
109	1.319	-34,7	PITT_08591	4,79	15,91	konserviertes hypothetisches Protein
110	879	+71,5	PITT_21806	6,43	46,73	Fumarylacetoacetase
114	1.409	+71,9	PITT_00146	6,86	62,05	Glukose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase
117	393	+41,5	PITT_03226	6,66	46,56	konserviertes hypothetisches Protein
125	814	+33,9	PITT_10929	6,24	28,06	Proteasom-Untereinheit α-Typ 1
131	712	+61,0	PITT_17123	5,84	58,36	T-Komplex-Protein1 γ-Untereinheit
134	1.069	+29,5	PITT_17013	7,17	95,96	konserviertes hypothetisches Protein
141	1.055	+29,2	PITT_15476	6,53	36,41	Malat-Dehydrogenase
151	1.344	+39,5	PITT_02567	5,08	59,19	T-Komplex-Protein1 α-Untereinheit
166	935	-23,5	PITT_05464	6,08	27,08	hypothetisches Protein
673	2.693	+45,5	PITT_09402	4,56	25,20	Phosphoglycerat-Kinase 1
725	1.117	+44,5	PITT_05117	6,61	45,72	Glycin-Amidino-transferase, mitochondrialer Vorläufer
745	584	+47,0	PITT_12788	6,80	41,27	hypothetisches Protein ähnlich zu Xenobiotik-Reduktase
786	2.681	+39,6	PITT_07400	6,98	29,29	2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat-Mutase
885	651	+30,8	PITT_02479	6,58	58,65	T-Komplex-Protein1 θ-Untereinheit
957	965	+27,0	PITT_15980	6,19	49,43	konserviertes hypothetisches Protein
1191	1.221	+37,6	PITT_06118	5,29	57,79	Vakuoläre ATP-Synthase B-Untereinheit, Isoform 1

Zwanzig Proteine zeigten eine Volumenzunahme als Antwort auf eine Behandlung mit Dimethomorph, nicht aber nach Behandlung mit Iprovalicarb. Nur vier dieser Proteine wurden herabreguliert, während die restlichen 16 Proteine im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert wurden. Die vier T-Komplex-Untereinheiten (Spots 28, 131, 151 und 885) und die Enzyme des Citrat-Zyklus, die Isocitrat-Dehydrogenase und die Citrat-Synthase (Spot 1 und 81), zeigten z. B. nach einer Behandlung mit Dimethomorph eine Volumenzunahme, wohingegen das Volumen des Aktin-depolymerisierenden Faktors (Spot 109) in Antwort auf Dimethomorph um 34,7% abnahm. Nach einer Behandlung mit Dimethomorph zeigte eine putative Endo-1,3- $\beta$ -Glukanase (Spot 6) die höchste Volumenänderung (+203,9%), wohingegen eine andere putative Endo-1,3; 1,4- $\beta$ -Glukanase (Spot 166) eine Volumenabnahme von 23,5% zeigte.

In einem nachfolgenden Experiment wurde als Vergleich auch der Effekt von Metalaxyl auf das Proteom von *P. infestans* untersucht (Abb. 3.25).



**Abb. 3.25:** Zweidimensionale Gelelektrophorese des Proteoms einer mit Metalaxyl (0,0125 ppm) behandelten, sechs Tage alten Kultur von *P. infestans* im Bereich pH 4-7. Aufgetragen sind 1 mg Gesamtprotein. Das Gel wurde Coomassie gefärbt. Proteine, die im Vergleich zur Kontrolle ein verringertes Volumen zeigten sind grün markiert, solche mit einem erhöhten Volumen rot.



Der Wirkstoff wurde in einer Konzentration von 0,025 ppm und 0,0125 ppm eingesetzt. Auch diese Werte wurden in einem radialen Myzelwachstumstest als EC50- bzw. EC50/2-Konzentrationen ermittelt. Der Wirkort von Metalaxyl ist bekannt, es inhibiert die Synthese von rRNA, und unterscheidet sich somit von dem, der für Dimethomorph und Iprovalicarb vermutet wird. Es wurden wiederum fünf unabhängige Versuche durchgeführt, wobei auch fünf unbehandelte Kulturen erneut angezogen wurden.

Das Proteom von Metalaxyl-behandelten *P. infestans* Kulturen zeigte im Vergleich zur Kontrolle schon bei der geringeren Konzentration von 0,0125 ppm einige Spots mit signifikanten Volumenänderungen (Abb. 3.25).

Sieben Spots mit einer Volumenänderung von mehr als 70% wurden detektiert, wobei die höchste Volumenänderung bei 254% lag. Zusätzliche 16 Spots zeigten eine Volumenänderung von mehr als 30% (Tabelle 3.5) und weitere fünf Spots wiesen eine Volumenänderung von mehr als 25% auf. Dabei zeigten 16 Spots ein verringertes Volumen im Vergleich zur Kontrolle, während zwölf Proteine hochreguliert wurden.

**Tabelle 3.5:** Proteine von *P. infestans*, die nach Behandlung mit 0,0125 ppm Metalaxyl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mindestens 20% abweichen.

Protein- Nummer	Kontrolle		0,0125 ppm Metalaxyl		
	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen- STD [%]	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumen- STD [%]	Volumen- änderung [%]
2	700	24,6	2.481	20,1	+254,3
16	1.064	9,2	1.955	18,1	+83,8
22	976	27,2	1.913	22,8	+96,0
50	1.712	12,3	907	15,5	-47,1
68	963	14,5	593	21,2	-38,5
112	2.548	10,0	1.643	8,3	-35,5
117	1.184	14,8	2.274	31,7	+92,1
161	327	11,0	606	17,9	+85,2
164	984	13,2	542	18,3	-44,9
166	976	7,9	546	16,6	-44,1
184	844.248	19,1	1.477	6,3	+74,97
189	1.999	11,5	1.463	31,5	-26,8
206	1.865	21,8	2.500	11,4	+34,1
214	3.633	6,3	2.635	15,9	-27,5
235	661	2,7	442	19,0	-33,1
240	1.851	16,5	2.707	21,1	+46,2
262	1.527	8,4	1.008	13,9	-34,0
304	863	14,4	1.215	6,4	+40,8
307	2.940	10,4	2.119	21,0	-27,9
438	239	29,4	440	28,7	+84,2
461	496	16,4	346	10,0	-30,2
569	1.665	23,6	1.237	22,1	-25,7
641	970	14,4	1.278	43,0	+31,8
662	1.169	16,7	747	12,3	-36,1
740	399	6,2	266	19,4	-33,5
780	691	11,9	464	16,2	-32,9
1038	746	7,2	554	12,5	-25,7
1072	466	31,9	612	22,5	+31,4

So betrug die Volumenänderung der Aldehyd-Dehydrogenase (Spot 164 und 166) -44% und auch das Volumen der Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase war als Antwort auf eine Behandlung mit Metalaxyl um 33,1% reduziert. Das Protein Henna dagegen zeigte nach Behandlung mit Metalaxyl eine Volumenzunahme von 75%, sowie auch das Peroxiredoxin-2 in Anwesenheit dieses Wirkstoffes ein um 92% gesteigertes Volumen zeigte. Zwei Spots (Spot 740 und 189), die als Fumarylacetoacetase und Malat-Dehydrogenase annotiert sind, zeigten sowohl nach Behandlung mit Iprovalicarb und Dimethomorph als auch in Anwesenheit von Metalaxyl ein geändertes Volumen. Weitere zwei Spots (Spot 307 und 662) zeigten nach Behandlung mit Iprovalicarb sowie Metalaxyl eine Volumenänderung.

**Tabelle 3.6:** Mittels ESI-Qq-TOF identifizierte Proteine von *P. infestans*, die nach Behandlung mit 0,0125 ppm Metalaxyl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um mindestens 20% abweichen.

Spot-Nr.	Ø Volumen [dimensionslos]	Volumenänderung [%]	ID-Nummer	IEP	MW [kDa]	Protein-Identität
2	2.481	+254,3	PITT_15388	5,06	20,48	konserviertes hypothetisches Protein
16	1.955	+83,8	PITT_12528	4,14	19,33	hypothetisches Protein
22	1.913	+96,0	PITT_01082	4,77	23,03	konserviertes hypothetisches Protein
50	907	-47,1	PITT_13305	5,20	32,76	konserviertes hypothetisches Protein
112	1.644	-35,5	PITT_12158	4,86	37,06	konserviertes hypothetisches Protein
117	2.274	+92,1	PITT_15492	4,83	21,90	Peroxiredoxin-2
161	606	+85,2	PITT_11719	5,47	45,97	4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase
164	542	-44,9	PITT_18012	5,14	53,71	Aldehyd-Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer
166	546	-44,1	PITT_18012	5,14	53,71	Aldehyd-Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer
184	1.477	+75,0	PITT_02210	4,74	43,27	Protein Henna
189	1.463	-26,8	PITT_15476	6,53	36,41	Malat-Dehydrogenase
214	2.635	-27,5	PITT_02925	6,38	56,53	Ketolsäure-Reduktoisomerase
235	442	-33,1	PITT_16005	6,90	56,34	Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer
240	2.707	+46,2	PITT_13116	5,03	27,10	Triosephosphat-Isomerase
307	2.119	-27,9	PITT_13614	6,86	35,44	Malat-Dehydrogenase, mitochondrialer Vorläufer
438	440	+84,2	PITT_15449	6,52	43,54	verzweigt-kettige-Aminosäure Aminotransferase
662	747	-36,1	PITT_13761	6,35	20,84	konserviertes hypothetisches Protein
740	266	-33,5	PITT_21806	6,43	46,73	Fumarylacetoacetase
1072	612	+31,4	PITT_00765	4,98	22,26	Uridylat-Kinase

Proteine, die als hypothetisch annotiert waren, wurden mit Hilfe einer BLASTp-Suche identifiziert (Tabelle 3.7).

**Tabelle 3.7:** Hypothetische Proteine, die mittels BLASTp-Suche identifiziert wurden.

Spot-Nr.	Protein-Identität	E value
6	mögliche Endo-1,3- $\beta$ -Glukanase	4e-74
16	GST	7e-28
85	Quinon-Oxidoreduktase	1e-64
87	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase, cyclophilin-type family	1e-122
109	Actin-depolymerisierender Faktor, Cofilin	3e-27
117	GST	2e-36
134	Stress-induziertes Protein sti1-like Protein	4e-127
135	ähnlich zu wd-repeat Protein	2e-125
166	putative Endo-1,3;1,4- $\beta$ -Glukanase	9e-145
173	Quinon-Oxidoreduktase QR2	3e-65
730	26S Proteasom regulatorisches Partikel nicht-ATPase Untereinheit 12	6e-54
957	putative Endo-1,3- $\beta$ -Glukanase	2e-62
1009	Quinon-Oxidoreduktase QR2	3e-65
2	Phenolsäure-Decarboxylase	4e-05
16	mögliches p23 Cochaperon	7e-15
22	Ran GTPase Bindeprotein	5e-34
50	Aldose 1-Epimerase, möglich	4e-46
112	Annexin	2e-74
662	Quinon-Oxidoreduktase QR2	3e-65



### 3.7 Phylogenetische Analyse der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase

Um die phylogenetische Verteilung der Cellulose-Synthase und der Chitin-Synthase innerhalb der Eukaryoten und Prokaryoten zu bestimmen, wurde eine phylogenetische Analyse nach der NeighborNet-Methode (Bryant und Moulton 2004) durchgeführt. Dazu wurden zunächst mit Hilfe der Cellulose-Synthase 1-Sequenz von *P. infestans* (Zugangs-Nr. ABP96902) bzw. der Chitin-Synthase-Sequenz des Oomyceten *Saprolegnia monoica* (Zugangs-Nr.: AAC49743) als Suchsequenz in einer BLASTp-Suche verschiedene Cellulose-Synthase-Sequenzen bzw. Chitin-Synthase-Sequenzen identifiziert. Einige Aminosäuresequenzen wurden ausgewählt und ein Alignment mit MUSCLE (Edgar 2004) erstellt. Aus dem Alignment wurde dann das Netzwerk abgeleitet.

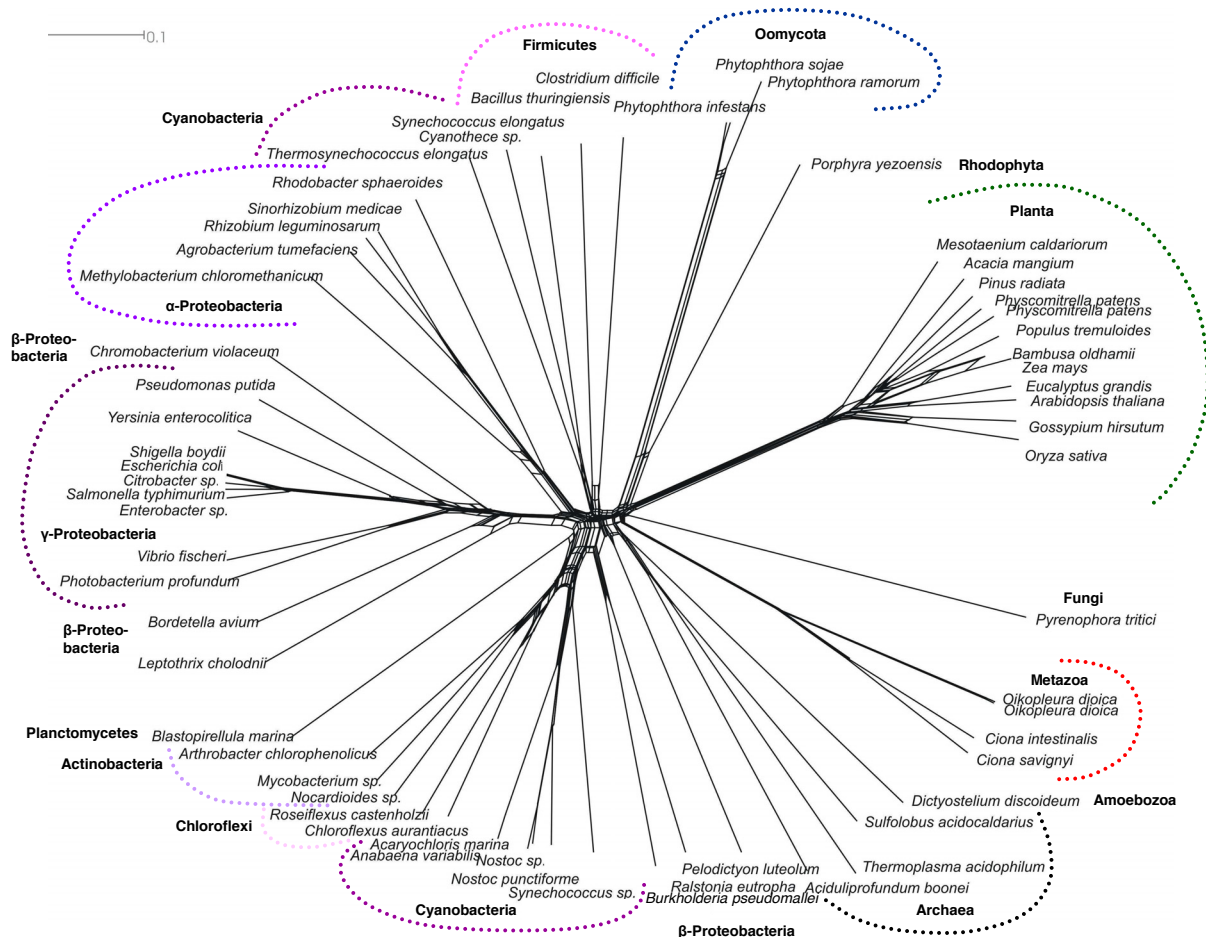


Abb. 3.26: Phylogenetische NeighborNet-Analyse der Cellulose-Synthase-Sequenzen. Der Skalierungsbalken zeigt 0,1 Aminosäureaustausch pro Position an. Die Zugangsnummern der Sequenzen befinden sich im Anhang.

Das Netzwerk der Cellulose-Synthase enthält sowohl eukaryotische als auch prokaryotische Sequenzen (Abb. 3.26). Innerhalb der Prokaryoten ist die Cellulose-Synthase sowohl bei den α-, β- und γ-Proteobakterien als auch bei den Cyanobakterien, den *Firmicutes*, den *Chloroflexii* und den Aktinobakterien zu finden. Bei den Eukaryoten sind

Homologe der Cellulose-Synthase sowohl bei Pflanzen, Algen, Oomyceten, Urochordaten, Amoebozoen und sogar bei Pilzen verbreitet. *Porphyra yezoensis* bildet einen gemeinsamen Split mit den Oomyceten.

Das Netzwerk der Chitin-Synthase enthält hauptsächlich eukaryotische Sequenzen von Pilzen und Tieren (Abb. 3.27). Aber auch innerhalb der Amoebozoen, Ciliaten und Oomyceten wurden Homologe der Chitin-Synthase identifiziert. Bei den Bakterien wurden ebenfalls Homologe der Chitin-Synthase gefunden. Die Oomyceten bilden eine monophyletische Gruppe. Ein Split trennt die Pilze und Oomyceten von den Bakterien, Tieren und Protisten.

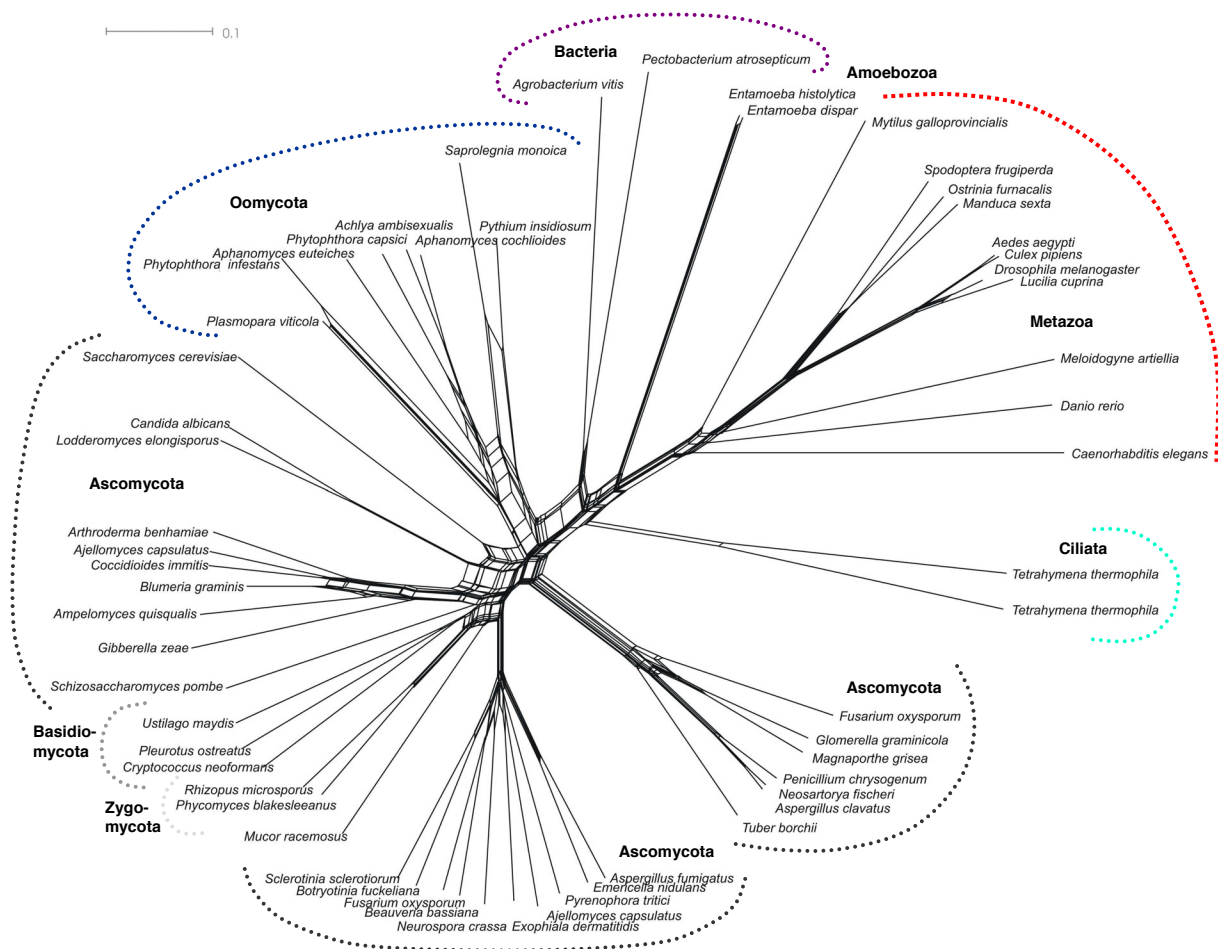


Abb. 3.27: Phylogenetische NeighborNet-Analyse der Chitin-Synthase-Sequenzen. Der Skalierungsbalken zeigt 0,1 Aminosäureaustausch pro Position an. Die Zugangsnummern der Sequenzen befinden sich im Anhang.

## 4. Diskussion

Iprovalicarb und Dimethomorph sind zwei Oomyceten-spezifische Wirkstoffe mit bisher unbekanntem Wirkungsmechanismus zur Bekämpfung wichtiger Pflanzenpathogene. Die Bestimmung des Wirkungsmechanismus ist für den optimalen Einsatz der Präparate im Rahmen eines ausgewogenen Resistenzmanagements hilfreich. Aufgrund von vorhergehenden Studien zum Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb wird vermutet, dass der Wirkstoff direkt oder indirekt die Synthese bzw. gesteuerte Ausrichtung von Zellwandelementen stört. Auch der Wirkort von Dimethomorph wird im Bereich der Zellwandsynthese vermutet (Kuhn *et al.* 1991). Damit unterscheiden sich Iprovalicarb und Dimethomorph vom RNA-Polymerase 1-Inhibitor Metalaxyl und anderen Oomyceten-spezifischen Wirkstoffen, wie z. B. die Atmungsketten-Inhibitoren Cyazofamid und Zoxamid, deren Wirkort eindeutig klassifiziert wurde.

### 4.1 Herstellung von Antikörpern gegen Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase

Da der Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph im Bereich der Zellwandsynthese vermutet wird, sollte die Lokalisation der Chitin-Synthase und der Cellulose-Synthase verfolgt werden. In *Arabidopsis* konnte mit Hilfe von YFP-markierter Cellulose-Synthase gezeigt werden, dass die Cellulose-Synthase-Inhibitoren Isoxaben und 2,6-Dichlorobenzonitril (DCB) einen Effekt auf die Lokalisation und Beweglichkeit der Cellulose-Synthase ausüben. Isoxaben führte zu einem Verlust der Cellulose-Synthase in der Plasmamembran, während eine Behandlung mit DCB zu einer Akkumulation der Cellulose-Synthase innerhalb der Plasmamembran führte (DeBolt *et al.* 2007). Um die Lokalisation der Cellulose-Synthase und der Chitin-Synthase in *P. infestans* zu detektieren, wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen vier cytosolische Domänen der Cellulose-Synthase (CesA, CesB, CesC, CesD) und zusätzlich gegen zwei cytosolische Domänen der Chitin-Synthase (ChiS, ChiS2) hergestellt. Dazu wurden diese Domänen heterolog mit Hilfe des Vektors pET28a(+) in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Expression aller Domänen war erfolgreich, jedoch lagen bis auf CesD alle rekombinanten Domänen in Inclusion Bodies vor. Die aus gereinigten Inclusion Bodies isolierten Proteine CesA, CesB, CesC sowie ChiS1 und ChiS2 wurden für eine Immunisierung genutzt. Die gereinigten Antikörper erkannten alle hochspezifisch ihr Antigen, jedoch lediglich Anti-CesA1, Anti-CesB1, Anti-CesB2 und Anti-ChiS1a erkannten auch in der Fraktion der DRM von *P. infestans* ein Signal mit der für Cellulose-Synthase bzw. Chitin-Synthase entsprechenden Größe von ca. 100 kDa. Daher wurden Anti-CesB1 und Anti-ChiS1a für Immunofluoreszenzfärbungen eingesetzt.

## 4.2 Lokalisation der Cellulose-Synthase

Die Hauptbestandteile der Zellwand von *P. infestans* sind  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glukane und Cellulose, die als lange Mikrofibrillen oder amorphes Material vorliegen (Bartnicki-Garcia und Wang 1983). Trotz der wirtschaftlichen Bedeutung von Oomyceten-Krankheiten ist relativ wenig über die Synthese von Cellulose in Oomyceten bekannt. Selbst die korrespondierenden Gene waren zu Beginn dieser Arbeit unbekannt. Falls die in Oomyceten ablaufenden Prozesse der Zellwand-Synthese in höheren Pflanzen ähneln, wofür die phylogenetische Herkunft der Oomyceten spricht, so wären verschiedene Faktoren involviert. Zum einen sollte die Cellulose-Synthase in Form einer hexameren aktiven Rosette vorliegen, zum anderen sollte das Substrat dieses Enzyms im Golgi-Apparat und im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und in Vesikeln entlang von Mikrotubuli zur Plasmamembran transportiert werden. Des Weiteren würden eine intakte Plasmamembran und kortikale Mikrotubuli, die parallel unterhalb der Plasmamembran ausgerichtet sind und eine stabile Orientierung der beweglichen Rosetten ermöglichen, benötigt.

Mit Hilfe des Antikörpers Anti-CesB1 konnte in Zoosporangien von *P. infestans* keine Cellulose-Synthase lokalisiert werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Grenville-Briggs *et al.* (2008) überein, die CesA-Proteine weder in der Plasmamembran von Sporangien noch von Zoosporen identifizieren konnten. Sporangien und Zoosporen sind jedoch keine aktiv wachsenden Zellen, die eine Zellwandneusynthese benötigen würden. Die Autoren vermuten daher, dass die Biosynthese von Cellulose eher für die Produktion von Keimschläuchen und Appressorien, von Bedeutung ist. In der Plasmamembran von Hyphen konnte in dieser Arbeit die Cellulose-Synthase lokalisiert werden. Nach einer Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des Anti-CesB1-Antikörpers war eine gleichmäßig punktförmige Färbung um das gesamte Hyphenlumen zu beobachten. Es wurde keine besondere Anreicherung in der Hyphenspitze beobachtet. Durch eine zweistündige Behandlung mit 0,25 ppm Iprovalicarb änderte sich die Verteilung der Cellulose-Synthase. Die gleichmäßige Verteilung der Färbung der Hyphen war nicht mehr detektierbar. Stattdessen waren stärker fluoreszierende vereinzelte Agglomerate zu beobachten, die auf eine partielle Akkumulation der Cellulose-Synthase hindeuten. Dies ähnelt einer Behandlung von *Arabidopsis* mit DCB, die ebenfalls zu einer Akkumulation von unbeweglichen YFP-markierten Cellulose-Synthasen führte, die als deutliche Punkte visualisiert wurden (DeBolt *et al.* 2007).

Jende (2001) konnte in Studien zum Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb in einem direkten Cellulose-Nachweis mit Hilfe der Enzym-Gold-Markierung eine im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle um 18% erhöhte spezifische Markierungsdichte für Cellulose in den Hyphen von *P. infestans* nachweisen. Vereinzelt war nach einer Behandlung mit Iprovalicarb eine Akkumulation der Goldpartikel zu beobachten. Hyphenquerschnitte zeigten außerdem

Ausstülpungen der äußeren Zellwandschicht, von denen sich Vesikel abschnürten. Bei auf Wirkstoff-freiem Agar entwickelten Hyphen waren die Goldpartikel gleichmäßiger im Bereich der Zellwand verteilt und bildeten eine deutliche, plane Abschlusschicht. Jende schließt aus diesen Ergebnissen, dass Iprovalicarb keinen inhibierenden Einfluss auf die Synthese von Cellulose ausübt. Mehl (2006) bestätigte diese Schlussfolgerungen. Eine Behandlung mit Iprovalicarb führte zu keiner Hemmung des Einbaus  $^{14}\text{C}$ -markierter Substrate in Polymere. Mehl folgerte daher, dass Iprovalicarb keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Glukan-Synthasen und somit auf die Cellulose-Synthase hat.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen in Bestätigung der Ausgangshypothese, dass die Cellulose-Synthase nach einer kurzzeitigen Behandlung mit Iprovalicarb tatsächlich eine veränderte Lokalisation aufweist.

Eine zweistündige Behandlung mit 0,3 ppm Dimethomorph bzw. 0,025 ppm Metalaxyl hatte keine Änderung der Lokalisation der Cellulose-Synthase im Vergleich zur Kontrolle zur Folge. Auch diese Ergebnisse sind mit denen von Jende (2001) übereinstimmend. Die Markierungsdichte für Cellulose war nach einer Behandlung mit Dimethomorph im Vergleich zur Kontrolle unverändert und auch eine partielle Akkumulation von Goldpartikeln wurde nicht beobachtet.

#### **4.3 Die Rolle der Mikrotubuli bei der Synthese der Cellulose**

In Pflanzen wird die Lage bzw. Bewegung der Cellulose-Synthase durch kortikale Mikrotubuli festgelegt. Paredez *et al.* (2006) detektierten YFP:CESA6 im Hypokotyl transgener *Arabidopsis* Pflanzen als eigenständige Partikel in der Plasmamembran, die in einer linearen Anordnung organisiert waren. Diese Partikel bewegten sich mit gleichmäßiger Geschwindigkeit bidirektional in ungefähr linearen Bahnen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 330 nm/min, was der Addition von 300-1.000 Glukose-Molekülen pro Glukan-Kette pro Minute entspricht. Coexpression von CFP: $\alpha$ -Tubulin und YFP:CESA6 zeigte, dass sich die CESA-Partikel an Schienen entlang bewegen, die von Mikrotubuli definiert wurden (Paredez *et al.* 2006). Der Abbau der Mikrotubuli-Anordnung mit dem Herbizid Oryzalin führte zu markanten Änderungen in der Organisation und dem Verhalten von CESA6, jedoch nicht zu einer Reduktion von CESA6 in der Membran. Die CESA6-Partikel aggregierten und bewegten sich in Schwärmen. Dies lässt vermuten, dass Mikrotubuli die Orientierung der Bewegung der Komplexe gewähren, aber nicht für die Exozytose und die Beweglichkeit an sich benötigt werden. Dies unterstützt die Idee, dass die treibende Kraft für die Beweglichkeit durch die Polymerisation der Cellulose geliefert wird (Robinson 1981). Mikrotubuli haben einen definierenden Einfluss auf die Verteilung und Bewegung der CESA-Rosette, aber in deren Abwesenheit ist die Bewegung nicht chaotisch, was eine hohe Fähigkeit zur Selbstorganisation suggeriert (Emons 2000).

Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass GFP-CESA3 in *Arabidopsis* nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch im Golgi-Apparat, im *trans*-Golgi-Netzwerk und in einem neuen Kompartiment, dem Mikrotubuli-assoziierten Cellulose-Synthase-Kompartiment (MASC), nachgewiesen werden kann (Crowell *et al.* 2009). Die Bildung und Bewegung dieses Kompartimentes hängt von der Anordnung der kortikalen Mikrotubuli ab. Osmotischer Stress oder eine Behandlung mit dem Cellulose-Synthase-Inhibitor CGA 325'615 führte zur Internalisierung von Cellulose-Synthase-Komplexen in MASCs. Die Autoren vermuten, dass diese Internalisierung die Synthese von Cellulose reguliert (Crowell *et al.* 2009; Farquharson 2009). Sie zeigten weiterhin, dass Golgi-Körperchen an einzelnen Stellen entlang der kortikalen Mikrotubuli pausieren und dass diese Pausen mit der Insertion der Cellulose-Synthase in die Plasmamembran einhergehen. Kortikale Mikrotubuli definieren in Pflanzen also nicht nur die Bewegung der Cellulose-Synthase in der Plasmamembran, sondern regulieren auch die Exo- und Endozytose dieses Komplexes.

Falls kortikale Mikrotubuli auch in Oomyceten an der Verteilung und Bewegung der Cellulose-Synthase beteiligt sind, könnte die veränderte Lokalisation dieses Enzyms nach einer Behandlung mit Iprovalicarb auf Störungen in der Organisation der Mikrotubuli zurückzuführen sein.

In den Untersuchungen von Jende (2001) konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Iprovalicarb tatsächlich die Anordnung der Mikrotubuli in *P. infestans* veränderte. In Hyphen von unbehandelten Kulturen lagen die Mikrotubuli als globuläre Strukturen vor, die durch Filamente zu einem maschenartigen Netzwerk verbunden waren. Eine Behandlung mit Iprovalicarb führte zur Bildung dickerer, längerer Filamente, während die globulären Strukturen nicht mehr zu erkennen waren. Jende vermutete, dass die globulären Strukturen eine Verbindung zwischen der Plasmamembran und dem filamentösen Mikrotubuli herstellen. Wymer und Lloyd (1996) vermuteten ebenfalls, dass Rezeptoren in der Plasmamembran von *Pisum sativum* kortikale Mikrotubuli mit Cellulose-Mikrofibrillen verbinden. Das Fehlen der globulären Strukturen nach Wachstum in Anwesenheit von Iprovalicarb, würde die Verbindung zwischen der Plasmamembran und den filamentösen Mikrotubuli zerstören. Sollte in *P. infestans* wie in höheren Pflanzen eine gerichtete Bewegung der Cellulose-Synthase und die Ausrichtung neu gebildeter Cellulose-Mikrofibrillen durch Mikrotubuli kontrolliert werden, so könnte eine Behandlung mit Iprovalicarb zu einem Kontrollverlust der Mikrotubuli über die Cellulose-Synthase und Cellulose-Mikrofibrillen führen.

Eine direkte Wirkung von Iprovalicarb auf die Polymerisation von Mikrotubuli wurde jedoch ausgeschlossen (Mehl 2006). Der Zellteilungs- und Mitosehemmer Colchicin verhindert durch Bindung an Tubulin die Ausbildung des Spindelapparates und kortikaler Mikrotubuli (Hardham und Gunning 1978; Salmon *et al.* 1984). Eine Behandlung von

*P. infestans* mit Colchicin verursachte morphologische Änderungen, die sich deutlich von den durch Iprovalicarb bedingten Änderungen unterscheiden. Eine Behandlung mit Dimethomorph hatte keinen Einfluss auf die Anordnung der Mikrotubuli (Jende 2001).

In Pflanzen steuert die Lage der Cellulose-Synthase in der Membran die Ausrichtung der Cellulose-Mikrofibrillen. Bei der Orientierung der Ausrichtung der Cellulose-Mikrofibrillen spielen also auch Mikrotubuli eine Rolle (Green 1962). Die partielle Akkumulation der Goldpartikel nach einer Behandlung mit Iprovalicarb in einem direkten Cellulose-Nachweis mit Hilfe der Enzym-Gold-Markierung zeigte, dass die Anordnung und Lokalisation der Cellulose-Mikrofibrillen in der Zellwand von *P. infestans* durch Iprovalicarb gestört wird (Jende 2001). Da die Zellwand nach einer Behandlung mit Iprovalicarb eine verminderte Stabilität und Starrheit aufwies, vermutete Jende, dass kürzere Fibrillen gebildet werden, die der Zellwand nicht dieselbe Stabilität verleihen wie längere Mikrofibrillen. Möglicherweise können kürzere Cellulose-Mikrofibrillen aufgrund der fehlenden Vernetzung kein stabiles Gerüst aufbauen und somit der Zellwand nicht die nötige Starrheit verleihen.

Auch diese Ergebnisse konnten von Mehl (2006) bestätigt werden. Nach einer Behandlung mit Iprovalicarb konnte durch eine Fluoreszenz-Färbung polymerer Hexosen, und somit auch von Cellulose, in regenerierenden Protoplasten von *P. infestans* eine im Vergleich zur Kontrolle ca. 30-40% erhöhte Fluoreszenz ermittelt werden (Mehl und Buchenauer 2001). Mehl vermutet, dass die erhöhte Fluoreszenz die Folge einer erhöhten Glukan-Synthese in Anwesenheit von Iprovalicarb sein könnte. Regenerierende Protoplasten zeigten in Gegenwart von Iprovalicarb tubenförmige Gebilde, die in Keimschläuchen unbehandelte Protoplasten aus den Zellen in signifikant breiterem Durchmesser herauswuchsen. Die Tuben zeigten außerdem eine stärkere Fluoreszenz und eine längs- und quergestreifte Anordnung der gefärbten Bereiche. Mehl folgert, dass diese Bereiche Bündel von Cellulose-Mikrofibrillen innerhalb der Zellwand darstellen, deren Vernetzung durch Iprovalicarb beeinträchtigt wurde.

Die in dieser Arbeit beobachtete Akkumulation der Cellulose-Synthase als Antwort auf Iprovalicarb könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Cellulose-Synthase nicht mehr in der Lage ist sich innerhalb der Membran zu bewegen. Dies hätte möglicherweise, wie von Jende (2001) und Mehl (2006) vermutet, zur Folge, dass nur kürzere Mikrofibrillen gebildet werden, deren Vernetzung außerdem beeinträchtigt ist.

#### **4.4 Lokalisation der Chitin-Synthase**

Nach neueren Erkenntnissen sind Oomyceten im Laufe der Evolution aus einer Endosymbiose von Protozoen und Rotalgen entstanden (Adl *et al.* 2005). Die Zellwand einiger Oomyceten enthält neben Cellulose auch geringe Mengen von Chitin (Lin und Aronson 1970). Chitin ist die Hauptkomponente der Zellwand der Pilze und wird dort von der

Chitin-Synthase synthetisiert. Sowohl für Pilze als auch für Insekten wurde der geregelte Transport der Chitin-Synthase in spezifischen Vesikeln, die als Chitosomen bezeichnet werden, beschrieben (Bracker *et al.* 1976; Ruiz-Herrera *et al.* 1977; Binnington 1985). Vermutlich dienen auch hier Mikrotubuli als Leitbahnen für den Transport dieser Vesikel. Weder das Vorkommen von Chitosomen noch die Beteiligung von Mikrotubuli an der gerichteten Bewegung der Chitin-Synthase wurde für Oomyceten beschrieben.

Mit Hilfe von Texas Red-markiertem Wheat Germ Agglutinin, das mit abnehmender Spezifität an  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)<sub>3</sub> und  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)<sub>2</sub>N-Acetylneuraminsäure bindet, ließen sich weder die Zellwände von Sporangien noch von Hyphen markieren. Lediglich an auskeimenden Sporangien war an der Keimungsstelle eine Akkumulation des Farbstoffs zu beobachten. Auch die Chitin-Synthase wurde mit Hilfe des Anti-ChiS1a-Antikörpers ausschließlich dort lokalisiert. Hier wurde erstmals gezeigt, dass und wo eine Chitin-Synthase in *P. infestans* exprimiert wird. Weder eine zweistündige noch eine 24stündige Behandlung mit 0,25 ppm Iprovalicarb; 0,3 ppm Dimethomorph und 0,025 ppm Metalaxyl hatte einen Einfluss auf den Nachweis der Zucker  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)<sub>3</sub> und  $\beta$ -(D-1,4-N-Acetylglucosamin)<sub>2</sub>N-Acetylneuraminsäure bzw. auf die Lokalisation der Chitin-Synthase.

#### **4.5 Lokalisation der Cellulose Synthase und Chitin Synthase in Lipid Rafts**

Lipid Rafts sind flüssig-geordnete Mikrodomänen in der Zellmembran, die einen höheren Gehalt an gesättigten Fettsäuren und Sterolen aufweisen als andere Bereiche der Membran (Insenser *et al.* 2006). Diese Cholesterol- und Sphingolipid-reichen Domänen sind bei 4°C in dem Detergenz Triton X-100 unlöslich und werden daher als Detergenz-resistente Membranen (DRM) bezeichnet. Lipid Rafts bilden organisatorische Einheiten und sind an vielen zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion, der Immunantwort und dem Membrantransport beteiligt (Arora *et al.* 2004, Kim *et al.* 2008). Daher müssen auch die an diesen Prozessen beteiligten Proteine in den Rafts organisiert sein. Möglicherweise sind auch die Enzyme, die verantwortlich für die Biosynthese der Zellwand sind, in Lipid Rafts organisiert.

Aufgrund des hohen Lipidgehaltes ordnen sich Lipid Rafts in einer Dichtegradienten-Zentrifugation, bei einer niedrigen Dichte an (Brown und Rose 1992). Mit milderem Detergenzien wie Octylglucosiden können Detergenz-resistente Membranen solubilisiert werden (Simons und Ikonen 1997) und die darin lokalisierten Proteine zugänglich gemacht werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Western Transfer-Analysen und Immunodetektionen mit Cellulose-Synthase- bzw. Chitin-Synthase-spezifischen Antikörpern zeigen, dass beide Enzymkomplexe in DRM lokalisiert sind. Diese Ergebnisse wurden von Bessueille und



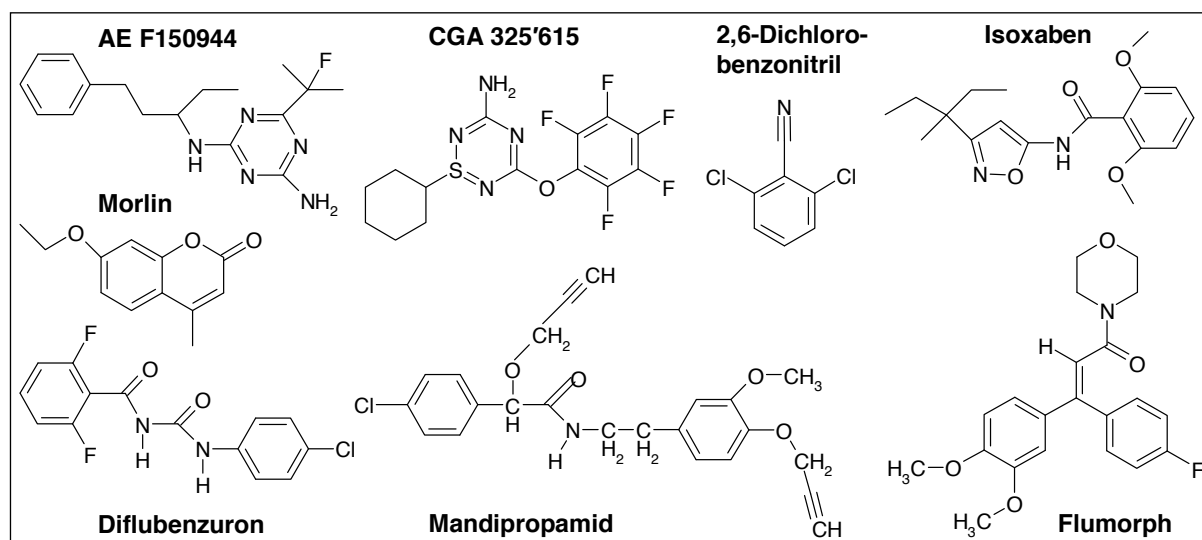
Bulone (2008) bestätigt, die eine Lokalisation der pflanzlichen Cellulose-Synthase in DRM zeigten. Darüber hinaus zeigten sie, dass die isolierten DRM in der Lage waren *in vitro* Polysaccharide zu synthetisieren, die als Callose und Cellulose identifiziert werden konnten. Außerdem zeigten Schrick *et al.* (2004) bereits, dass Sterole, die in DRM angereichert sind, sowohl für die Synthese von Cellulose als auch für die Elongation und Ausdehnung der Zellwand in *A. thaliana* wichtig sind. Bessueille und Bulone (2008) spekulierten daher, dass einige Lipide aus der Familie der Sterole für die Stabilität der Cellulose-Synthase-Komplexe in der Plasmamembran benötigt werden. Auch Briolay *et al.* (2009) lokalisierten sowohl die Chitin-Synthase als auch die Cellulose-Synthase des Oomyceten *Saprolegnia monoica* in DRM.

In verschiedenen Pilzen wurden Sterol-reiche Mikrodomänen identifiziert (Wachtler und Balasubramanian 2006). Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff Filipin, der spezifisch an Sterole bindet, genutzt, um Regionen in der Plasmamembran, die einen hohen Gehalt an Sterolen aufweisen, zu identifizieren (Severs 1997). In *Schizosaccharomyces pombe* z. B. sind die Sterol-reichen Mikrodomänen auf die Hyphenspitze und die Spaltungsstelle konzentriert (Wachtler *et al.* 2003). Auch in dem Humanpathogen *Cryptococcus neoformans* sind die Sterole auf die Knospenspitze und das Septum konzentriert (Martin und Konopka 2004). An den Hyphenspitzen findet bei Pilzen das Wachstum statt, wobei sich ein so genannter Spitzenkörper bildet, der auch die Enzyme der Zellwandbiosynthese organisiert (Steinberg 2007). Im Bereich des Spitzenkörpers ist die Zellmembran also reich an Lipid Rafts.

Inwieweit die Zellwandbiosynthese auch in Oomyceten Lipid Rafts an den wachsenden Hyphenspitzen erfordert, ist nicht bekannt. Viele Oomyceten können selber keine Sterole synthetisieren, aber die Aufnahme aus der Umgebung ist für das Wachstum der Oomyceten essentiell (Attard *et al.* 2008, Marshall *et al.* 2001). Daher wurde die Färbung von Sterolen mit Filipin durchgeführt, um die Verteilung der Sterole nach einer Behandlung mit Iprovalicarb bzw. Dimethomorph im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten und den Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Lipid Rafts und Chitin- bzw. Cellulose-Synthase in *P. infestans* zu untersuchen. Die Färbung mit Filipin zeigte hier eine gleichmäßige Verteilung über die ganze Hyphenlänge und keine Akkumulation an der Hyphenspitze. Nach 24 Stunden zeigen einige Iprovalicarb- und Dimethomorph-behandelte Zellen eine fragmentierte Färbung.

#### 4.6 Vergleich mit Cellulose-Biosynthese-Inhibitoren der Pflanzen

Es wurden einige Wirkstoffe beschrieben, die auf die Biosynthese von Cellulose in höheren Pflanzen einwirken. CGA 325'615 inhibiert die Bildung kristalliner Cellulose durch die Aufhebung der Rosetten-Bildung (Peng *et al.* 2001). Die CESA-Untereinheiten sind zwar aktiv, aber nicht in der Lage kristalline Mikrofibrillen zu bilden. Die Dimerisierung der CESA-Untereinheiten über die Zn-Domäne findet unter oxidativen Bedingungen statt und ist notwendig für die Assemblierung der Rosette und deren Funktion. Die Rosetten werden durch Behandlung mit CGA 325'615 zerstört, während Zugabe von  $H_2O_2$  diesen Effekt komplett aufhebt. Dies deutet daraufhin, dass CGA 325'615 die Oxidation und Dimerisierung der CESA-Zn-Domäne inhibiert (Kurek *et al.* 2002). Eine Behandlung mit Iprovalicarb führt zwar auch zu einer veränderten Bildung kristalliner Mikrofibrillen, dennoch ist ein dem CGA 325'615 ähnlicher Wirkungsmechanismus ausgeschlossen, da die Cellulose-Synthase von *P. infestans* keine Zn-Domäne besitzt.



**Abb. 4.1:** Strukturformeln einiger Wirkstoffe, die die Biosynthese von Cellulose inhibieren und von dem Chitin-Synthese-Inhibitor Diflubenzuron.

Der Wirkstoff AE F150944 aus der chemischen Klasse der Aminotriazine inhibiert ebenfalls die Synthese von Cellulose (Kiedaisch *et al.* 2003). Mikroskopische und biochemische Untersuchungen an *Zinnia elegans* führten zu der Annahme, dass der Wirkstoff die Rosettenstruktur der Cellulose-Synthase destabilisiert, was eine Hemmung der Ausbildung von kristalliner Cellulose zur Folge hat.

Mehl (2006) deutete die nach einer Behandlung mit Iprovalicarb unterschiedlich mit Blancophor angefärbten Bereiche polymerer Hexosen in regenerierenden Protoplasten von *P. infestans* folgendermaßen: die stark fluoreszierenden Bereiche könnten kristalline, geordnete Cellulose-Mikrofibrillen darstellen, während die schwach markierten Zwischenräume amorphe, ungeordnete Cellulose-Strukturen sind. Mehl führt diese

alternierenden Bereiche auf eine mögliche Destabilisierung der Cellulose-Synthase-Komplexe zurück, wie für AE F150944 postuliert wird. Dies setzt allerdings voraus, dass die Cellulose-Synthase der Oomyceten wie in höheren Pflanzen als Rosette vorliegt. In *Acetobacter xylinum* und *Dictyostelium discoideum* hatte der Wirkstoff keinen Einfluss auf die Synthese von Cellulose. In beiden Organismen liegt der Cellulose-Synthase-Komplex nicht als Rosette, sondern als linearer Komplex vor.

Morlin (7-Ethoxy-4-Methyl-Chromen-2-on), ein Analog der Cumarine (Abb. 4.1), verursacht Veränderungen in der Organisation pflanzlicher Mikrotubuli und führt sowohl zu einer reduzierten Geschwindigkeit der CESA-Komplexe als auch zu einer veränderten Verteilung von CESA in der Plasmamembran. Diese Ergebnisse unterstützen die Idee, dass eine funktionelle Interaktion zwischen kortikalen Mikrotubuli und den CESA-Komplexen besteht. Eine Behandlung mit Morlin führt zu einer Bildung von kürzeren, stärker gebündelten Mikrotubuli und einer Freisetzung von der Plasmamembran. Die Autoren vermuten, dass Morlin ein Protein beeinflusst, das die Bindung der Mikrotubuli an die Membran vermittelt. Die Identifizierung des Targets von Morlin könnte Aufschlüsse über den Mechanismus der Interaktion zwischen kortikalen Mikrotubuli und der Zellmembran und der Synthese von Cellulose liefern (DeBolt *et al.* 2007).

Da auch Iprovalicarb sowohl Änderungen in der Organisation der Mikrotubuli als auch eine veränderte Lokalisation der Cellulose-Synthase bewirkt, ist ein Wirkungsmechanismus denkbar, der ebenfalls ein Protein involviert, das die Bindung der Mikrotubuli an die Membran oder eine Interaktion zwischen Mikrotubuli und der Cellulose-Synthase vermittelt. Von Jende (2001) wurde bereits vermutet, dass durch das Fehlen der globulären Mikrotubuli nach Wachstum in Anwesenheit von Iprovalicarb die Verbindung zwischen der Membran und den Mikrotubuli unterbrochen ist.

Auch für das Herbizid DCB (2,6-Dichlorobenzonitril) wurde als Wirkort ein Protein identifiziert, welches möglicherweise die Interaktion zwischen Mikrotubuli und der Cellulose-Synthase vermittelt. Pflanzen die in Anwesenheit von DCB wachsen, akkumulieren nicht-kristalline  $\beta$ -1,4-Glukane (Encina *et al.* 2002). Eine Behandlung mit DCB führte außerdem zu einer Reduktion an intakten Rosetten in der Plasmamembran des Moses *Funaria hygrometrica* und in Weizen (Herth 1987; Rudolph *et al.* 1989) und der Akkumulation von Cellulose-Synthase-Untereinheiten in der Plasmamembran von *Arabidopsis* Hypokotyl (DeBolt *et al.* 2007). Außerdem stoppt die Bewegung von CESA in der Membran von *Arabidopsis*. DCB bindet an ein kleines Protein und es wurde vermutet, dass dieses Protein die Cellulose-Synthase reguliert (Delmer *et al.* 1987). DCB induziert außerdem Änderungen im kortikalen Mikrotubuli-Netzwerk in der Alge *Pelvetia compressa* (Bisgrove und Kropf 2002) und *Arabidopsis*-Wurzeln (Himmelspach *et al.* 2003). Rajangam *et al.* (2008) identifizierten das DCB-bindende Protein der Pappel als PttMAP20 und zeigten, dass es an

Mikrotubuli bindet. PttMAP20 enthält eine hochkonservierte TPX2-Domäne, die erstmals in einem Mikrotubuli-assoziierten Protein (MAP) von *Xenopus laevis* entdeckt wurde (Wittmann *et al.* 2000). MAPs sind für die Assemblierung und Stabilität von Mikrotubuli verantwortlich (Wasteneys und Yang 2004). In Pflanzen haben viele MAPs einen Einfluss auf die Morphologie der Pflanze und auf die Orientierung der Cellulose-Mikrofibrillen (Sedbrook 2004). Die Bindung von DCB an PttMAP20 unterbindet jedoch nicht die Bindung an Mikrotubuli. Dies suggeriert, dass DCB eine andere wichtige Interaktion von PttMAP20 behindert. Die Autoren spekulieren daher, dass PttMAP20 direkt oder indirekt mit der Cellulose-Synthase assoziiert ist. Die Zerstörung dieser Interaktion durch DCB könnte die Cellulose Biosynthese von dem kortikalen Mikrotubuli-Netzwerk entkoppeln (Rajangam *et al.* 2008).

Grenville-Briggs *et al.* (2008) zeigten, dass DCB in Konzentrationen von 40 bis 100  $\mu\text{M}$  bei *P. infestans* einen inhibierenden Effekt auf die Zoosporogenese, die Encystierung und die Bildung von Appressorien ausübt. Da der Wirkort von DCB als MAP20 identifiziert wurde, setzt dies voraus, dass auch *P. infestans* dieses Protein besitzt. DCB verursacht in Pflanzen ähnlich wie Iprovalicarb bei *P. infestans* eine partielle Akkumulation von Cellulose und Cellulose-Synthase und eine Änderung der Mikrotubuli-Organisation. MAP20 oder ein Protein mit ähnlicher Funktion wäre möglicherweise als Wirkort von Iprovalicarb denkbar.

Isoxaben *N*-[3(1-ethyl-1-methylpropyl)-5-isoxazolyl] inhibiert spezifisch die Cellulose Biosynthese in höheren Pflanzen (Heim *et al.* 1990). Durch Isoxaben-resistente Mutanten (*ixr1-1*, *ixr1-2*, und *ixr2-1*) wurden zwei Gene in *Arabidopsis* beschrieben. *IXR1* kodiert für die Cellulose-Synthase katalytische Untereinheit CESA3 (Scheible *et al.* 2001), während *IXR2* für die Isoform CESA6 kodiert (Desprez *et al.* 2002). Diese Untereinheiten scheinen der direkte Wirkort von Isoxaben zu sein. Allerdings gehören die betroffenen Aminosäurereste nicht zu denen, die für die katalytische Aktivität der Cellulose-Synthase benötigt werden. Dies deutet darauf hin, dass Isoxaben nicht die katalytische Aktivität an sich inhibiert. Die Behandlung von Keimlingen mit 100 nM Isoxaben führte zu einem schnellen Verlust von YFP:CESA6-Partikeln aus der Plasmamembran. Innerhalb von fünf Minuten war die Partikel-Dichte reduziert und innerhalb von 20 Minuten waren kaum noch YFP:CESA6 in der Plasmamembran zu detektieren (Paredes *et al.* 2006).

Das Oomycetenmittel Flumorph 4-[3-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-(4-fluorophenyl)-1-oxo-2-propenyl] ist wie Dimethomorph ein Zimtsäure-Derivat (Yuan *et al.* 2006; Abb. 4.1). Beide Oomycetenmittel haben eine ähnliche Struktur (Zhu *et al.* 2008) und zeigen ein identisches Resistenzverhalten. Außerdem inhibiert Flumorph identisch zu Dimethomorph alle Stadien des Lebenszyklus von *Pseudoperonospora cubensis* mit Ausnahme der Freilassung und Beweglichkeit von Zoosporen und der Bildung von Cytosporen (Sheng Zhu *et al.* 2007). Sheng Zhu *et al.* (2007) vermuten daher, dass Dimethomorph und Flumorph den gleichen

oder zumindest einen ähnlichen Wirkungsmechanismus haben. Flumorph-behandelte Hyphen zeigten übereinstimmend zu den von Jende (2001) beobachteten Effekten von Dimethomorph auf *P. infestans* eine perlschnurartige Entwicklung. Sie zeigten auch, dass Flumorph nicht die Synthese von Zellwand-Komponenten in *P. melonis* inhibiert, sondern die polare Ausrichtung von neu synthetisiertem Zellwandmaterial während der Keimung der Cytospore und des Hyphenwachstums stört. Die Cytosporen sind in Anwesenheit von Flumorph nicht mehr in der Lage vom isotropen zum polaren Wachstum zu wechseln und können daher keinen Keimschlauch ausbilden. Sheng Zhu *et al.* (2007) führen diesen Effekt auf die Zerstörung von F-Aktin zurück. Jende (2001) konnte jedoch weder einen Effekt von Dimethomorph auf die Verteilung von Cellulose in den Zellwänden von *P. infestans* noch auf die Organisation von Aktin feststellen.

Das Mandelsäureamid Mandipropamid von Syngenta gehört wie Iprovalicarb, Dimethomorph und Flumorph zu den Carboxylsäureamiden und wirkt ebenfalls spezifisch auf Oomyceten (Cohen *et al.* 2008). Es wirkt auf alle Entwicklungsstadien, wobei sowohl die Keimung von Sporen und Sporangien, als auch das Wachstum des Myzels und die Sporulation inhibiert werden (Cohen und Gisi 2007). Alle vier Wirkstoffe zeigen ein identisches Resistenzverhalten und inhibieren die Ablagerung und Assemblierung der Zellwand (Cohen *et al.* 2008). In wie fern sich der Wirkungsmechanismus dieser vier Wirkstoffe unterscheidet ist nicht bekannt.

**Tabelle 4.1:** Übersicht über die verschiedenen Wirkstoffe und deren Effekte.

Wirkstoff	Stoffklasse	Effekt	Mögliches Target
CGA 325'615	Thiatriazin	Zerstörung der Rosettenstruktur,	Redox-System
AE F150944	Aminotriazin	Destabilisierung der Rosettenstruktur	?
Morlin	Cumarin-Analog	Änderung der Verteilung und Reduktion der Geschwindigkeit von CESA in der Plasmamembran, veränderte Mikrotubuli-Organisation	Protein, dass Bindung von Mikrotubuli an Membran vermittelt
2,6-Dichloro-benzonitril	Benzonitril	Akkumulation nicht-kristalliner $\beta$ -1,4-Glukane und von CESA, Änderungen im kortikalen Mikrotubuli-Netzwerk	PttMAP20
Isoxaben	Benzamizol	Verlust von CESA in der Plasmamembran	CESA3 und CESA6
Flumorph	Zimtsäure-derivat	inhibiert polare Ausrichtung von neu synthetisiertem Zellwandmaterial, Zerstörung von F-Aktin	?
Dimethomorph	Zimtsäure-derivat	Destabilisierung und morphologische Veränderungen der Zellwand	?
Iprovalicarb	Aminosäure-amidcarbamat	Akkumulation von Cellulose und Cellulose-Synthase, veränderte Organisation der Mikrotubuli	?
Mandi-propamid	Mandel-säureamid	inhibiert die Ablagerung und Assemblierung der Zellwand	?

Mit Ausnahme von DCB in hoher Konzentration haben die pflanzenspezifischen Wirkstoffe keine Wirkung auf Oomyceten, sowie auch die Oomycetenmittel nicht auf Pflanzen und Insekten wirken. Insektizide wie Benzoylharnstoffe, die die Synthese von Chitin hemmen, haben ebenfalls keine Wirkung auf Oomyceten (persönliche Mitteilung Dr. Klaus Tietjen). Der Wirkort des Benzoylharnstoffs Diflubenzuron ist vermutlich ein ABC-Transporter („ATP binding cassette“), welche die Translokation von anorganischen Ionen, Zuckern und Aminosäuren über die Membran vermitteln (Schmitt und Tampe 2002). Der Diflubenzuron-sensitive ABC-Transporter ist eine Untereinheit des ATP-abhängigen Calcium-Kalium-Kanals, genannt Sulfonylharnstoff-Rezeptor (Abo-Elghar *et al.* 2004). Der Wirkstoff interagiert mit diesem Rezeptor und inhibiert dadurch den Einstrom von Calcium-Ionen in integumentale Vesikel, ein Prozess, der für eine intakte Vesikel-Struktur notwendig ist (Nakagawa und Matsumura 1994). Die Verbindung zwischen der Synthese von Chitin und dem Sulfonylharnstoff-Rezeptor ist weitgehend unbekannt, aber möglicherweise wird durch das Fehlen intakter Vesikel, der Transport der Chitin-Synthase zur Plasmamembran unterbunden. Dies wird auch durch das verringerte Vorhandensein der Chitin-Synthase innerhalb der Membran nach einer Behandlung mit Benzoylharnstoffen bestätigt (Belinato *et al.* 2009).

Der gemeinsame Nenner aller Wirkstoffe könnte die Interferenz mit dem offenbar erforderlichen schnellen Durchsatz der Cellulose- und Chitin-Synthase sein. Die Cellulose-Synthase hat in Pflanzen eine Halbwertszeit von wenigen Minuten (Rudolph *et al.* 1989; Jacob-Wilk *et al.* 2006).

#### **4.7 Analyse des Proteoms von *P. infestans***

Eine quantitative und qualitative Analyse der Proteome von unbehandelten und in Gegenwart von Wirkstoff angezogenen *P. infestans*-Kulturen wurde durchgeführt, um Rückschlüsse auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph zu ziehen. Die hier eingesetzten Konzentrationen wurden in einem radialen Myzelwachstumstest als EC50 bzw. EC50/2 identifiziert (Mehl 2006). Es zeigte sich jedoch, dass das Wachstum bei diesen Konzentrationen in Flüssigkultur geringer ist, so dass die Konzentrationen für Dimethomorph und Iprovalicarb eher als EC70 bzw. EC70/2 zu bezeichnen sind. Das Wachstum in 0,025 ppm Metalaxyl war sogar fast vollständig eingeschränkt. Proteine mit einem im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verändertem Volumen wurden sequenziert und durch einen Vergleich mit einer *P. infestans* Datenbank identifiziert.

#### 4.7.1 Analyse des Proteoms von Dimethomorph-behandelten *P. infestans*-Kulturen

Die 2D-Gele mit Proteinen aus mit Dimethomorph (0,15 ppm) behandelten sechs Tage alten Kulturen zeigen im Vergleich zur Kontrolle einige Spots mit deutlich veränderten Volumina. Die identifizierten Proteine können in drei funktionelle Gruppen unterteilt werden (Tabelle 4.2). Die erste Gruppe bilden die T-Komplex-Polypeptid-1-Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  und  $\theta$ . Das T-Komplex-Polypeptid-1 (TCP1) ist ein heterooligomeres Chaperon mit einer Größe von 850-900 kDa (Casalou *et al.* 2001), das an der korrekten Faltung von Proteinen im Cytosol von Eukaryoten beteiligt ist (Kubota *et al.* 2000). Chaperone binden ungefaltete Polypeptide und generieren mit Hilfe der Energie aus der Hydrolyse von ATP korrekt gefaltete Proteine (Kubota *et al.* 1995). Chaperone werden in zwei große Gruppen unterteilt, wobei die erste Gruppe als Monomere oder Dimere funktionieren, wie z. B. das Hitzeschockprotein Hsp70, während die zweite Gruppe, zu der auch TCP1 gehört, Komplexe aus mehreren Untereinheiten bildet (Chen *et al.* 1994). TCP1 enthält acht verwandte, jedoch unterschiedliche Untereinheiten (Grantham *et al.* 2002) und besitzt im Vergleich zu dem Chaperon GroEL der Eubakterien eine limitierte Substratspezifität (Sternlicht *et al.* 1993). TCP1 wurde ursprünglich aufgrund seiner essentiellen Rolle bei der Faltung der cytoskelettalen Proteine Aktin und Tubulin entdeckt (Gao *et al.* 1992; Gao *et al.* 1993; Melki *et al.* 1993; Ursic *et al.* 1994; Dekker *et al.* 2008). Yaffe *et al.* (1992) konnten zeigen, dass  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin vorübergehend an TCP1 gebunden werden und dass die Zugabe von ATP die gebundenen Proteine dazu veranlasst  $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimere zu bilden, die dann in Mikrotubuli eingebaut werden können. Gao *et al.* (1992) konnten zeigen, dass TCP1 die Faltung von  $\beta$ -Aktin vorantreibt. Casalou *et al.* (2001) zeigten, dass sowohl der Mikrotubuli-depolymerisierende Wirkstoff Colchicin als auch Taxol, welches die Polymerisierung von Tubulin beschleunigt, Gentranskription von TCP-1 und Tubulin in *Tetrahymena*-Zellen induziert und erhöht.

Im Zusammenhang mit der Rolle des T-Komplexes als Faltungshelfer von Aktin und Tubulin steht das Protein mit der Nummer 109. Es wurde als Aktin-depolymerisierender Faktor Cofilin identifiziert. Cofilin ist ein essentielles Protein, das sowohl an monomeres Aktin als auch an Aktin-Filamente bindet (Theriot 1997) und die schnelle Depolymerisation letzterer induziert (Allen *et al.* 1997). Aufgrund seiner Funktion als Co-Chaperon, kann das Stress-induzierte STI1-ähnliche Protein, als welches Protein Nr. 134 identifiziert wurde, ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet werden. STI1 wurde 1989 von Nicolet und Craig erstmals als Hitze-induziertes Protein identifiziert. STI1 enthält drei TPR-Domänen (tetratricopeptide repeat), welche die Interaktion zwischen Proteinen vermitteln (Honoré *et al.* 1992). Im Fall von STI1 können die TPR-Domänen an das C-terminale Ende von Hsp70 sowie Hsp90 binden (Scheufler *et al.* 2000). Ein Komplex aus diesen drei Proteinen ist von zentraler Bedeutung für die Chaperon-Funktion von Hsp90 (Dittmar und Pratt 1997) und wird

für den Zusammenbau von Steroidhormon-Rezeptoren benötigt (Chen und Smith 1998). In höheren Eukaryoten wurde Hsp90 zusätzlich auch in Komplexen mit verschiedenen Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomerasen gefunden (Chang und Lindquist 1994), welche die cis-trans-Isomerisierung von Peptidbindungen, die aminoterminal zu Prolinresten in der Polypeptidkette gelegen sind, katalysieren (Shaw 2007). Protein 87 wurde als Peptidyl-Prolyl cis-trans-Isomerase identifiziert. Die verstärkte Expression von CCT nach einer Behandlung mit Dimethomorph könnte auf einen Defekt innerhalb der korrekten Faltung cytoskelettaler Proteine oder innerhalb der Polymerisation und Organisation von Aktin und Tubulin zurück zu führen sein. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass Dimethomorph die Stabilität neu gebildeter Zellwände des Oomyceten vermindert, könnten diese Ergebnisse interessant sein. Der destabilisierende Effekt könnte auf einer fehlerhaften Faltung oder Organisation cytoskelettaler Proteine, wie Aktin und Tubulin beruhen. Allerdings wurden in mikroskopischen Studien weder für Tubulin noch für Aktin Änderungen nach einer zwölf-tägigen Behandlung mit 0,3 ppm Dimethomorph beobachtet (Jende 2001).

Die zweite Gruppe von Proteinen umfasst die putativen Endo-1,3- $\beta$ -Glukanasen (Protein Nr. 6, 166 und 957), welche die Hydrolyse von  $\beta$ -1,3-verknüpften Glukanen, die Hauptkomponente der Zellwand von *P. infestans*, katalysieren (Tian *et al.* 2006). In Hefe sind Endo-1,3- $\beta$ -Glukanasen verantwortlich für die Änderungen während morphogenetischer Prozesse und werden daher im Verlauf des Lebenszyklus in unterschiedlichem Maße synthetisiert (Villa *et al.* 1979). Eine um 204 % verstärkte Expression, wie im Fall von Protein Nr. 6 würde wahrscheinlich als Folge der verstärkten Hydrolyse der  $\beta$ -1,3-verknüpften Glukane, eine Destabilisierung der Zellwand zur Folge haben, was als Wirkung von Dimethomorph beobachtet wurde. In vorhergehenden Studien von Jende (2001) und Mehl (2006) wurde eine intrazelluläre Akkumulation von Zellwandmaterial beobachtet. Dies könnte auf Fehler in der Exozytose zurückzuführen sein oder darauf, dass die Glukane nicht mehr in die Zellwand eingebaut werden.

Die letzte Gruppe umfasst Proteine die direkt, wie die Glutathion-S-Transferasen (GST, Protein 16 und 117) oder indirekt, wie die Citrat-Zyklus-Enzyme, im Methionin-Homocystein-Glutathion-System involviert sind. GST sind eine Familie multifunktionaler Enzyme (Reinemer *et al.* 1996) und spielen in Pflanzen sowohl bei zellulären Prozessen (Marrs 1996), der Reduktion organischer Hydroperoxide, die bei oxidativem Stress entstehen (Dixon *et al.* 2002), als auch bei der Detoxifikation einer Reihe von Xenobiotika eine wichtige Rolle (Neuefeind *et al.* 1997). Diese universellen Enzyme katalysieren die nucleophile Addition der reduzierten Form von Glutathion an verschiedene elektrophile Verbindungen (Rushmore und Pickett 1993). Die resultierenden Glutathionyl-S-Konjugate werden in Pflanzen in die Vakuole transportiert und sind ungiftig (Dixon *et al.* 2002). Die Reduktion der oxidierten Form des Glutathion (GSSG) wird von der GSSG-Reduktase katalysiert (Salvemini *et al.* 1999).



Dieser Schritt ist NADPH-abhängig, welches im Pentosephosphatweg produziert wird. Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ist das Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges und kontrolliert somit die Produktion von NADPH (Kletzien *et al.* 1994). Das Protein Nr. 114 wurde als Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase identifiziert.

Glutathion ist ein Tripeptid mit der Sequenz  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-Cysteinyl-Glycin (Rouhier *et al.* 2008) und wird ausgehend von Cystein in zwei ATP-abhängigen Schritten synthetisiert (Mendoza-Cózatl *et al.* 2004). Im ersten Schritt werden L-Glutamat und L-Cystein mit Hilfe der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase zu  $\gamma$ -Glutamylcystein verknüpft (May und Leaver 1993), während im zweiten Schritt die Glutathion-Synthetase die Addition eines Glycins an das C-terminale Ende von  $\gamma$ -Glutamylcystein katalysiert (May und Leaver 1994). Die Rate der Glutathion-Synthese wird limitiert durch die Verfügbarkeit von Cystein (Lu *et al.* 1992). Die Bereitstellung von Cystein wird durch die Cystathionin- $\gamma$ -Lyase (Protein Nr. 47) sichergestellt, welche die Spaltung von L-Cystathionin zu L-Cystein,  $\alpha$ -Ketobutarat und Ammonium katalysiert (Nagasawa *et al.* 1983). Ein weiterer Baustein der für die Synthese von Glutathion benötigt wird, L-Glutamat, entsteht aus  $\alpha$ -Ketoglutarat (Lewis und Miller 1977), welches ein Zwischenprodukt des Citrat-Zyklus ist (Thauer 1988). Protein Nr. 1 wurde als Isocitrat-Dehydrogenase und Protein Nr. 81 als Citrat-Synthase identifiziert. Diese zwei Enzyme katalysieren den ersten und dritten Schritt des Citrat-Zyklus, welche zur Synthese von  $\alpha$ -Ketoglutarat führen. Die Citrat-Synthase katalysiert die Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat, wobei Citrat entsteht (Wu und Yang 1970), welches durch die Aconitase zu Isocitrat umgelagert wird (Johnson 1939). Letzteres wird durch die Isocitrat-Dehydrogenase zu  $\alpha$ -Ketoglutarat und CO<sub>2</sub> oxidiert (Bernofsky und Utter 1966). Die Alanin-Aminotransferase (Protein-Nr. 97) katalysiert die reversible Umwandlung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und L-Alanin in Pyruvat und L-Glutamat (Sakagishi 1995). Da Glutathion auch bei oxidativem Stress eine wichtige Rolle spielt, können die Proteine Nr. 22 und 39 ebenfalls in diese Gruppe von Proteinen eingeordnet werden, da ihre Hauptfunktion als Superoxid-Dismutasen die Detoxifikation reaktiver Sauerstoff-Spezies ist (Melov 2000). Sie gehören zur Familie der Metalloenzyme und katalysieren die Disproportionierung von Superoxidionen, wobei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und O<sub>2</sub> entstehen (Karpinska *et al.* 2001).

Diese Ergebnisse liefern jedoch keinen Aufschluss über den Wirkort von Dimethomorph, sondern zeigen lediglich, dass die Zellen als Antwort auf eine Behandlung mit diesem Wirkstoff ihr Detoxifikations-System regulieren.

#### **4.7.2 Analyse des Proteoms von Iprovalicarb-behandelten *P. infestans*-Kulturen**

Die 2D-Gele mit Proteinen aus Iprovalicarb behandelten Kulturen zeigen im Vergleich zu Dimethomorph-behandelten Kulturen nur wenige Spots mit deutlich veränderten Volumina. Insgesamt 14 Spots die auch nach einer sechstägigen Behandlung mit 0,3 ppm

Dimethomorph ein verändertes Volumen zeigten, wurden auch nach einer sechstägigen Behandlung mit 0,25 ppm Iprovalicarb mit einer Volumenänderung detektiert. Jedoch waren die Veränderungen, die durch Iprovalicarb verursacht wurden auch quantitativ deutlich geringer als die, die Dimethomorph hervorbrachte, z. B. wurde Protein Nr. 47 nach Behandlung mit Dimethomorph mit einer Volumenzunahme von 96% detektiert, während die Zunahme nach Iprovalicarb-Behandlung nur bei 33% lag. Die Proteine, die nach Behandlung mit beiden Wirkstoffen veränderte Volumina aufwiesen, stehen fast alle in Zusammenhang mit dem bereits beschriebenen Methionin-Homocystein-Glutathion-System. Dies weist wie für Dimethomorph postuliert auf eine Entgiftungsreaktion als Antwort auf den Wirkstoff hin.

Abgesehen davon können die identifizierten Proteine, die nach Behandlung mit Iprovalicarb ein verändertes Volumen im Vergleich zur Kontrolle zeigten, nicht in Gruppen unterteilt werden. Zwei Proteine wurden als Enzyme der Glykolyse identifiziert und zwei Enzyme sind im Aminosäure-Metabolismus involviert. Des Weiteren wurden ein Chaperon, eine Proteasom-Untereinheit und die  $\beta$ -Untereinheit von Tubulin identifiziert. Weder die T-Komplex-Untereinheiten noch die Endoglukanasen konnten nach Behandlung mit Iprovalicarb mit einem veränderten Volumen detektiert werden.

**Tabelle 4.2:** Zusammenfassung der mittels ESI-Qq-TOF identifizierten Proteine, die nach einer Behandlung mit Dimethomorph bzw. Iprovalicarb ein verändertes Volumen zeigten, und deren Funktion. Die Proteine, die in Zusammenhang mit Detoxifikation stehen, sind grau hinterlegt; die Glukanasen gelb. Hellblau hinterlegt sind cytoskelettale Proteine und Faltungshelfer dieser Proteine.

Spot-Nr.	Volumen- änderung [%] Dimetho- morph	Volumen- änderung [%] Iprovalicarb	Protein-Identität	Protein-Funktion
1	+194,8	-10,4	Isocitrat-Dehydrogenase	Carbohydrat-Abbau
6	+203,9	+6,6	mögliche Endo-1,3- $\beta$ -Glukanase	Carbohydrat-Abbau, Abbau von Zellwandmaterial
16	-42,9	+38,6	GST	Detoxifikation
22	-50,6	+16,4	Superoxid-Dismutase	Oxidativer Stress
26	+75,2	+10,2	Methionin-Synthase	Aminosäure-Biosynthese
28	+109,5	+1,2	T-Komplex-Protein1 $\delta$ -Untereinheit	Cytoskelett-Chaperon
32	+57,3	-25,1	3-Isopropylmalat-Dehydratase	Aminosäure-Biosynthese
39	-29,7	+49,6	Superoxid-Dismutase,	Oxidativer Stress
47	+96,8	+33,3	Cystathionin- $\gamma$ -Lyase	Aminosäure-Umwandlung, S-Adenosylmetabolismus
63	+55,6	-4,2	Adenosin-Kinase	Nukleotid-Verwertung
69	+88,1	+24,1	ähnlich zu D-Lactat-Dehydrogenase	Carbohydrat-Transport
81	+85,0	+21,1	Citrat-Synthase	Carbohydrat-Abbau
85	-33,8	+13,7	Quinon-Oxidoreduktase	Oxidativer Stress, Vesikeltransport
87	+45,5	+5,5	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase, cyclophilin-type family	Chaperon
97	+59,9	-2,4	Alanin-Aminotransferase 2	Aminosäure-Umwandlung
109	-34,7	+9,4	Actin-depolymerisierender Faktor, Cofilin	Vesikel-Transport, Cytoskelett
110	+71,5	+32,1	Fumarylacetoacetase	Tyrosin-Abbau, Aminosäure-Umwandlung

114	+71,9	+28,5	Glukose-6-Phosphat 1-Dehydrogenase	Carbohydrat-Umwandlung
117	+41,5	+26,3	GST	Detoxifikation
125	+33,9	-14,4	Proteasom-Untereinheit $\alpha$ -Typ 1	Protein-Abbau
131	+61,0	+17,6	T-Komplex-Protein1 $\gamma$ -Untereinheit	Cytoskelett-Chaperon
134	+29,5	-13,8	Stress-induziertes Protein sti1-like Protein	Chaperon
135	-11,6	-30,2	Ähnlich zu wd-repeat Protein	Vesikel-Transport, interagiert mit Cofilin
141	+29,2	+37,2	Malat-Dehydrogenase	Carbohydrat-Abbau, Citrat-Zyklus
151	+39,5	-3,2	T-Komplex-Protein1 $\alpha$ -Untereinheit	Cytoskelett-Chaperon
166	-23,5	-4,0	putative Endo-1,3;1,4- $\beta$ -Glukanase	Carbohydrat-Abbau, Abbau von Zellwandmaterial
173	+14,7	+42,6	Quinon-Oxidoreduktase	Oxidativer Stress, Vesikeltransport
179	+13,3	+26,5	Enoyl-CoA-Hydratase,	Fettsäure-Abbau, Energiegewinnung
182	-14,2	+30,1	Nukleosid-Diphosphat-Kinase B	Nukleotid-Verwertung
183	+13,3	+30,7	ATP-Synthase $\beta$ -Untereinheit	Energie-Gewinnung
185	+1,7	+28,4	Chaperon CPN60-1	Chaperon
673	+45,5	+5,9	Phosphoglycerat-Kinase 1	Carbohydrat-Umwandlung
725	+44,5	+25,8	Glycin-Amidino-transferase	Kreatin-Stoffwechsel in tierischen Zellen
730	-4,7	-27,6	26S Proteasom-Untereinheit 12	Protein-Abbau
745	+47,0	+45,5	Xenobiotik-Reduktase B	Detoxifikation
786	+39,6	+39,9	Phosphoglycerat-Mutase	Carbohydrat-Abbau
885	+30,8	+16,8	T-Komplex-Protein1 $\theta$ -Untereinheit	Cytoskelett-Chaperon
957	+27,0	+5,5	putative Endo-1,3- $\beta$ -Glukanase	Carbohydrat-Abbau, Abbau von Zellwandmaterial
1009	-3,6	+25,9	Quinon-Oxidoreduktase	Oxidativer Stress, Vesikeltransport
1065	-4,1	+20,7	Malat-Dehydrogenase	Carbohydrat-Abbau, Citrat-Zyklus
1081	-3,1	+21,6	Fruktose-Bisphosphat-Aldolase	Carbohydrat-Umwandlung
1139	+12,0	+24,1	Tubulin $\beta$ -Kette	Cytoskelett
1191	+37,6	+25,9	vakuoläre ATP-Synthase B-Untereinheit, Isoform 1	Vesikel-Transport, Energiegewinnung

#### 4.7.3 Analyse des Proteoms von Metalaxyl-behandelten *P. infestans*-Kulturen

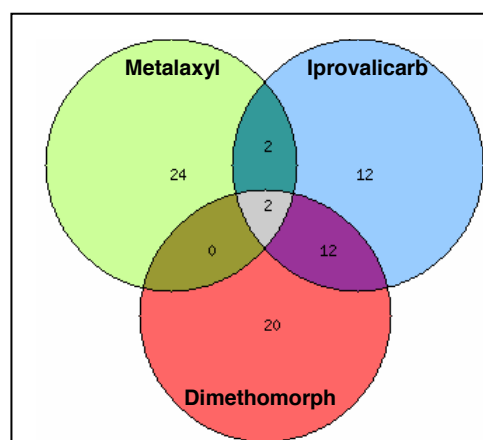
Metalaxyl wurde als Vergleich benutzt, da der Wirkort dieses Wirkstoffes bekannt ist und sich von dem für Iprovalicarb und Dimethomorph vermuteten Wirkort unterscheidet. Das Phenylamid Metalaxyl hemmt die Aktivität der RNA-Polymerase 1 (Sukul und Spiteller 2000) und inhibiert dadurch selektiv die rRNA-Synthese. Die Proteine die nach einer sechstägigen Behandlung mit 0,0125 ppm Metalaxyl ein verändertes Volumen zeigten, umfassen unter anderem sechs Dehydrogenasen (Protein-Nr. 164, 166, 189, 235, 262 und 307) und sechs Enzyme (Protein-Nr. 161, 184, 214, 235, 438 und 740), die am Abbau von Aminosäuren beteiligt sind. Diese Ergebnisse liefern jedoch keinen direkten Hinweis auf den Wirkort von Metalaxyl, die RNA-Polymerase 1. Dies könnte darin begründet sein, dass Metalaxyl keinen spezifischen Stoffwechselweg, sondern die generelle Synthese von ribosomaler RNA inhibiert, was viele zelluläre Prozesse gleichermaßen beeinträchtigt.

Die Volumenänderungen einiger Proteine könnten jedoch als Konsequenz auf die Inhibierung der rRNA-Synthese gedeutet werden. So z. B. die veränderten Volumina der Enzyme, die am Abbau von Aminosäuren beteiligt sind, und die Volumenzunahme der Uridylat-Kinase. Auch das Peroxiredoxin-2 wurde mit einer deutlichen Volumenzunahme von 92% detektiert. Thioredoxine schützen Ribosomen vor Stress-induzierter Aggregation (Rand und Grant 2006). Ein nukleäres GTPase-aktivierendes Protein für die GTPase RAN wurde mit einer Volumenzunahme von 96% identifiziert. Die GTPase RAN ist für den Transport von RNA vom Zellkern ins Cytoplasma essentiell (Melchior *et al.* 1993).

Die höchste Änderung des Volumens war bei der Phenolsäure-Decarboxylase zu verzeichnen. In Pflanzen stellen Phenolsäuren einen natürlichen Bestandteil der Zellwand dar, da sie Lignin an Hemicellulose und Cellulose binden (Cavin *et al.* 1998). In ihrer freien Form werden Phenolsäuren von Bakterien und Hefen mittels Phenolsäure-Decarboxylasen in Vinyl-Phenole konvertiert (Barthelmebs *et al.* 2001). Die Rolle der Phenolsäure-Decarboxylase in Oomyceten ist bislang nicht bekannt.

#### 4.7.4 Vergleichende Analyse des mit Wirkstoff-behandelten Proteoms von *P. infestans*

*P. infestans* zeigt unterschiedliche Reaktionen als Antwort auf die drei Wirkstoffe, wobei die Änderungen, die durch Dimethomorph und Metalaxyl hervorgerufen werden wesentlich deutlicher sind als die, die durch Iprovalicarb induziert werden. Die Reaktionen, die durch Dimethomorph und Iprovalicarb verursacht werden, zeigen eine größere Ähnlichkeit zueinander als die, die durch Metalaxyl hervorgerufen werden. Dennoch zeigen die durch Dimethomorph und Iprovalicarb verursachten Reaktionen auch einige Unterschiede. Abbildung 4.2 zeigt die Anzahl an gemeinsamen und unterschiedlichen Proteinen mit veränderten Volumina im Proteom von *P. infestans* nach einer Behandlung mit den Wirkstoffen.



**Abb. 4.2:** Venn-Diagramm der Anzahl an gemeinsamen und unterschiedlichen Proteinen mit veränderten Volumina im Proteom von Iprovalicarb-, Dimethomorph- und Metalaxyl-behandelten *P. infestans*-Kulturen.

Obwohl diese Ergebnisse keinen direkten Hinweis auf den Wirkort und Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph liefern, ist deutlich, dass *P. infestans* auf beide Wirkstoffe mit einer Regulation des Detoxifikationssystems reagiert. Eine Detoxifikation von Xenobiotika mit Hilfe von Glutathion wurde für höhere Pflanzen bereits beschrieben (Neuefeind *et al.* 1997; Zajc *et al.* 1999). Die Existenz eines solchen Detoxifikations-Mechanismus in *P. infestans* war bislang nicht bekannt.

Die Tatsache, dass die Änderungen im Proteom von *P. infestans* nach einer Behandlung mit Dimethomorph und Iprovalicarb überraschend gering sind, zeigt, dass der Organismus trotz 70%iger Wachstumshemmung an die störenden Funktionen adaptiert und zu einem homeostatisch normalen Status mit verlangsamtem Wachstum zurückkehrt. Übereinstimmend mit den mikroskopischen Untersuchungen, die eine Beeinträchtigung in der Assemblierung der Zellwand zeigen, scheint Dimethomorph die extrazelluläre Lokalisation von glukanischem Material zu stören. Die Daten der Proteom-Analyse könnten auf einen fehlerhaften Transport von Zellwandmaterial und dem Versuch der Zellen überflüssige Glukane abzubauen, hindeuten.

Eine Behandlungszeit von sechs Tagen ist relativ lang im Vergleich zu üblichen Experimenten, in denen die Genexpression innerhalb von Stunden nach Behandlung mit Wirkstoff untersucht wird. In Genexpressionsstudien werden Kurzzeitantworten untersucht, um möglichst nahe am primären Geschehen zu bleiben, aber die Ergebnisse zeigen, dass auch Kurzzeitantworten oftmals ebenfalls keine direkten Rückschlüsse auf den Wirkort biologisch aktiver Komponenten erlauben (persönliche Mitteilung Dr. Klaus Tietjen). In den Proteomanalysen wird eher eine adaptive Antwort beobachtet, die auf eine physiologische Antwort hindeutet, mit der der Organismus auf die chemische Inhibierung reagiert bzw. diese kompensiert. Diese Antwort muss dabei nicht zwangsläufig im Zusammenhang mit dem primären Wirkort stehen.

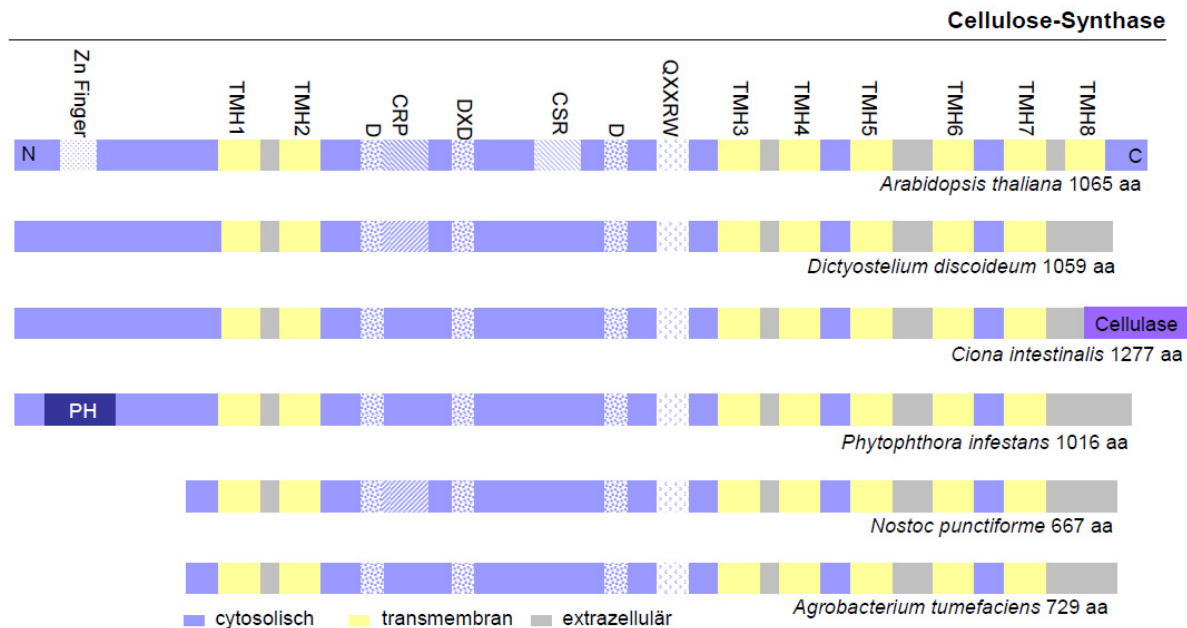
Die Darstellung eines Proteoms mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese gelingt nur unvollständig. Sowohl seltene bzw. gering exprimierte Proteine, als auch Proteine mit sehr hohem oder sehr kleinem Molekulargewicht sind im Gel unterrepräsentiert (Henze 2008). Auch Membranproteine sind selten auf zweidimensionalen Gelen zu finden, da sie aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften nur schlecht für die isoelektrische Fokussierung löslich gemacht werden können. Des Weiteren wurde in der isoelektrischen Fokussierung ein pH-Gradient von 4-7 verwendet, weshalb auch Proteine mit einem höheren bzw. niedrigeren isoelektrischen Punkt nicht dargestellt wurden. Deshalb ist vorstellbar, dass andere Proteine aus dem Funktionszusammenhang der gefundenen Proteine ebenfalls reagiert haben, aber in der 2D-Analyse nicht gesehen wurden.

Die Proteine Nr. 173 und 1009 aus den Versuchen mit Dimethomorph und Iprovalicarb wurden beide als Quinon-Oxidoreduktase mit der Annotationsnummer PITT\_13761

identifiziert. Die Proteine liegen auf dem 2D-Gel nebeneinander, besitzen also das gleiche Molekulargewicht, aber einen unterschiedlichen isoelektrischen Punkt (IEP). Da beide als das gleiche Protein identifiziert wurden, ist der unterschiedliche IEP auf eine unterschiedliche Modifikation des Proteins, wie z. B. eine Phosphorylierung zurückzuführen. Das Gleiche gilt auch für die Proteine 164 und 166 aus den Versuchen mit Metalaxyl, die als Aldehyd-Dehydrogenase identifiziert wurden.

#### **4.8 Phylogenetische Verteilung der Cellulose-Synthase**

Die Cellulose-Synthase ist sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten vertreten. Innerhalb der Bakterien ist die Cellulose-Synthase sowohl bei den  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien als auch bei den Cyanobakterien, den *Firmicutes*, den *Chloroflexii* und den Actinobakterien zu finden. Bei den Eukaryoten besitzen vor allem Pflanzen, aber auch Protisten und sogar niedere Urochordata eine Cellulose-Synthase (Abb. 3.27). Auch wenn die Fähigkeit Cellulose zu synthetisieren eine typische Charaktereigenschaft der Pflanzen ist, so sind auch andere Organismen in der Lage Cellulose zu synthetisieren. Während des Wachstums von *D. discoideum* ist Cellulose ein großer Bestandteil der extrazellulären Matrix und ist außerdem in der äußeren Schicht der Sporen zu finden (Blanton *et al.* 2000). In Urochordaten ist Cellulose das Produkt der Epidermis und wird als eine feste äußere Schicht, die als Tunika bezeichnet wird, abgelagert (Matthysse *et al.* 2004). Auch Bakterien sind in der Lage Cellulose zu synthetisieren. Das  $\alpha$ -Proteobakterium *A. tumefaciens* z. B. synthetisiert Cellulose-Fibrillen, die wahllos aus der gesamten Zelloberfläche auszutreten scheinen. Diese Fibrillen spielen eine Rolle bei der Pathogenese, indem sie das Bakterium an die pflanzliche Wirtszelle binden (Matthysse *et al.* 1995). Cyanobakterien sekretieren Cellulose in extrazellulärem Schleim, als Kapsel und als Scheide (Nobles *et al.* 2001). Die Sekretion von Polysacchariden spielt eine Rolle bei der Kolonienbildung, der Fortbewegung durch Gleiten, bei symbiotischen Prozessen, der Anpassung an verschiedene Lebensräume und dient als Schutz vor dem Austrocknen (Nobles *et al.* 2001; Knowles und Castenholz 2008; Tamaru *et al.* 2005).



**Abb. 4.3:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Cellulose-Synthase verschiedener Organismen. TMH=Transmembranhelix, CR-P=Pflanzen-spezifische konservierte Region, CSR=Klassenspezifische Region, PH=Pleckstrin-Homologie-Domäne

Abbildung 4.3 zeigt einen Vergleich der Cellulose-Synthase von *P. infestans* mit verschiedenen eukaryotischen und prokaryotischen Homologen. Der Vergleich der Sequenzen zeigt eine deutliche Konservierung der funktionellen Domänen

Alle Cellulose-Synthasen gehören zur Familie 2 der prozessiven Glykosyltransferasen und sind integrale Membranproteine (Doblin *et al.* 2002). Alle Sequenzen besitzen die konservierten Motive QXXRW, DXD und einige konservierte Aspartat-Reste (Saxena und Brown 1997; Abb. 4.3). Allerdings sind zwischen den Reichen auch signifikante Unterschiede innerhalb der Domänenstruktur der Cellulose-Synthase zu finden.

Die Cellulose-Synthase höherer Pflanzen und der Algen besitzt eine Zn-Bindedomäne am N-Terminus und zwei spezifische Insertionen, die Pflanzen-spezifische konservierte Region (CR-P) und die Klassen-spezifische Region (CSR; Somerville 2006). Sowohl die Zn-Bindedomäne als auch die zwei Insertionen fehlen in allen anderen Cellulose-Synthasen (Nakashima *et al.* 2004; Grenville-Briggs *et al.* 2008). Die Sequenzen von *D. discoideum* und von Cyanobakterien besitzen jedoch an der zur CR-P korrespondierenden Region eine Insertion, die aber nur geringe Sequenzähnlichkeit zu CR-P besitzt (Blanton *et al.* 2000). Allerdings zeigt die Insertion der Cyanobakterien eine größere Ähnlichkeit zu der CR-P der Pflanzen als die von *D. discoideum*. Nobles *et al.* (2001) sehen dies als erstes Indiz dafür, dass die Cellulose-Synthase der Pflanzen und Cyanobakterien eng verwandt sind. Auch das Netzwerk der Cellulose-Synthase zeigt, dass die Cellulose-Synthase-Gene der Pflanzen und der Cyanobakterien einen gemeinsamen Vorfahr haben.

Die C-terminale Domäne der Cellulose-Synthase von *C. intestinalis* dagegen zeigt Ähnlichkeiten zu einer Cellulase (Matthysse *et al.* 2004). Diese Domäne konnte in keiner der anderen bekannten Cellulose-Synthasen gefunden werden. Nakashima *et al.* (2004) schlussfolgerten, dass beide Domänen von zwei verschiedenen Genen abstammen und vermuteten einen einzelnen lateralen Gentransfer eines Operons und die anschließende Fusion der Operon-Gene. Mit Ausnahme der Cyanobakterien ist in den Bakterien ein Operon oder Gen-Cluster konserviert, in dem ein Cellulose-Synthase-Gen in unmittelbarer Nähe eines Cellulase-Genes liegt (Römling 2002). Nakashima *et al.* (2004) vermuteten daher, dass eines dieser bakteriellen Gen-Cluster oder Operons den Ursprung des Cellulose-Synthase-Gens in *Ciona intestinalis* darstellt.

Grenville-Briggs *et al.* (2008) identifizierten vier Cellulose-Synthase-Gene in *P. infestans*. Eine Analyse dieser vier Gene zeigte, dass sie mehrere Transmembrandomänen besitzen. Ebenfalls konnten einige konservierte Motive, die charakteristisch für prozessive Glykosyltransferasen sind, gefunden werden. Die Cellulose-Synthase von *Phytophthora* besitzt im N-terminalen Bereich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne). PH-Domänen sind konservierte Domänen mit einer Größe von ungefähr 100 Aminosäuren, die in vielen eukaryotischen Proteinen, die in der Signaltransduktion oder an der Organisation des Cytoskeletts beteiligt sind, vorkommen (Saraste und Hyvönen 1995). Erstmals wurde diese Domäne 1993 in dem Protein Pleckstrin der Blutplättchen identifiziert (Haslam *et al.* 1993). Viele PH-Domänen sind in der Lage mit einer hohen Spezifität und Affinität an Phosphoinositid zu binden und können somit mit der Membran assoziieren (Lemmon und Ferguson 2001). Bislang wurde keine weitere Cellulose-Synthase beschrieben, die eine PH-Domäne besitzt.

In dem Netzwerk der Cellulose-Synthase (Abb. 3.27) bildet *Porphyra yezoensis* einen gemeinsamen Split mit den Oomyceten. Dies bestätigt die Entstehung der Oomyceten durch sekundäre Endosymbiose und die Hypothese, dass ein nicht-photosynthetischer primitiver Eukaryot wahrscheinlich eine Rotalge aufgenommen hat (Armbrust *et al.* 2004).

Die phylogenetische Analyse der Cellulose-Synthase-Sequenzen schließt 39 prokaryotische Homologe ein, wobei die cyanobakteriellen Sequenzen von *N. punctiforme* und *A. variabilis* eine gemeinsame Verzweigung mit den Cellulose-Synthase-Sequenzen der Actinobakterien und von *Chloroflexus* zeigen, während die cyanobakteriellen Homologen von *Cyanothece* und *T. elongatus* mit den Proteobakterien verzweigt sind. Dies kann durch lateralen Gentransfer zwischen Prokaryoten erklärt werden (Dagan *et al.* 2008).

Die Cellulose-Synthase-Sequenzen der Eukaryoten werden in einer gemeinsamen Gruppe zusammengefügt, was auf einen einzigen gemeinsamen Ursprung der eukaryotischen Cellulose-Synthase hindeutet. Das Vorkommen von Cellulose und aktiver, homologer Cellulose-Synthase-Gene in Pflanzen (Somerville 2006), dem Metazoen



*C. intestinalis* (Matthysse *et al.* 2004), in *D. discoideum* (Blanton *et al.* 2000) und in Oomyceten (Grenville-Briggs *et al.* 2008) und auch das Vorkommen des funktional uncharakterisierten Cellulose-Synthase-Homologen des Ascomyceten *Pyrenophora tritici* deutet darauf hin, dass das Cellulose-Synthase-Gen im gemeinsamen Vorfahren vorhanden war.

Das Netzwerk in Abbildung 3.27 ist allerdings nicht vollständig, sondern umfasst lediglich eine repräsentative Auswahl von Cellulose-Synthase-Genen. Alleine bei den Landpflanzen sind mehr als 500 Cellulose-Synthase-Gene in GenBank annotiert. Cellulose-Synthase-Homologe fehlen jedoch in den Genomen von *Chlamydomonas*, *Ostreococcus* und *Cyanidioschyzon*, was zeigt, dass der Verlust von Cellulose-Synthase-Genen nicht selten während der Evolution war.

#### 4.9 Phylogenetische Verteilung der Chitin-Synthase

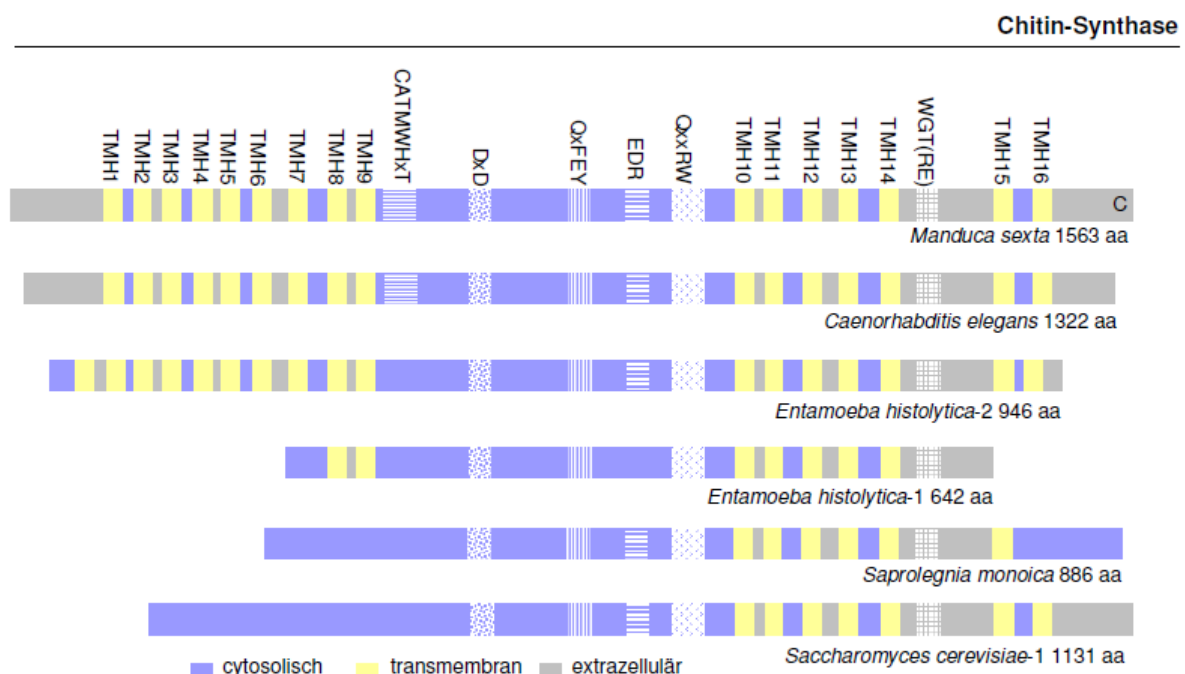
Die Chitin-Synthase ist hauptsächlich in Eukaryoten, nämlich in Pilzen, Tieren und Protisten vertreten (3.28). Aber auch in Prokaryoten konnte die Chitin-Synthase identifiziert werden. Mit der Chitin-Synthase von *S. monoica* als Suchsequenz wurden zwei sehr gute Treffer bei den Bakterien erzielt. Der erste in *Agrobacterium vitis* (E-value: 1e-31) und der zweite in *Pectobacterium atrosepticum* (E-value: 1e-28). Beide Proteine sind als bifunktionale Enzyme, die eine Aminotransferase und eine Chitin-Synthase beinhalten, annotiert.

Besonders gut sind die Chitin-Synthasen der Pilze und der Insekten und Nematoden charakterisiert (Van Laere und Carlier 1977; Moore und Peberdy 1975; Turnbull und Howells 1983; Ibrahim *et al.* 2000; Dubinský *et al.* 1986; Harris *et al.* 2000). Chitin ist aber auch Hauptkomponente der Zellwand der Cysten von *Entamoeba* und auch Chitin-Synthase-Aktivität konnte während der Encystierung des Parasiten gemessen werden (Campos-Góngora *et al.* 2004; Das und Gillin 1991). Auch die Cysten von Ciliaten können Chitin enthalten (Foissner und Pichler 2006). Ebenso konnten sowohl Chitin als auch Chitin-Synthase-Gene in Oomyceten identifiziert werden (Leal-Morales *et al.* 1997; Mort-Bontemps *et al.* 1997). Das Gen der Chitin-Synthase-2 aus *S. monoica* wurde bereits 1997 kloniert und sequenziert und die Expression des Gens wurde mittels RT-PCR und Immunodetektion gezeigt (Mort-Bontemps *et al.* 1997). Auch in *Plasmopara viticola* konnte die Expression der Chitin-Synthase nachgewiesen werden (Werner *et al.* 2002). Für den Oomyceten *Aphanomyces euteiches* wurden ebenfalls sowohl Chitin als auch Chitin-Synthase-Gene beschrieben (Badreddine *et al.* 2008). Abbildung 4.2 zeigt einen Vergleich der Chitin-Synthasen verschiedener eukaryotischer Homologen. Alle Chitin-Synthasen besitzen die konservierten Motive QXFEY, EDR, QXXRW und WGT(RE). Die Chitin-Synthasen der verschiedenen Organismen variieren jedoch stark in der Anzahl vorhergesagter Transmembranhelizes. So besitzen Insekten und Nematoden 16 transmembrane Domänen,

während die Anzahl bei den Oomyceten und Pilzen mit sechs bzw. sieben Transmembranhelizes deutlich geringer ist. Auch die Größe der Chitin-Synthase unterscheidet sich deutlich zwischen den verschiedenen Organismen. So ist z. B. die Chitin-Synthase-1 von *E. histolytica* mit 642 Aminosäuren nicht einmal halb so lang wie die von *M. sexta* mit einer Länge von 1562 Aminosäuren.

Chitin wird in Entamoeben von zwei Chitin-Synthasen synthetisiert (Van Dellen *et al.* 2006), die sich in Größe und Anzahl an Transmembranhelizes deutlich unterscheiden (Campos-Góngora *et al.* 2004). Die Chitin-Synthase-1 besitzt eine Länge von 642 Aminosäuren und hat sieben Transmembranhelizes, von denen die Mehrheit C-terminal lokalisiert ist. Dies gleicht der Struktur der Chitin-Synthase in Hefe (Campos-Góngora *et al.* 2004). Die Chitin-Synthase-2 der Entamoeben ähnelt der Sequenz der Insekten und Nematoden und ist mit 980 Aminosäuren deutlich länger. Die Sequenz enthält 17 transmembrane Domänen von denen die Mehrzahl am N-Terminus lokalisiert ist.

Die eukaryotischen Chitin-Synthase-Sequenzen besitzen auch Homologe unter den Prokaryoten. So sind z. B. die NodC-Proteine der  $\alpha$ -Proteobakterien, die Chitin-Oligosaccharide synthetisieren, eng verwandt mit der Chitin-Synthase der Eukaryoten. Die Chitin-Oligomere sind dabei essentielle Signal-Moleküle für den Nodulations-Prozess in Rhizobia, indem sie die Bildung Nitrogen-fixierender Wurzelknöllchen in Leguminosen induzieren (Kamst *et al.* 1999).



**Abb. 4.4:** Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Chitin-Synthase verschiedener Organismen. TMH=Transmembranhelix

Wie bei der Cellulose-Synthase deutet das Vorkommen der Chitin-Synthase-Gene in den Amoebozoen, den Tieren, Pilzen, Ciliaten und Oomyceten darauf hin, dass das Chitin-Synthase-Gen im letzten gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten vorhanden war. Das

Vorkommen beider Gene im gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten, wirft die Frage auf, ob dieser eine Zellwand besaß oder nicht. Zu diesem Thema gibt es verschiedene Ansichten.

Einige Autoren sind der Meinung, dass der eukaryotische Vorfahr, zur Phagozytose eines Bakteriums befähigt war, was als Voraussetzung des Ursprungs der Mitochondrien angesehen wird (Cavalier-Smith 2002; de Duve 2007). Aus dieser Sicht ist das Fehlen der Zellwand die Voraussetzung des Ursprungs der Mitochondrien (Cavalier-Smith 2002).

Andere Autoren schlagen vor, dass der Wirt der mitochondrialen Endosymbiose ein Prokaryot, z. B. ein Archaeobakterium war, da Eukaryoten einige Gene besitzen, die von Archaeobakterien abstammen (Embley und Martin 2006; Cox *et al.* 2008). Folglich ist der gemeinsame Vorfahr der Eukaryoten aus einer Symbiose zweier Prokaryoten entstanden, wobei sich die spezifischen Merkmale der Eukaryoten, wie z. B. der Zellkern und die Fähigkeit zur Phagozytose, erst später entwickelt haben (Yutin *et al.* 2009). Die Gene für die Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase, die für die Synthese der Zellwand in Eukaryoten verantwortlich sind, verlinken dieses eukaryotische Merkmal mit den Eubakterien. Dies wurde bereits für die Mehrheit der eukaryotischen Gene beschrieben (Rivera *et al.* 1998; Rivera und Lake 2004; Esser *et al.* 2004).

Das Vorkommen beider Gene im gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten deutet darauf hin, dass dieser möglicherweise eine Zellwand besaß. Die Gene für die Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase wurden beide in verschiedenen taxonomischen Gruppen gefunden, aber das Vorhandensein beider Gene innerhalb eines Genoms ist lediglich auf die Oomyceten beschränkt.

#### **4.10 Ausblick**

Mit Hilfe der spezifischen Antikörper konnte sowohl die Cellulose-Synthase als auch die Chitin-Synthase in *P. infestans* lokalisiert werden. Eine *in vivo* Lokalisation und Untersuchungen zur Beweglichkeit der Cellulose-Synthase war jedoch nicht möglich, da die Immunofluoreszenzfärbung die Fixierung der Zellen voraussetzt. Diese Analysen wären durch eine homologe Expression der Cellulose-Synthase bzw. Chitin-Synthase als GFP-Fusion möglich.

Die Transformation von *P. infestans* wurde bereits in den 90ern von Judelson *et al.* (1991) erfolgreich durchgeführt. Mit Hilfe von Polyethylenglykol und CaCl<sub>2</sub> wurde die DNA in Protoplasten eingebracht. Ein Oomyceten-spezifischer Expressionsvektor wurde von Howard Judelson (Kalifornien) zur Verfügung gestellt. Die Klonierung einer Cellulose-Synthase- bzw. Chitin-Synthase-GFP-Fusion in den Vektor war jedoch bislang nicht möglich. Auch die Präparation von Protoplasten gestaltete sich als schwierig, da die Enzymmischung „Novozym 234“, die bei der Generation von Protoplasten verwendet wird, nicht mehr käuflich zu erwerben ist.

Die vergleichende Analyse des Proteoms von unbehandelten und in Gegenwart von Wirkstoff angezogenen *P. infestans*-Kulturen ist ein guter Startpunkt, um Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus zu gewinnen. Die Analysen könnten jedoch noch ausgedehnt werden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen. Die Experimente könnten z. B. mit einem breiteren pH-Gradienten (pH 3-11) in der isoelektrischen Fokussierung wiederholt werden. Um auch die Membranproteine der Analyse zugänglich zu machen, könnte in der ersten Dimension eine 16-BAC-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Im Hinblick auf die Lokalisation der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase in DRM könnte auch eine 2D-Gelelektrophorese mit dieser Fraktion durchgeführt werden.

## 5.1 Zusammenfassung

Der Oomycet *Phytophthora infestans* verursacht die Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel und dadurch jährlich viele Millionen Euro Kosten, die sowohl Ernteauffälle als auch Kontrollmaßnahmen umfassen. Iprovalicarb und Dimethomorph sind zwei Oomyceten-spezifische Wirkstoffe die weithin zur Bekämpfung verschiedener *Phytophthora*-Spezies eingesetzt werden. Trotz intensiver Forschungen ist aber weder der genaue Wirkort noch der Wirkungsmechanismus beider Wirkstoffe bekannt. Aufgrund vorhergehender Untersuchungen wurde der Wirkort beider jedoch im Bereich der Zellwandsynthese vermutet. Eine Hypothese ist ein Effekt auf die Lokalisation der Zellwandbiosyntheseenzyme Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase.

Zur *in situ* Immunlokalisation der beiden Enzyme wurden daher in dieser Arbeit spezifische Antikörper gegen verschiedene Domänen der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase hergestellt und die Lokalisation und Verteilung beider Enzyme vor und nach einer Behandlung mit Iprovalicarb und Dimethomorph mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Die Cellulose-Synthase konnte in der Plasmamembran von Hyphen in einer gleichmäßig punktförmig verteilten Anordnung um das gesamte Hyphenlumen lokalisiert werden. Eine Behandlung mit Iprovalicarb führte zu einer partiellen Agglomeration der Cellulose-Synthase, während Dimethomorph keinen Einfluss auf die Lokalisation des Enzyms hatte.

Die Chitin-Synthase wurde nur in der Keimungsspitze von Zoosporangien lokalisiert. Eine Behandlung mit Iprovalicarb und Dimethomorph führte zu keiner Änderung der Lokalisation dieses Enzyms. Diese Ergebnisse wurden durch eine Färbung von Chitin mit Texas Red-markiertem Wheat Germ Agglutinin bestätigt.

Mit Hilfe der spezifischen Antikörper wurde für beide Enzymkomplexe eine Lokalisation in Detergenz-resistenten Membranen (DRM) gezeigt. Da in anderen Eukaryoten DRM sterolreiche Lipid Rafts sind, wurde eine Färbung von Sterolen mit Filipin durchgeführt. Der Farbstoff lagerte sich gleichmäßig über den gesamten Bereich der Membran von Hyphen und Zoosporangien an. Eine Behandlung mit den Wirkstoffen Iprovalicarb und Dimethomorph führte jedoch zu keiner offensichtlichen Änderung in der Verteilung der Sterole.

Um weitere Einblicke in die Gemeinsamkeiten und Unterschiede des Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb und Dimethomorph zu gewinnen, wurde eine quantitative und qualitative Analyse der Proteome von unbehandelten und in Gegenwart von Iprovalicarb, Dimethomorph bzw. Metalaxyl angezogenen *Phytophthora infestans*-Kulturen durchgeführt. Proteine, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein verändertes Volumen aufwiesen, wurden sequenziert und durch einen Vergleich mit einer *Phytophthora infestans* Gendatenbank identifiziert. Während Iprovalicarb und Dimethomorph einige

Ähnlichkeiten in den hervorgerufenen Effekten aufwies, unterscheidet sich der Effekt von Metalaxyl deutlich. Sowohl auf Iprovalicarb als auch auf Dimethomorph reagierte *Phytophthora infestans* mit einem generellen pflanzenähnlichen Abwehrmechanismus. Weitere Änderungen die durch Dimethomorph verursacht wurden, könnten als Fehler im Transport von Zellwandmaterial und dem daraus folgenden Versuch der Zellen überflüssige Glukane abzubauen, gedeutet werden.

Schließlich wurde die phylogenetische Verteilung der Cellulose-Synthase und Chitin-Synthase analysiert. Beide Enzyme sind sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten vertreten. Das Vorkommen von Cellulose-Synthase- und Chitin-Synthase-Genen in vielen Verwandtschaftsbereichen der Eukaryoten deutet darauf hin, dass beide Gene im letzten gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten vertreten waren und dieser wiederum möglicherweise eine Zellwand besaß.

## 5.2 Summary

The oomycete *Phytophthora infestans* not only causes potato late blight but, as a consequence, gives rise to costs of several million dollars annually including those incurred by crop losses and control measures. Iprovalicarb and dimethomorph are two oomycete-specific chemical components widely used against different *Phytophthora species*. Despite intensive research carried out over the last years, the target as well as the mode of action of both components remain unknown. Based on previous findings, the target was assumed to be involved in cell wall synthesis. One hypothesis is that these active ingredients affect the localisation of the cell wall synthesizing enzymes cellulose synthase and chitin synthase.

For *in situ* immunolocalisations of both enzymes, specific antibodies against different cytosolic domains of the cellulose synthase and the chitin synthase from *Phytophthora infestans* were produced. Then, by using immunofluorescence microscopy, the localization and distribution of both enzymes after treatment with iprovalicarb and dimethomorph were detected. Cellulose synthase was detected in the plasma membrane of *Phytophthora infestans* hyphae in a uniformly punctate distribution. Treatment with iprovalicarb led to a partial agglomeration of cellulose synthase, whereas dimethomorph had no effect on the localisation of the enzyme complex.

Chitin synthase was not detected in hyphae but in the tip of germinating zoosporangia. Treatment with iprovalicarb and dimethomorph did not impact the localisation of the chitin synthase. These results were improved by the staining of chitin with Texas Red-marked wheat germ agglutinin.

With the antibodies both enzymes were localised in detergent resistant membranes (DRM). In other eukaryotes, DRM contain sterol-rich lipid rafts and therefore *Phytophthora infestans* cells were stained with filipin. The dye bound uniformly to the whole membrane of hyphae and zoosporangia. Treatment with iprovalicarb and dimethomorph did not result in obvious changes in the distribution of sterols.

In order to gain insights into the similarities and differences of the modes of action of iprovalicarb and dimethomorph, quantitative and qualitative analyses of the proteome of untreated and chemical component-treated *P. infestans* cultures were performed. Proteins with altered levels in response to chemical component treatment compared to untreated controls were sequenced and their underlying genes were identified by comparison to the *Phytophthora infestans* genome. While iprovalicarb and dimethomorph reveal similarities in the produced effects, the effect of metalaxyl was clearly distinct from both other compounds. *Phytophthora infestans* exhibits a general plant-like defense response to iprovalicarb and dimethomorph. Furthermore, the changes caused by dimethomorph can possibly be ascribed

to defects in the transport of cell wall materials and to a cellular attempt to degrade superfluous glucans.

Finally, the phylogenetic distribution of cellulose synthase and chitin synthase were analysed. Both enzymes were represented in eukaryotes and prokaryotes. The distribution of cellulose synthase and chitin synthase among eukaryotes furthermore suggests that they were present in the eukaryotic common ancestor, which possibly possessed a cell wall.



## 6. Literaturverzeichnis

Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke Z, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai Z, Lasko P, Lei Y, Levitsky AA, Li J, Li Z, Liang Y, Lin X, Liu X, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RD, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Sidén-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirskas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang G, Zhao Q, Zheng L, Zheng XH, Zhong FN, Zhong W, Zhou X, Zhu S, Zhu X, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.

Abo-Elghar GE, Fujiyoshi P, Matsumura F. (2004). Significance of the sulfonyleurea receptor (SUR) as the target of diflubenzuron in chitin synthesis inhibition in *Drosophila melanogaster* and *Blattella germanica*. *Insect Biochem Mol Biol.* 34(8):743-752.

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 52(5):399-451.

Allen ML, Dobrowolski JM, Muller H, Sibley LD, Mansour TE. (1997). Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol.* 88(1-2):43-52.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

Amikam D, Benziman M. (1989). Cyclic diguanylic acid and cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 171(12), 6649-6655.

Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP. (1995). A membrane-associated form of sucrose-synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:9353-9357.

Arakane Y, Hogenkamp DG, Zhu YC, Kramer KJ, Specht CA, Beeman RW, Kanost MR, Muthukrishnan S. (2004). Characterization of two chitin synthase genes of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and alternate exon usage in one of the genes during development. *Insect Biochem Mol Biol.* 34(3):291-304.

Arakane Y, Muthukrishnan S, Kramer KJ, Specht CA, Tomoyasu Y, Lorenzen MD, Kanost M, Beeman RW. (2005). The *Tribolium* chitin synthase genes TcCHS1 and TcCHS2 are specialized for synthesis of epidermal cuticle and midgut peritrophic matrix. *Insect Mol Biol.* 14(5):453-463.

- Arioli T, Peng L, Betzner AS, Burn J, Wittke W, Herth W, Camilleri C, Höfte H, Plazinski J, Birch R, Cork A, Glover J, Redmond J, Williamson RE. (1998).** Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*. *Science*. 279(5351):717-720.
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kröger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS. (2004).** The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*. 306(5693):79-86.
- Arora A, Raghuraman H, Chattopadhyay A. (2004).** Influence of cholesterol and ergosterol on membrane dynamics: a fluorescence approach. *Biochem Biophys Res Commun*. 318(4):920-926.
- Arroyo-Begovich A, Carabez-Trejo A. (1982).** Location of chitin in the cyst wall of *Entamoeba invadens*. *J Parasitol*. 68:253-258.
- Appenzeller L, Doblin M, Barreiro R, Wang H, Niu X, Kollipara K, Carrigan L, Tomes D, Chapman M, Dhugga KS. (2004).** Cellulose synthesis in maize: isolation and expression analysis of cellulose synthase (CesA) gene family. *Cellulose* 11:287-299.
- Attard A, Gourgues M, Galiana E, Panabières F, Ponchet M, Keller H. (2008)** Strategies of attack and defense in plant-oomycete interactions, accentuated for *Phytophthora parasitica* Dastur (syn. *P. Nicotianae* Breda de Haan). *J Plant Physiol*. 165(1):83-94.
- Avila-Adame C, Gomez-Alpizar L, Zisman V, Jones KM, Buell CR, Ristaino JB. (2006).** Mitochondrial genome sequences and molecular evolution of the Irish potato famine pathogene, *Phytophthora infestans*. *Curr Genet*. 49(1), 39-46.
- Ayres PG. (2004).** Alexis Millardet: France's forgotten mycologist. *Mycologist*. 18(1):23-26.
- Badreddine I, Lafitte C, Heux L, Skandalis N, Spanou Z, Martinez Y, Esquerré-Tugayé MT, Bulone V, Dumas B, Bottin A. (2008).** Cell wall chitosaccharides are essential components and exposed patterns of the phytopathogenic oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Eukaryot Cell*. 7(11):1980-1993.
- Barthelmebs L, Diviès C, Cavin JF. (2001).** Expression in *Escherichia coli* of native and chimeric phenolic acid decarboxylases with modified enzymatic activities and method for screening recombinant *E. coli* strains expressing these enzymes. *Appl Environ Microbiol*. 67(3):1063-1069.
- Bartnicki-Garcia S. (1968).** Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol*. 22:87-108.
- Bartnicki-Garcia S, Wang MC. (1983).** Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology* (eds. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, P.H. Tsao), St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society, 121-137.
- Belinato TA, Martins AJ, Lima JB, de Lima-Camara TN, Peixoto AA, Valle D. (2009).** Effect of the chitin synthesis inhibitor triflumuron on the development, viability and reproduction of *Aedes aegypti*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(1):43-47.
- Bennington KC. (1985).** Ultrastructural changes in the cuticle of the sheep blowfly, *Lucilia*, induced by certain insecticides and biological inhibitors. *Tissue & Cell*. 17:131-140.
- Bernofsky C, Utter MF. (1966).** Mitochondrial isocitrate dehydrogenases from yeast. *J Biol Chem*. 241(22):5461-5466.
- Bessueille L, Bulone V. (2008).** A survey of cellulose biosynthesis in higher plants. *Plant biotechnology*. 25:315-322.
- Blanton RL, Fuller D, Iranfar N, Grimson MJ, Loomis WF. (2000).** The cellulose synthase gene of *Dictyostelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(5):2391-2396.

- Bloch R, Burger MM. (1974).** Purification of wheat germ agglutinin using affinity chromatography on chitin. *Biochem Biophys Res Commun.* 58(1):13-9.
- Bracker CE, Ruiz-Herrera J, Bartnicki-Garcia S. (1976).** Structure and transformation of chitin synthase (chitosomes) during microfibril synthesis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73:4570-4574.
- Bradford M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-252.
- Brasier CM, Sansome E. (1975)** Diploidy and gametangial meiosis in *Phytophthora cinnemomi*, *P. infestans* and *P. drechsleri*. *Trans Br Mycol Soc.* 65:49-65.
- Braun PC, Calderone RA. (1978).** Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. *J Bacteriol.* 133(3):1472-7.
- Briolay A, Bouzenzana J, Guichardant M, Deshayes C, Sindt N, Bessueille L, Bulone V. (2009).** Cell wall polysaccharide synthases are located in detergent-resistant membrane microdomains in oomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 75(7):1938-1949.
- Brown DA, Rose JK. (1992).** Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell.* 68(3):533-544.
- Brown RM Jr. (1996).** The biosynthesis of cellulose. *J Macromol Sci* 10:1345-1373.
- Bryant, D., Moulton, V. (2004).** Neighbor-Net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21, 255-264.
- Buckeridge MS, Vergara CE, Carpita NC. (2001).** Insight into multi-site mechanisms of glycosyl transfer in (1-->4)beta-D-glycans provided by the cereal mixed-linkage (1-->3),(1-->4)beta-D-glucan synthase. *Phytochemistry.*57(7):1045-1053.
- Bulawa CE, Slater M, Cabib E, Au-Young J, Sburlati A, Adair WL Jr, Robbins PW. (1986).** The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. *Cell.* 46(2):213-225.
- Burton RA, Shirley NJ, King BJ, Harvey AJ, Fincher GB. (2004).** The CesA gene family of barley. Quantitative analysis of transcripts reveals two groups of co-expressed genes. *Plant Physiology* 134:224-236.
- Campos-Góngora E, Ebert F, Willhoeft U, Said-Fernández S, Tannich E. (2004).** Characterization of chitin synthases from *Entamoeba*. *Protist.* 155(3):323-330.
- Carlstrom D. (1957).** The crystal structure of alpha-chitin (poly-N-acetyl-D-glucosamine). *J Biophys Biochem Cytol.*3(5):669-683.
- Casalou C, Cyrne L, Rosa MR, Soares H. (2001).** Microtubule cytoskeleton perturbation induced by taxol and colchicine affects chaperonin containing TCP-1 (CCT) subunit gene expression in *Tetrahymena* cells. *Biochim Biophys Acta.* 1522(1):9-21.
- Cavalier-Smith T. (1999).** Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol.* 46(4):3473-3466.
- Cavalier-Smith T. (2000).** Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5:174-182.
- Cavalier-Smith T. (2002).** Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol.* 12(2):R62-64.
- Cavalier-Smith T. (2002).** The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol.* 52(Pt 2):297-354.

- Cavin JF, Dartois V, Diviès C. (1998).** Gene cloning, transcriptional analysis, purification, and characterization of phenolic acid decarboxylase from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol.* 64(4):1466-1471.
- Chang HC, Lindquist S. (1994).** Conservation of Hsp90 macromolecular complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 269(40):24983-24988.
- Chen S, Smith DF. (1998).** Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (Hsp70) and hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem.* 273(52):35194-35200.
- Chen X, Sullivan DS, Huffaker TC. (1994).** Two yeast genes with similarity to TCP-1 are required for microtubule and actin function in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(19):9111-9115.
- Cohen E. (1982).** In vitro chitin synthesis in an insect: formation and structure of microfibrils. *Eur J Cell Biol.* 16:284-294.
- Cohen E. (2001).** Chitin synthesis and inhibition: a revisit. *Pest Manag Sci.* 57(10):946-950.
- Cohen Y, Baider A, Cohen BH. (1995).** Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens. *Phytopathology.* 85:1500-1506.
- Cohen Y, Rubin E, Hadad T, Gotlieb D, Sierotzki H, Gisi U. (2007).** Sensitivity of *Phytophthora infestans* to mandipropamid and the effect of enforced selection pressure in the field. 56(5):836-842.
- Cohen Y, Gisi U. (2007).** Differential activity of carboxylic acid amide fungicides against various developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology.* 97(10):1274-1283
- Cohen Y, Rubin E, Gotlieb D. (2008).** Activity of carboxylic acid amide (CAA) fungicides against *Bremia lactucae*. *Eur J Plant Pathol.* 122:169-183.
- Cos T, Ford RA, Trilla JA, Duran A, Cabib E, Roncero C. (1998).** Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem.* 256(2):419-426.
- Cox CJ, Foster PG, Hirt RP, Harris SR, Embley TM. (2008).** The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(51):20356-20361.
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof YD, Schumacher K, Gonneau M, Höfte H, Vernhettes S. (2009).** Pausing of Golgi Bodies on Microtubules Regulates Secretion of Cellulose Synthase Complexes in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*
- Dagan T, Artzy-Randrup Y, Martin W. (2008).** Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(29):10039-10044.
- Das S, Gillin FD. (1991).** Chitin synthase in encysting *Entamoeba invadens*. *Biochem J.* 280 (3):641-647.
- DeBolt S, Gutierrez R, Ehrhardt DW, Melo CV, Ross L, Cutler SR, Somerville C, Bonetta D. (2007).** Morlin, an inhibitor of cortical microtubule dynamics and cellulose synthase movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(14):5854-5859.
- DeBolt S, Gutierrez R, Ehrhardt DW, Somerville C. (2007).** Nonmotile cellulose synthase subunits repeatedly accumulate within localized regions at the plasma membrane in *Arabidopsis* hypocotyl cells following 2,6-dichlorobenzonitrile treatment. *Plant Physiol.* 145(2):334-338.
- de Duve C. (2007).** The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nat Rev Genet.* 8(5):395-403.
- Dekker C, Stirling PC, McCormack EA, Filmore H, Paul A, Brost RL, Costanzo M, Boone C, Leroux MR, Willison KR. (2008).** The interaction network of the chaperonin CCT. *EMBO J.* 27(13):1827-1839.
- Delmer DP, Read SM, Cooper G. (1987).** Identification of a Receptor Protein in Cotton Fibers for the Herbicide 2,6-Dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol.* 84(2):415-420.

- Delmer DP. (1999).** Cellulose biosynthesis: Exciting Times for A Difficult Field of Study. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 50:245-276.
- Desprez T, Juraniec M, Crowell EF, Jouy H, Pochylova Z, Parcy F, Höfte H, Gonneau M, Vernhettes S. (2007).** Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(39):15572-15577.
- Desprez T, Vernhettes S, Fagard M, Refrégier G, Desnos T, Aletti E, Py N, Pelletier S, Höfte H. (2002).** Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6. *Plant Physiol.* 128(2):482-490.
- Dittmar KD, Pratt WB. (1997).** Folding of the glucocorticoid receptor by the reconstituted Hsp90-based chaperone machinery. The initial hsp90.p60.hsp70-dependent step is sufficient for creating the steroid binding conformation. *J Biol Chem.* 272(20):13047-13054.
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. (2002).** Plant glutathione transferases. *Genome Biol.* 3(3):3004.1-3004.10.
- Djerbi S, Lindskog M, Arvestad L, Sterky F, Teeri TT. (2005).** The genome sequence of black cottonwood (*Populus trichocarpa*) reveals 18 conserved cellulose synthase (CesA) genes. *Planta.* 221(5):739-746.
- Doblin MS, Kurek I, Jacob-Wilk D, Delmer DP. (2002).** Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol.* 43(12):1407-1420.
- Dubinský P, Rybos M, Turceková L. (1986).** Properties and localization of chitin synthase in *Ascaris suum* eggs. *Parasitology.* 92 ( Pt 1):219-225.
- Duncan JM. (1999).** *Phytophthora* - an abiding threat to our crops. *Microbiol today.* 26:114-116.
- Dutzmann S. (1999).** Iprovalicarb (SZX 0722)-a novel fungicide with specific activity against oomycetes. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52/1, 15-32.
- Edgar R. (2004).** MUSCLE: Multiple sequence alignment with high score accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792-1797.
- Embley TM, Martin W. (2006).** Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature.* 440(7084):623-630.
- Emons AM, Mulder BM. (2000).** How the deposition of cellulose microfibrils builds cell wall architecture. *Trends Plant Sci.* 5(1):35-40.
- Encina A, Sevillano JM, Acebes JL, Alvarez J. (2002).** Cell wall modifications of bean (*Phaseolus vulgaris*) cell suspensions during habituation and dehabituation to dichlobenil. *Physiol Plant.* 114(2):182-191.
- Engelhardt J. (1995).** Sources, industrial derivatives: and commercial application of cellulose. *Carbohydr Eur* 12:5-14.
- Esser C, Ahmadinejad N, Wiegand C, Rotte C, Sebastiani F, Gelius-Dietrich G, Henze K, Kretschmann E, Richly E, Leister D, Bryant D, Steel MA, Lockhart PJ, Penny D, Martin W. (2004).** A genome phylogeny for mitochondria among alpha-proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes. *Mol Biol Evol.* 21(9):1643-1660.
- Farquharson KL. (2009).** Cortical microtubules regulate the insertion of cellulose synthase complexes in the plasma membrane. *Plant Cell.*
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 132 (1): 6-13.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1984).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* 137 (1): 266-267.

- Fiedler K, Kobayashi T, Kurzchalia TV, Simons K (1993).** Glycosphingolipid-enriched, detergent-insoluble complexes in protein sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 32: 6365–6373.
- Fisher DJ, Hayes AL. (1982).** Mode of Action of the systemic fungicides Furalaxyl, Metalaxyl and Ofuracea. *Pestic. Sci.* 13:330-339.
- Foissner W, Pichler M. (2006).** The unusual, Lepidosome-coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): Genesis of four complex types of wall precursors and assemblage of the cyst wall. *Acta Protozool.* 45:339-366.
- Fry W. (2008).** *Phytophthora infestans*: the plant (and *R* gene) destroyer. *Mol Plant Pathol.* 9(3):385-402.
- Gao Y, Thomas JO, Chow RL, Lee GH, Cowan NJ. (1992).** A cytoplasmic chaperonin that catalyzes beta-actin folding. *Cell.* 69(6):1043-1050.
- Gao Y, Vainberg IE, Chow RL, Cowan NJ. (1993).** Two cofactors and cytoplasmic chaperonin are required for the folding of alpha- and beta-tubulin. *Mol Cell Biol.* 13(4):2478-2485.
- Giddings TH Jr, Brower DL, Staehelin LA. (1980).** Visualization of particle complexes in the plasma membrane of *Micrasterias denticulata* associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary walls. *J Cell Biol.* 84:327-339.
- Ginsbach C, Fahimi HD. (1987).** Labeling of cholesterol with filipin in cellular membranes of parenchymatous organs. Standardization of incubation conditions. *Histochemistry.* 1987;86(3):241-8
- Gomez-Alpizar L, Carbone I, Ristaino JB. (2007).** An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(9), 3306-3309.
- Grantham J, Ruddock LW, Roobol A, Carden MJ. (2002).** Eukaryotic chaperonin containing T-complex polypeptide 1 interacts with filamentous actin and reduces the initial rate of actin polymerization in vitro. *Cell Stress Chaperones.* 7(3):235-242.
- Grayson BT, Webb JD, Batten DM, Edwards D. (1995).** Effect of adjuvants on the therapeutic activity of dimethomorph in controlling vine downy mildew. I. Survey of adjuvant types. *Pestic. Sci.* 46:199-206.
- Grayson BT, Batten DM, Walter D. (1996).** Adjuvant effects on the therapeutic control of potato late blight by dimethomorph wettable powder formulations. *Pestic. Sci.* 46:355-359.
- Green PB. (1962).** Mechanism for Plant Cellular Morphogenesis. *Science.* 138(3548):1404-1405.
- Grenville-Briggs LJ, Anderson VL, Fugelstad J, Avrova AO, Bouzenzana J, Williams A, Wawra S, Whisson SC, Birch PR, Bulone V, van West P. (2008).** Cellulose synthesis in *Phytophthora infestans* is required for normal appressorium formation and successful infection of potato. *Plant Cell.* 20(3):720-38.
- Grimson MJ, Haigler CH, Blanton RL. (1996).** Cellulose microfibrills, cell motility and plasma membrane protein organization change in parallel during culmination in *Dictyostelium discoideum*. *J Cell Sci.* 109:3079-3087.
- Haigler CH, Brown RM Jr. (1986).** Transport of rosettes from the golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture. *Protoplasma.* 134:111-120.
- Haigler CH, Blanton RL. (1996).** New hope for old dreams: evidence that plant cellulose synthase genes have finally been identified. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:12082-12085.
- Haigler CH, Ivanova-Datcheva M, Hogan PS, Salnikov VV, Hwang S, Martin K, Delmer DP. (2001).** Carbon partitioning to cellulose synthesis. *Plant Mol Biol.* 47(1-2):29-51.

- Hardham AR, Gunning BE. (1978).** Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J Cell Biol.* 77(1):14-34
- Harris MT, Lai K, Arnold K, Martinez HF, Specht CA, Fuhrman JA. (2000).** Chitin synthase in the filarial parasite, *Brugia malayi*. *Mol Biochem Parasitol.* 111(2):351-62.
- Haslam RJ, Koide HB, Hemmings BA. (1993).** Pleckstrin domain homology. *Nature.* 363(6427):309-310.
- Heath IB. (1974).** A unified hypothesis for the role of membrane bound enzyme complexes and microtubules in plant cell wall synthesis. *J Theor Biol* 48:445-449.
- Heim DR, Skomp JR, Tschabold EE, Larrinua IM. (1990).** Isoxaben inhibits the synthesis of acid insoluble cell wall materials in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 93(2):695-700.
- Hengel MJ, Shibamoto T. (2000).** Gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of dimethomorph fungicide in dried hops. *J Agric Food Chem.* 48(12):5824-5828.
- Hepler PK, Palevitz PA. (1974).** Microtubules and microfilaments. *Annu Rev Plant Physiol.* 25:309-362.
- Hernandez J, Lopez-Romero E, Cerbon J, Ruiz-Herrera J. (1981).** Lipid analysis of chitosomes, chitin synthesizing microvesicles from *Mucor rouxii*. *Exp Mycol.* 5:349-356.
- Herth W. (1983).** Arrays of plasma-membrane 'rosettes' involved in cellulose microfibril formation of *Spirogyra*. *Planta.* 159:347-356.
- Hess K, Haller R, Katz JR. (1928).** Die Chemie der Cellulose und ihrer Begleiter. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.
- Hogenkamp DG, Arakane Y, Zimoch L, Merzendorfer H, Kramer KJ, Beeman RW, Kanost MR, Specht CA, Muthukrishnan S. (2005).** Chitin synthase genes in *Manduca sexta*: characterization of a gut-specific transcript and differential tissue expression of alternately spliced mRNAs during development. *Insect Biochem Mol Biol*35(6):529-540.
- Holland N, Holland D, Helentjaris T, Dhugga KS, Xoconostle-Cazares B, Delmer DP. (2000).** A comparative analysis of the plant cellulose synthase (CesA) gene family. *Plant Physiol.* 123(4):1313-1324.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chaturverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanagan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin JJ, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X, Woodford KJ, Wortman JR, Wu M, Yao A, Zdobnov EM, Zhang H, Zhao Q, Zhao S, Zhu SC, Zhimulev I, Coluzzi M, della Torre A, Roth CW, Louis C, Kalush F, Mural RJ, Myers EW, Adams MD, Smith HO, Broder S, Gardner MJ, Fraser CM, Birney E, Bork P, Brey PT, Venter JC, Weissenbach J, Kafatos FC, Collins FH, Hoffman SL. (2002).** The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129-149.
- Honoré B, Leffers H, Madsen P, Rasmussen HH, Vandekerckhove J, Celis JE. (1992).** Molecular cloning and expression of a transformation-sensitive human protein containing the TPR motif and sharing identity to the stress-inducible yeast protein ST11. *J Biol Chem.* 267(12):8485-8491.
- Ibrahim GH, Smartt CT, Kiley LM, Christensen BM. (2000).** Cloning and characterization of a chitin synthase cDNA from the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30(12):1213-1222.

- Imai T, Watanabe T, Yui T, Sugiyama J. (2003).** The directionality of chitin biosynthesis: a revisit. *Biochem J.* 374:755–760.
- Insenser M, Nombela C, Molero G, Gil C. (2006).** Proteomic analysis of detergent-resistant membranes from *Candida albicans*. *Proteomics.* 6 Suppl 1:S74-81.
- Itoh T, Brown RM Jr. (1984).** The assembly of cellulose microfibrils in *Valonia macrophysa* Kütz. *Planta* 160:372-381.
- Jacob-Wilk D, Kurek I, Hogan P, Delmer DP. (2006).** The cotton fiber zinc-binding domain of cellulose synthase A1 from *Gossypium hirsutum* displays rapid turnover in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(32):12191-12196.
- Jende G, Steiner U, Dehne HW. (1999).** Effects of iprovalicarb (SZX 0722) on the development of *Phytophthora infestans* in tomato plants. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52/1, 49-60.
- Jende G. (2001).** Die Zellwand des Oomyceten *Phytophthora infestans* als Wirkort von Fungiziden, Dissertation, Institut für Pflanzenkrankheiten der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Jende G, Steiner U, Dehne HW. (2001).** Microscopical characterization of fungicidal effects on infection structures and cell wall formation of *Phytophthora infestans*. *Modern Fungicides and Antifungal Compounds III.* 13<sup>th</sup> International Reinhardsbrunn Symposium. May 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> 2001.
- Johnson WA. (1939).** Aconitase. *Biochem J.* 33(6):1046-1053.
- Joshi CP, Mansfield SD. (2007).** The cellulose paradox--simple molecule, complex biosynthesis. *Curr Opin Plant Biol.* 10(3):220-226.
- Judelson HS, Tyler BM, Michelmore RW. (1991).** Transformation of the oomycete pathogen, *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact.* 4(6):602-607.
- Judelson HS. (1997).** The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genet Biol* 22(2), 65-76.
- Kamst E, Bakkers J, Quaedvlieg NE, Pilling J, Kijne JW, Lugtenberg BJ, Spaink HP. (1999).** Chitin oligosaccharide synthesis by rhizobia and zebrafish embryos starts by glycosyl transfer to O4 of the reducing-terminal residue. *Biochemistry.* 38(13):4045-4052.
- Kamst E, Spaink PH (1999)** Functional domains in the chitin oligosaccharide synthase NodC and related beta-polysaccharide synthases. *Trends Glycosci Glycotechol* 11:187–199
- Karpinska B, Karlsson M, Schinkel H, Steller S, Süß KH, Melzer M, Wingsle G. (2001).** A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiol.* 126(4):1668-1677.
- Khyse-Anderson NI. (1984).** Electrophotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 10, 203-209.
- Kiedaisch BM, Blanton RL, Haigler CH. (2003).** Characterization of a novel cellulose synthesis inhibitor. *Planta.* 2003 Oct;217(6):922-930.
- Kim KB, Lee JS, Ko YG. (2008).** The isolation of detergent-resistant lipid rafts for two-dimensional electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 424:413-422.
- Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder CR, Brown RM Jr. (1999).** Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *Plant Cell.* 11(11):2075-2086.
- Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA. (1994).** Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J.* 8(2):174-181.



- Knowles EJ, Castenholz RW. (2008).** Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol.* 66(2):261-270.
- Kramer KJ, Koga D. (1986).** Insect chitin: physical state, synthesis, degradation and metabolic regulation. *Insect Biochem.* 16:851-877.
- Kubota H, Hynes G, Willison K. (1995).** The eighth Cct gene, Cctq, encoding the theta subunit of the cytosolic chaperonin containing TCP-1. *Gene.* 154(2):231-236.
- Kubota H, Yokota S, Yanagi H, Yura T. (2000).** Transcriptional regulation of the mouse cytosolic chaperonin subunit gene Ccta/t-complex polypeptide 1 by selenocysteine tRNA gene transcription activating factor family zinc finger proteins. *J Biol Chem.* 275(37):28641-28648.
- Kuhn PJ, Pitt D, Lee SA, Walkley G, Sheppard AN. (1991).** Effects of dimethomorph on the morphology and ultrastructure of *Phytophthora*. *Mycological Research.* 95 (3), 333-340.
- Kurek I, Kawagoe Y, Jacob-Wilk D, Doblin M, Delmer D. (2002).** Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(17):11109-11114.
- Laemmli UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Leal-Morales CA, Gay L, Fèvre M, Bartnicki-García S. (1997).** The properties and localization of *Saprolegnia monoica* chitin synthase differ from those of other fungi. *Microbiology.* 143 (7):2473-2483.
- Lee TY, Mizubuti E, Fry WE. (1999).** Genetics of metalaxyl resistance in *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet Biol.* 26(2):118-130.
- Lehane MJ. (1997).** Peritrophic matrix structure and function. *Annu Rev Entomol.* 42:525-550.
- Lemmon MA, Ferguson KM. (2001).** Molecular determinants in pleckstrin homology domains that allow specific recognition of phosphoinositides. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 4):377-384.
- Lerouxel O, Cavalier DM, Liepman AH, Keegstra K. (2006).** Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides - a complex process. *Curr Opin Plant Biol.* 9(6):621-630.
- Lewis AJ, Miller JD. (1977).** The tricarboxylic acid pathway in *Desulfovibrio*. *Can J Microbiol.* 23(7):916-921.
- Lin CC, Aronson JM. (1970).** Chitin and cellulose in the cell walls of the oomycetes *Apodachlya*. *Arch. Mikrobiol.* 72:111-114.
- Lloyd C, Chan J. (2008).** The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Curr Opin Plant Biol.* 11:1-6.
- Locke M, Huie P. (1979).** Apolysis and turnover of plasma membrane plaques during cuticle formation in an insect. *Tissue & cell.* 11:277-291.
- Lu Y, O'Dowd BF, Orrego H, Israel Y. (1992).** Cloning and nucleotide sequence of human liver cDNA encoding for cystathionine gamma-lyase. *Biochem Biophys Res Commun.* 189(2):749-758.
- Marrs KA. (1996).** The functions and regulations of glutathione S-transferases in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47:127-158.
- Marshall JA, Dennis AL, Kumazawa T, Haynes AM, Nes WD. (2001).** Soybean sterol composition and utilization by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry.* 58(3):423-428.
- Martin SW, Konopka JB. (2004).** Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell.* 3(3):675-684.

- Matthysse AG, White S, Lightfoot R. (1995).** Genes required for cellulose synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. J Bacteriol. 177:1069-1075.
- Matthysse AG, Deschet K, Williams M, Marry M, White AR, Smith WC. (2004).** A functional cellulose synthase from ascidian epidermis. Proc Natl Acad Sci USA 101(4), 986-991.
- May MJ, Leaver CJ. (1993).** Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures. Plant Physiol. 103(2):621-627.
- May MJ, Leaver CJ. (1994).** *Arabidopsis thaliana* gamma-glutamylcysteine synthetase is structurally unrelated to mammalian, yeast, and *Escherichia coli* homologs. Proc Natl Acad Sci U S A. 91(21):10059-10063.
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC, Albersheim P. (1984).** Structure and function of the primary cell walls of plants. Annu Rev Biochem. 53:625-663.
- Mehl A, Buchenauer H. (2001).** Investigations of the biochemical mode of action of iprovalicarb. Modern Fungicides and Antifungal Compounds III. 13<sup>th</sup> International Reinhardtsbrunn Symposium. May 14<sup>th</sup>-18<sup>th</sup> 2001.
- Mehl A. (2006).** Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Iprovalicarb, Dissertation, Institut für Phytomedizin der Universität Hohenheim.
- Melchior F, Paschal B, Evans J, Gerace L. (1993).** Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. J Cell Biol.123(6 Pt 2):1649-1659.
- Melki R, Vainberg IE, Chow RL, Cowan NJ. (1993).** Chaperonin-mediated folding of vertebrate actin-related protein and gamma-tubulin. J Cell Biol. 122(6):1301-1310.
- Mellado E, Aufauvre-Brown A, Specht CA, Robbins PW, Holden DW. (1995).** A multigene family related to chitin synthase genes of yeast in the opportunistic pathogen *Aspergillus fumigatus*. Mol Gen Genet. 246(3):353-359.
- Melov S. (2000).** Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. Ann N Y Acad Sci. 908:219-225.
- Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R. (2005).** Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. FEMS Microbiol Rev. 29(4):653-671.
- Merz RA, Horsch M, Nyhlén LE, Rast DM. (1999).** Biochemistry of chitin synthase. EXS. 87:9-37.
- Merzendorfer H, Zimoch L. (2003).** Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. J Exp Biol. 206:4393-4412.
- Merzendorfer H. (2006).** Insect chitin synthases: a review. J Comp Physiol [B]. 176(1):1-15.
- Millardet PMA. (1885).** Sur l'histoire du traitement du mildiou par le sulfate de cuivre. Journal Agricolt Pratique 2, 801-805; Engl. transl. by F.J. Schneiderhan in Phytopathol. ClassicsNo 3 (1933).
- Mølhøj M, Pagant S, Höfte H. (2002).** Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis. Plant Cell Physiol. 43(12):1399-406.
- Montezinos D, Brown M Jr. (1976).** Surface architecture of the plant cell: biogenesis of the cell wall, with special emphasis on the role of the plasma membrane in cellulose biosynthesis. J Supramol Struct.5(3):277-290.
- Montezinos D, Brown RM Jr. (1978).** Cell wall biogenesis in *Oocystis*: experimental alteration of microfibril assembly and orientation. Cytobios. 23(90):119-139.

- Mort-Bontemps M, Gay L, Fèvre M. (1997).** CHS2, a chitin synthase gene from the oomycete *Saprolegnia monoica*. *Microbiology*. 143:2009-2020.
- Moore PM, Peberdy JF. (1975).** Biosynthesis of chitin by particulate fractions from *Cunninghamella elegans*. *Microbios*. 12(47-48):29-39.
- Mueller SC, Brown RM Jr. (1980).** Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril synthesizing complex in higher plant. *J Cell Biol*. 84:315-326.
- Mutwil M, Debolt S, Persson S. (2008).** Cellulose synthesis: a complex complex. *Curr Opin Plant Biol*. 11(3):252-257.
- Nagasawa T, Kanzaki H, Yamada H. (1984).** Cystathionine gamma-lyase of *Streptomyces phaeochromogenes*. The occurrence of cystathionine gamma-lyase in filamentous bacteria and its purification and characterization. *J Biol Chem*. 259(16):10393-10403.
- Nakagawa Y, Matsumura F. (1994).** Diflubenzuron affects gamma-thioGTP stimulated Ca<sup>2+</sup> transport in vitro in intracellular vesicles from the integument of the newly molted American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Insect Biochem Mol Biol*. 24(10):1009-1015.
- Nakashima K, Yamada L, Satou Y, Azuma J, Satoh N. (2004).** The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Dev Genes Evol*. 214:81-88.
- Neuefeind T, Reinemer P, Bieseler B. (1997).** Plant glutathione S-transferases and herbicide detoxification. *Biol Chem*. 378(3-4):199-205.
- Nicol H, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H, Höfte H. (1998).** A plasma membrane-bound putative endo-1,4-beta-D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO Journal*. 17:5563-5576.
- Nicolet CM, Craig EA. (1989).** Isolation and characterization of ST11, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 9(9):3638-3646.
- Nobles DR, Romanovicz DK, Brown RM Jr. (2001).** Cellulose in cyanobacteria. Origin of vascular plant cellulose synthase? *Plant Physiol*. 127(2):529-542.
- Pagant S, Bichet A, Sugimoto K, Lerouxel O, Desprez T, McCann M, Lerouge P, Vernhettes S, Hofte H. (2002).** *Kobito1* encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 14:2001-2013.
- Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW. (2006).** Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*. 312(5779):1491-1495.
- Paradez A, Wright A, Ehrhardt DW. (2006).** Microtubule cortical array organization and plant cell morphogenesis. *Curr Opin Plant Biol*. 9(6):571-578.
- Pasrija R, Panwar SL, Prasad R. (2008).** Multidrug transporters CaCdr1p and CaMdr1p of *Candida albicans* display different lipid specificities: both ergosterol and sphingolipids are essential for targeting of CaCdr1p to membrane rafts. *Antimicrob Agents Chemother*. 52(2):694-704.
- Pear JR, Kawagoe Y, Schreckengost WE, Delmer DP, Stalker DM. (1996).** Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(22):12637-12642.
- Peng L, Xiang F, Roberts E, Kawagoe Y, Greve LC, Kreuz K, Delmer DP. (2001).** The experimental herbicide CGA 325'615 inhibits synthesis of crystalline cellulose and causes accumulation of non-crystalline beta-1,4-glucan associated with CesaA protein. *Plant Physiol*. 126(3):981-992.
- Peng L, Kawagoe Y, Hogan P, Delmer D. (2002).** Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*. 295(5552):147-150.

- Persson S, Paredez A, Carroll A, Palsdottir H, Doblin M, Poindexter P, Khitrov N, Auer M, Somerville CR. (2007).** Genetic evidence for three unique components in primary cell-wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(39):15566-15571.
- Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, van West P. (2008).** New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends Microbiol.* 16:13-19.
- Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ Jr, Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, Murphy R, Templer R, Tschaplinski T. (2006).** The path forward biofuels and biomaterials. *Science.* 311:484-489.
- Rajangam AS, Kumar M, Aspeborg H, Guerriero G, Arvestad L, Pansri P, Brown CJ, Hober S, Blomqvist K, Divne C, Ezcurra I, Mellerowicz E, Sundberg B, Bulone V, Teeri TT. (2008).** MAP20, a microtubule-associated protein in the secondary cell walls of hybrid aspen, is a target of the cellulose synthesis inhibitor 2,6-dichlorobenzonitrile. *Plant Physiol.* 148(3):1283-94.
- Rand JD, Grant CM. (2006).** The thioredoxin system protects ribosomes against stress-induced aggregation. *Mol Biol Cell.* 17(1):387-401.
- Reinemer P, Prade L, Hof P, Neufeind T, Huber R, Zettl R, Palme K, Schell J, Koelln I, Bartunik HD, Bieseler B. (1996).** Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *J Mol Biol.* 19;255(2):289-309.
- Reiter WD. (2002).** Biosynthesis and properties of the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol.* 5(6):536-42.
- Richmond T. (2000).** Higher plant cellulose synthases. *Genome Biol.* 1(4): REVIEWS 3001.1-3001-6.
- Ristaino JB. (2002).** Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Microbes infect.* 4(13), 1369-1377.
- Rivera MC, Jain R, Moore JE, Lake JA. (1998).** Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(11):6239-6244.
- Rivera MC, Lake JA. (2004).** The ring of life provides evidence for a genome fusion origin of eukaryotes. *Nature.* 431(7005):152-155.
- Roberts AW, Roberts EM, Delmer DP. (2002).** Cellulose synthase (CesA) genes in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Eukaryot Cell,* 1(6), 847-855.
- Roberts AW, Roberts E. (2004).** Cellulose synthase (CesA) genes in green algae and seedless plants. *Cellulose.* 11:419-435.
- Robinson DG, Quader H. (1981).** Structure, synthesis, and orientation of microfibrils. IX. A freeze-fracture investigation of the *Oocystis* plasma membrane after inhibitor treatments. *Eur J Cell Biol.* 25(2):278-288.
- Roncero C. (2002).** The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet.* 41(6):367-78.
- Roudier F, Fernandez AG, Fujita M, Himmelspach R, Borner GH, Schindelman G, Song S, Baskin TI, Dupree P, Wasteneys GO, Benfey PN. (2005).** COBRA, an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibril orientation. *Plant Cell.* 17(6):1749-1763.
- Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP. (2008).** The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol.* 59:143-166.
- Römling U. (2002).** Molecular biology of cellulose production in bacteria. *Res Microbiol.* 153:205-212.
- Ross P, Mayer R, Benziman M. (1991).** Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Micribiol Rev* 55(1), 35-58.

- Rudall KM, Kenchington W. (1973).** The chitin system. *Biol Rev.* 48:597–636.
- Rudolph U, Gross H, Schnepf H. (1989).** Investigations of the turnover of the putative cellulose-synthesizing particle rosettes within the plasma membrane of *Funaria hygrometrica*. *Protoplasma.* 148:57-69.
- Ruiz-Herrera J, Lopez-Romero E, Bartnicki-Garcia S. (1977).** Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *mucor rauxii*. *J Biol Chem.* 252:3338-3343.
- Runno E, Koppel M. (2006).** The question of metalaxyl resistance on light blight fungus in Estonia. *Agronomy Research.* 4:341-344.
- Rushmore TH, Pickett CB. (1993).** Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem.* 268(16):11475-11478.
- Sakagishi Y. (1995).** [Alanine aminotransferase (ALT)]. *Nippon Rinsho.* 53(5):1146-1150.
- Salmon ED, McKeel M, Hays T. (1984).** Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. *J Cell Biol.* 99(3):1066-1075.
- Salvemini F, Franzé A, Iervolino A, Filosa S, Salzano S, Ursini MV. (1999).** Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *J Biol Chem.* 274(5):2750-2757.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989).** Molecular cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY* 2<sup>nd</sup> ed.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977).** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74. 5463-5467.
- Saraste M, Hyvönen M. (1995).** Pleckstrin homology domains: a fact file. *Curr Opin Struct Biol.* 5(3):403-408.
- Sato S, Kato T, Kakegawa K, Ishii T, Liu YG, Awano T, Takabe K, Nishiyama Y, Kuga S, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Shibata D. (2001).** Role of the putative membrane-bound endo-1,4-beta-glucanase KORRIGAN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 42(3):251-263.
- Saurin AJ, Borden KL, Boddy MN, Freemont PS. (1996).** Does this have a familiar ring? *Trends Biochem Sci.* 21:208-214.
- Saxena IM, Lin FC, Brown RM. (1990).** Cloning and sequencing of the cellulose synthase catalytic subunit gene of *Acetobacter xylinum*. *Plant Mol Biol* 15(5), 673.683.
- Saxena IM, Brown RM. (2000).** Cellulose synthases and related enzymes. *Curr Opin Plant Biol.* 3(6): 523-531.
- Saxena IM, Brown RM Jr. (2005).** Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts. *Ann Bot (Lond).* 96(1):9-21.
- Scheible WR, Eshed R, Richmond T, Delmer D, Somerville C. (2001).** Modifications of cellulose synthase confer resistance to isoxaben and thiazolidinone herbicides in *Arabidopsis* Ixr1 mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(18):10079-10084.
- Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, Hartl FU, Moarefi I. (2000).** Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. *Cell.* 101(2):199-210.
- Schmitt L, Tampé R. (2002).** Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* 12(6):754-760.

- Schrack K, Fujioka S, Takatsuto S, Stierhof YD, Stransky H, Yoshida S, Jürgens G. (2004).** A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in *Arabidopsis*. *Plant J.* 38(2):227-243.
- Sedbrook JC. (2004).** MAPs in plant cells: delineating microtubule growth dynamics and organization. *Curr Opin Plant Biol.* 7(6):632-640.
- Seitz T, Benet-Buchholz J, Etzel W, Schindler M. (1999).** Chemistry and stereochemistry of iprovalicarb. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52/1, 5-14.
- Sentandreu R, Martinez-Ramon A, Ruiz-Herrera J. (1984).** Localization of Chitin synthase in *Mucor rouxii* by an autoradiographic method. *J Gen Microbiol.* 130(5):1193-1199.
- Severs NJ. (1997).** Cholesterol cytochemistry in cell biology and disease. *Subcell Biochem.* 28:477-505.
- Shahabuddin M, Lemos FJ, Kaslow DC, Jacobs-Lorena M. (1996).** Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium gallinaceum*. *Infect Immun.* 64(3):739-743.
- Shaw PE. (2007).** Peptidyl-prolyl cis/trans isomerases and transcription: is there a twist in the tail? *EMBO Rep.* 8(1):40-45.
- Sheng Zhu S, Li Liu X, Fei Liu P, Li Y, Qiang Li J, Min Wang H, Kui Yuan S, Guo Si N. (2007).** Flumorph Is a Novel Fungicide That Disrupts Microfilament Organization in *Phytophthora melonis*. *Phytopathology.* 97(5):643-649.
- Sietsma JH, Din AB, Ziv V, Sjollem KA, Yarden O. (1996).** The localization of chitin synthase in membranous vesicles (chitosomes) in *Neurospora crassa*. *Microbiology.* 142:1591-1596.
- Simons K, Ikonen E. (1997).** Functional rafts in cell membranes. *Nature.* 387(6633):569-572.
- Somerville C. (2006).** Cellulose synthesis in higher plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:53-78.
- Stein JM, Kirk WW. (2004).** The generation and quantification of resistance to dimethomorph in *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.* 88:930-934.
- Steinberg G. (2007).** Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell.* 6(3):351-60
- Sternlicht H, Farr GW, Sternlicht ML, Driscoll JK, Willison K, Yaffe MB. (1993).** The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(20):9422-9426.
- Sukul P, Spittler M. (2000).** Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods. *Rev Environ Contam Toxicol.* 164:1-26.
- Suresh K, Subramanyam C. (1997).** A putative role for calmodulin in the activation of *Neurospora crassa* chitin synthase. *FEMS Microbiol Lett.* 150(1):95-100.
- Suty A, Stenzel K. (1999).** Iprovalicarb-Sensitivity of *Phytophthora infestans* and *Plasmopara viticola*: Determination of baseline sensitivity and assessment of the risk of resistance. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52/1, 71-82.
- Suzuki M, Sakuda S, Nagasawa H. (2007).** Identification of chitin in the prismatic layer of the shell and a chitin synthase gene from the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(7):1735-1744.
- Synowiecki J, Al-Khateeb NA. (2003).** Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 43(2):145-171.

- Tamaru Y, Takani Y, Yoshida T, Sakamoto T. (2005).** Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl Environ Microbiol.* 71(11):7327-7333.
- Taylor NG, Laurie S, Turner SR. (2000).** Multiple cellulose synthase catalytic subunits are required for cellulose synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12(12):2529-2540.
- Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K, Turner SR. (2003).** Interactions among three distinct CesaA proteins essential for cellulose synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(3):1450-1455.
- Taylor NG. (2008).** Cellulose biosynthesis and deposition in higher plants. *New Phytol.* 178(2):239-259.
- Tellam RL, Eisemann C. (2000).** Chitin is only a minor component of the peritrophic matrix from larvae of *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol.* 30:1189-1201.
- Tellam RL, Vuocolo T, Johnson SE, Jarmey J, Pearson RD. (2000).** Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur J Biochem.* 267(19):6025-6043.
- Thauer RK. (1988).** Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *Eur J Biochem.* 176(3):497-508.
- Theriot JA. (1997).** Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol.* 136(6):1165-1168.
- Tian SP, Yao HJ, Deng X, Xu XB, Qin GZ, Chan ZL. (2007).** Characterization and Expression of  $\beta$ -1,3-Glucanase Genes in Jujube Fruit Induced by the Microbial Biocontrol Agent *Cryptococcus laurentii*. *Phyto.* 97(3):260-268.
- Tiemann R, Pflüger W. (1999).** Ecological profile of the fungicide iprovalicarb. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 52/1, 61-70.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Toquin V, Barja F, Sirven C, Gamet S, Latorse MP, Zundel JL, Schmitt F, Beffa R. (2006).** A new mode of action for fluopicolide: modification of the cellular localization of a spectrin-like protein. *Pflanzenschutz Nachrichten Bayer* 59/2006, 171-184.
- Turnbull IF, Howells AJ. (1983).** Integumental chitin synthase activity in cell-free extracts of larvae of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, and two other species of diptera. *Aust J Biol Sci.* 36(3):251-262.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL. (2006).** *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science.* 313(5791):1261-1266.
- Ulane RE, Cabib E. (1976).** The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and properties of the activating factor. *J Biol Chem.* 251(11):3367-3674.
- Urbanowicz BR, Catalá C, Irwin D, Wilson DB, Ripoll DR, Rose JKC. (2007).** A tomato endo- $\beta$ -1,4-glucanase, SlCel9C1, represents a distinct subclass with a new family of carbohydrate binding modules (CBM49). *J Biol Chem.* 282:12066-12074.

- Ursic D, Sedbrook JC, Himmel KL, Culbertson MR. (1994).** The essential yeast Tcp1 protein affects actin and microtubules. *Mol Biol Cell.* 5(10):1065-1080.
- Van Dellen KL, Bulik DA, Specht CA, Robbins PW, Samuelson JC. (2006).** Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 5(1):203-206.
- Van Laere AJ, Carlier AR. (1977).** Chitin synthetase in *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff [proceedings] *Arch Int Physiol Biochim.* 85(5):1025-1026.
- Vergara CE, Carpita NC. (2001).**  $\beta$ -D-glycan synthases and the Cesa gene family: lessons to be learned from the mixed-linkage (1 $\rightarrow$ 3), (1 $\rightarrow$ 4)  $\beta$ -D-glucan synthase. *Plant Molecular Biology.* 47:145-160.
- Veronico P, Gray LJ, Jones JT, Bazzicalupo P, Arbucci S, Cortese MR, Di Vito M, De Giorgi C. (2001).** Nematode chitin synthases: gene structure, expression and function in *Caenorhabditis elegans* and the plant parasitic nematode *Meloidogyne artiellia*. *Mol Genet Genomics.* 266(1):28-34.
- Villa TG, Notario V, Villanueva JR. (1979).** Occurrence of an endo-1,3-beta-glucanase in culture fluids of the yeast *Candida utilis*. Purification and characterization of the enzyme activity. *Biochem J.* 177(1):107-114.
- Wachtler V, Rajagopalan S, Balasubramanian MK. (2003).** Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci.* 116(Pt 5):867-874.
- Wagner GP, Lo J, Laine R, Almeder M. (1993).** Chitin in the epidermal cuticle of a vertebrate (*Paralipophrys trigloides*, *Blenniidae*, *Teleostei*). *Experientia.* 49:317-319.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. (1982).** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-951.
- Wasteneys GO, Yang Z. (2004).** New views on the plant cytoskeleton. *Plant Physiol.* 136(4):3884-3891.
- Weiss IM, Schönitzer V, Eichner N, Sumper M. (2006).** The chitin synthase involved in marine bivalve mollusk shell formation contains a myosin domain. *FEBS Lett.*;580(7):1846-1852.
- Werner S, Steiner U, Becher R, Kortekamp A, Zyprian E, Deising HB. (2002).** Chitin synthesis during in planta growth and asexual propagation of the cellulosic oomycete and obligate biotrophic grapevine pathogen *Plasmopara viticola*. *FEMS Microbiol Lett.*208(2):169-173.
- Wightman R, Turner SR. (2008).** The roles of the cytoskeleton during cellulose deposition at the secondary cell wall. *Plant J.* 54(5):794-805.
- Wittmann T, Wilm M, Karsenti E, Vernos I. (2000).** TPX2, A novel *xenopus* MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol.* 149(7):1405-1418
- Wollgiehn R, Bräutigam E, Schumann B, Erge D. (1984).** [Effect of metalaxyl on the synthesis of RNA, DNA and protein in *Phytophthora nicotianae*]. *Z Allg Mikrobiol.* 24(4):269-279.
- Wu JY, Yang JT. (1970).** Physicochemical characterization of citrate synthase and its subunits. *J Biol Chem.* 245(1):212-218.
- Wymer C, Lloyd C. (1996).** Dynamic microtubules: implications for cell wall pattern. *Trends Plant Sci* 1(7):222-228.
- Yabe T, Yamada-Okabe T, Nakajima T, Sudoh M, Arisawa M, Yamada-Okabe H. (1998).** Mutational analysis of chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of additional amino acid residues involved in its catalytic activity. *Eur J Biochem.* 258(3):941-947.



- Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H. (1992).** TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*. 358(6383):245-248.
- Yarden O, Yanofsky C. (1991).** Chitin synthase 1 plays a major role in cell wall biogenesis in *Neurospora crassa*. *Genes Dev*. 5(12B):2420-2430.
- Yeager AR, Finney NS. (2004).** The first direct evaluation of the two-active site mechanism for chitin synthase. *J Org Chem*. 69:613–618.
- Yuan SK, Liu XL, Si NG, Dong J, Gu BG, Jiang H. (2006).** Sensitivity of *Phytophthora infestans* to flumorph: *in vitro* determination of baseline sensitivity and the risk of resistance. *Plant Pathology*. 55, 258–263.
- Yutin N, Wolf MY, Wolf YI, Koonin EV. (2009).** The origins of phagocytosis and eukaryogenesis. *Biol Direct*. 4:9.
- Zajc A, Neufeind T, Prade L, Reinemer P, Huber R, Bieseler B. (1999).** Herbicide detoxification by glutathione S-transferases as implicated from X-ray structures. *Pestic Sci* 55:248-252.
- Zhang Y, Foster JM, Nelson LS, Ma D, Carlow CK. (2005).** The chitin synthase genes *chs-1* and *chs-2* are essential for *C. elegans* development and responsible for chitin deposition in the eggshell and pharynx, respectively. *Dev Biol*. 285(2):330-339.
- Ziman M, Chuang JS, Schekman RW. (1996).** Chs1p und Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell*. 7:1909-1919.
- Zimoch L, Merzendorfer H. (2002).** Immunolocalization of chitin synthase in the tobacco hornworm. *Cell Tissue Res*. 308(2):287-97.
- Zimoch L, Hogenkamp DG, Kramer KJ, Muthukrishnan S, Merzendorfer H. (2005).** Regulation of chitin synthesis in the larval midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol*. 35:515-527.
- Zhu S, Liu P, Liu X, Li J, Yuan S, Si N. (2008).** Assessing the risk of resistance in *Pseudoperonospora cubensis* to the fungicide flumorph *in vitro*. *Pest Manag Sci*. 64(3):255-261.

**Einheiten und Abkürzungen**

A	Ampere
°C	Grad Celsius
c	centi 10 <sup>2</sup>
Da	Dalton
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung 1 <i>g</i> = 9,81m/s <sup>2</sup>
h	Stunde
k	Kilo 10 <sup>3</sup>
l	Liter
m	Meter
μ	Mikro 10 <sup>-6</sup>
m	Milli 10 <sup>-3</sup>
min	Minute
M	Molar m/l
N	Nano 10 <sup>-9</sup>
S	Sekunde
V	Volt
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	basic local alignment search tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
cDNA	komplementäre DNA
CES	Cellulose-Synthase
CFP	Cyano Fluorescent Protein
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propansulfonat
ChiS	Chitin-Synthase
CHS	Chitin Synthase
CIAP	Alkalische Phosphatase
CR-P	pflanzenspezifische konservierte Region
CSR	klassen-spezifische Region
CTL	Chitinase-like
D	Dimension
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	Detergenz-resistente Membranen
DTT	Dithiothreit
EC50	Konzentration mit Effekt von 50%
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMBOSS	European Molecular Biology Open Software Suite
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisierung
et al.	lat. et alii
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GST	Glutathion-S-Transferase
GTF2	Glykosyltransferase Familie 2

GTP	Guanosintriphosphat
HSP	Hitzeschock-Protein
IB	Inclusion Bodies
ID	Identifikator
IEP	Isolelektrischer Punkt
IgG	Immunglobulin
IPG	immobilisierte pH-Gradienten
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
IRD	Infrarot Farbstoff „infrared dye“
KOR	Korrigan
LB	Luria Broth
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
m/z	Masse pro Ladung
Mt	Metallothionin
NAD <sup>+</sup>	oxidierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotid
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert: $\text{pH} = -\lg(\text{c}_{\text{H}_3\text{O}^+})$ (lat. potentiaHydrogenii)
PH	Pleckstrin Homologie
pI	pH-Wert am isoelektrischen Punkt
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>rsw</i>	<i>radial swelling</i>
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SuSy	Sucrose Synthase
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-Puffer Natrium
TBST	Tris-Puffer Natrium Tween Triton
TC	terminale Komplexe
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMH	Transmembranhelix
TRIS	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
TOF	Time of flight
U	Unit
UDP	Uridindiphosphat
v	Volumen
w	Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YFP	Yellow Fluorescent Protein

## 8.1 Multiples Alignment der Cellulose-Synthase-Sequenzen

```

CESA2_ARATH .....
CESA9_ARATH .....
CESA5_ARATH .....
CESA6_ARATH .....
CESA1_ARATH .....
CESAA_ARATH .....
CESA3_ARATH .....
CESA7_ARATH .....
CESA4_ARATH .....
CESA8_ARATH .....
PI_E7_4287_C1_ORF3 .....
PI_E7_4287_C2_ORF3 .....
PI_contig_E7_3169_C2uC3 .....MG LTGAGIIASV VGILGGVSLG CGWSSLSLG
PI_E7_4525_C1 .....
CES_ANABE .....

```

```

CESA2_ARATH .....MNTGG RLIAGSHNRN
CESA9_ARATH .....MNTGG RLIAGSHNRN
CESA5_ARATH .....MNTGG RLIAGSHNRN
CESA6_ARATH .....MNTGG RLIAGSHNRN
CESA1_ARATH .....MEASA GLVAGSYRRN
CESAA_ARATH .....MVAGSYRRY
CESA3_ARATH .....
CESA7_ARATH .....MEASA GLVAGSHNRN
CESA4_ARATH .....
CESA8_ARATH .....
PI_E7_4287_C1_ORF3 .....
PI_E7_4287_C2_ORF3 .....
PI_contig_E7_3169_C2uC3 ARSLFVTTQF LSAFAMGFVV AFSAIIVSLSD TNEWVAVAAG GGAGFVIALI
PI_E7_4525_C1 .....
CES_ANABE .....

```

```

CESA2_ARATH EFVLINADES ARIRSVQELS GQTCQICGDE IELTVSSELF VACNECAFPV
CESA9_ARATH EFVLINADDT ARIRSAEELS GQTCCKICRDE IELTDNGEPF IACNECAFPPT
CESA5_ARATH EFVLINADES ARIRSVQELS GQTCQICGDE IELSVDGESF VACNECAFPV
CESA6_ARATH EFVLINADEN ARIRSVQELS GQTCQICRDE IELTVDGEPF VACNECAFPV
CESA1_ARATH ELVRIRHESD GGTKPLKNMN GQICQICGDD VGLAETGDVF VACNECAFPV
CESAA_ARATH EFVVRNRDSD DGLKPLKDLN GQICQICGDD VGLTKTGNVF VACNECGFPL
CESA3_ARATH .MESEGETA G. .KPMKNIV PQTCQICSDN VGKTVDGDRF VACDICSFPV
CESA7_ARATH ELVVVHNHEE P. .KPLKNLD GQFCEICGDO IGLTVEGDLF VACNECGFPA
CESA4_ARATH .MEPNTMASF DDEHRHSSFS AKICKVCGDE VKDDDNGQTF VACHVCVYPV
CESA8_ARATH .....MMESR SPICNTCGEE IGKSNGEFF VACHECSFPI
PI_E7_4287_C1_ORF3 .....
PI_E7_4287_C2_ORF3 .....
PI_contig_E7_3169_C2uC3 VGFMTFIFGPY ILILITGGLI ACYLLLVDAY DGINVFPADN QLARQEFVIA
PI_E7_4525_C1 .....
CES_ANABE .....

```

```

CESA2_ARATH CRPCYEYERR EGNQACPQCK TRYKRIKQSP RVDGDDEEEE D...IDDLEY
CESA9_ARATH CRPCYEYERR EGNQACPQCG TRYKRIKQSP RVEGD.EEDD D...IDDLLEH
CESA5_ARATH CRPCYEYERR EGNQSCPQCK TRYKRIKQSP RVEGD.EEDD G...IDDLDF
CESA6_ARATH CRPCYEYERR EGNQACPQCK TRFKRLKGSP RVEGD.EEED D...IDDLDN
CESA1_ARATH CRPCYEYERK DGTQCCPQCK TRFRRHGSP RVEGDEDE. .DDVDDIEN
CESAA_ARATH CQSCYEYERK DGSQCCPQCK ARFRRHGSP RVEVDEKE. .DDVNDIEN
CESA3_ARATH CRPCYEYERK DGNQSCPQCK TRYKRLKGSP AIPGDKDE. .DGLADEGTV
CESA7_ARATH CRPCYEYERR EGTQNCPPQCK TRYKRLRGSP RVEGDEDE. .EDIDDIEY
CESA4_ARATH CKPCYEYERS NGNKCCPQCN TLYKRHKQSP KIAGDEENNG PDDSDDELNI
CESA8_ARATH CKACLEYEFK EGRRICLRG NPYDEN. ....VFDDVET
PI_E7_4287_C1_ORF3 .....
PI_E7_4287_C2_ORF3 .....
PI_contig_E7_3169_C2uC3 FMII FELVCC SSSKTSELEN HRFKYIVFSA ITGGWMAADG VSRLIDSGAV
PI_E7_4525_C1 .....
CES_ANABE .....

```

```

CESA2_ARATH EFDHGMPEH AAEAALSSRL NTGR.....G GLDSAPPGSQ IPLLLTYCDED
CESA9_ARATH EFDYGMPEHV TEAALYIMRL NTGRGTDEVS HLYSASPQSE VPLLTYCDED
CESA5_ARATH EFDYSRSGLE SETFSR.... .RNSEF DLASAPPGSQ IPLLLTYGEED
CESA6_ARATH EFEGYNNIG FDQVSEGMSI SRRNSGFPQS DLDSAPPGSQ IPLLLTYGDED
CESA1_ARATH EFNQAQGAN ARHQRHGEEF SSSSRHES.Q PIPLLLTHGHT VSGEIRTPDT
CESAA_ARATH EFDYTOGNK ARLPHRAEEF SSSSRHEESL PVSLLTHGHP VSGEIPTPDR
CESA3_ARATH EFNYPQKEKI SERMLGWHLT RGKGEEMGEP QYDKEVSHNH LPRLTSRQDT
CESA7_ARATH EFNIEHEQDK HKHSAEAMLY GKMSYGRGPE DDE.....

```

CESA4_ARATH	KYRQDGSSIH	QNFAYGSENG	.....	.....	.....
CESA8_ARATH	KTSKTQSIIV	TQTNNTSQDS	.....	.....	.....
PI_E7_4287_C1_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_E7_4287_C2_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_contig_E7_3169_C2u3	LSTVAYTSIQ	DGGKAAMDGI	DASAQTLMFV	IWGAVFVVG	LNQLSMRWGL
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	.....	.....	.....	.....	.....
CESA2_ARATH	ADMYSDRHAL	IVPPSTG...	.....	...YGNRVYP	APFTDSSAPP
CESA9_ARATH	SDMYSDRHAL	IVPPSTG...	.....	...LGNRVHH	VPFTDSFASI
CESA5_ARATH	VEISSDSHAL	IVSPSPG...	.....	...HIHRV	HQPHFPDPAA
CESA6_ARATH	VEISSDRHAL	IVPPSLGG..	.....	...HGNRVHP	VSLSDPTVAA
CESA1_ARATH	QSVRTTSGPL	GPSDRNAI..	.....	...SSPY	IDPRQPVPVR
CESAA_ARATH	NATLSPCIDP	.....	.....	...QLPG	IYQLLLPVR
CESA3_ARATH	SGEFSAA SPE	RLSV.....	.....	...SSTI	AGGKRLPYSS
CESA7_ARATH	.....	.....	.....	...NGRFPPIV	.....
CESA4_ARATH	.....	.....	.....	...DYNKQOQW	.....
CESA8_ARATH	.....	.....	.....	...GIHARHIS	.....
PI_E7_4287_C1_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_E7_4287_C2_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_contig_E7_3169_C2u3	MCYNRVGAHA	QLGPVEEQMP	ELPTGATLPA	QTMTERVRLV	CENC FATVPA
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	.....	.....	.....	.....	.....
CESA2_ARATH	QARS MVPQKD	IAEYGYG SVA	WKDRMEVWK.	RRQGEKLQVI	KHEGGNNGRG
CESA9_ARATH	HTRPMVPQKD	LTVYGYG SVA	WKDRMEVWK.	KQQIEKLQVV	KNERVNDGDG
CESA5_ARATH	HPRPMVPQKD	LAVYGYG SVA	WKDRMEEWK.	RKQNEKYQVV	KHDGDSS...
CESA6_ARATH	HPRPMVPQKD	LAVYGYG SVA	WKDRMEEWK.	RKQNEKLQVV	RHEGDDP...
CESA1_ARATH	IVDPSKD...	LNSYGLGNVD	WKERVEGWKL	KQEKNM LQMT	GKYHEGKG..
CESAA_ARATH	ILDPSKD...	LNSYGLVNV D	WKKRIQGWKL	KQDKNMIHMT	GKYHEGKG..
CESA3_ARATH	DVNQSPNRR I	VDPVGLGNVA	WKERV DGWKM	KQEKNTGPVS	TQAASERGGV
CESA7_ARATH	AGGHSGEFPV	GGGYNGEHEG	LHKRVHPYPS	SEAGSEGGWR	ERMDDWKLQH
CESA4_ARATH	RPNGRAFSS T	GGVGLKDFEA	ERDGYTDAEW	KERV DKKAR	QEKRLVTKG
CESA8_ARATH	TVSTIDSELN	DEYGNPIWKN	RVESWKDKKD	KKSKKKKKDP	KATKAEQHEA
PI_E7_4287_C1_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_E7_4287_C2_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_contig_E7_3169_C2u3	GTAFCTECGE	AMPSE DGNPD	VSISQAQMPS	VSMNKGQVP	DRWQHVPHRT
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	.....	.....	.....	...MAVIGCLV	LPSDVTGLGS
CESA2_ARATH	S.NDDDELDD	PDMPMDEGR	QPLSRKLP I R	SSRINPYRML	IICRLAILGL
CESA9_ARATH	DGFIVDELDD	PGLPMMDEGR	QPLSRKLP I R	SSRINPYRML	IFCRLAILGL
CESA5_ARATH	...LGDGDD	ADIPMMDEGR	QPLSRKVPIK	SSKINPYRML	IVLRLVILGL
CESA6_ARATH	...FEDGDD	ADFPMMDEGR	QPLSRKIPIK	SSKINPYRML	IILRLVILGL
CESA1_ARATH	GEIEGTGSNG	EELQMADDTR	LPMSRVVPI P	SSRLTPYRVV	IILRLIILCF
CESAA_ARATH	GEFEGTGSNG	DELQM VDDAR	LPMSRVVHFP	SARMTPYRIV	IVLRLIILGV
CESA3_ARATH	DIDASTDILA	DEALLNDEAR	QPLSRKVSIP	SSRINPYRMV	IIMRLVILCL
CESA7_ARATH	GNLGPEPDD D	PEMGLIDEAR	QPLSRKVPIA	SSKINPYRMV	IVARLVILAV
CESA4_ARATH	EQTNEDEKED D	EEEYLD AEAR	QPLWRKVPI S	SSKISPYRIV	IVLRLVILVF
CESA8_ARATH	QIPTQOHMED	TPPNTE SGAT	DVLSVVIPI P	RTKITSYRIV	IIMRLIILAL
PI_E7_4287_C1_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_E7_4287_C2_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_contig_E7_3169_C2u3	YMSTTSFVDP	KHAKEGGVSM	KDNRSIRFM	DSGVQGPDKG	MSQYNDSIAG
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	PVSDKNFITS	VKMTSINHDP	TFSGNSRSTL	KKRTLLFRYL	AEINLIFGLW
CESA2_ARATH	FFHYRILHPV	.NDAYGLWLT	SVICEIWFAV	SWILDQFPKW	YPIERETYLD
CESA9_ARATH	FFHYRILHPV	.NDAFGLWLT	SVICEIWFAV	SWILDQFPKW	YPIERETYLD
CESA5_ARATH	FFHYRILHPV	.NDAYALWLI	SVICEIWFAV	SWILDQFPKW	YPIERETYLD
CESA6_ARATH	FFHYRILHPV	.KDAYALWLI	SVICEIWFAV	SWILDQFPKW	YPIERETYLD
CESA1_ARATH	FLQYRTTHPV	.KNAYPLWLT	SVICEIWFAF	SWLLDQFPKW	YPINRETYLD
CESAA_ARATH	FLHYRTTHPV	.KDAYALWLT	SVICEIWFAF	SWLLDQFPKW	YPINRETFLD
CESA3_ARATH	FLHYRITNPV	.PNAFALWL V	SVICEIWFAL	SWILDQFPKW	FPVNRETYLD
CESA7_ARATH	FLRYRLLNPV	.HDALGLWLT	SVICEIWFAL	SWILDQFPKW	FPIERETYLD
CESA4_ARATH	FFRFRILTPA	.KDAYPLWLI	SVICEIWFAL	SWILDQFPKW	FPINRETYLD
CESA8_ARATH	FFNYRITHPV	.DSAYGLWLT	SVICEIWFAV	SWILDQFPKW	SPINRETYID
PI_E7_4287_C1_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_E7_4287_C2_ORF3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_contig_E7_3169_C2u3	VRNYEPSFR	.SFAMSTYSI	ANRAAEVET	PNIRKYKMSG	SGMFHVFFYG
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	YLQWRITNSI	NFDALWLSIP	LLLA EIYSYL	GGVMFVIGLW	RPLVRQIKS.
CESA2_ARATH	RLSLRYEKEG	KPSGLAPVDV	FVSTVDP...	...LKEPLLI	TANTVLSILA

CESA9\_ARATH RLSLRYEKEG KPSELAPVDV FVSTVDP... .LKEPLI TANTVLSILA  
 CESA5\_ARATH RLSLRYEKEG KPSELAGVDV FVSTVDP... .MKEPLI TANTVLSILA  
 CESA6\_ARATH RLSLRYEKEG KPSGLSPVDV FVSTVDP... .LKEPLI TANTVLSILA  
 CESA1\_ARATH RLAIKYDRDG EPSQLVPVDV FVSTVDP... .LKEPLV TANTVLSILS  
 CESAA\_ARATH RLALRYDRDG EPSQLAPVDV FVSTVDP... .MKEPLV TANTVLSILA  
 CESA3\_ARATH RLALRYDREG EPSQLAAVDI FVSTVDP... .LKEPLV TANTVLSILA  
 CESA7\_ARATH RLSLRYEREG EPNMLAPVDV FVSTVDP... .LKEPLI TSNTVLSILA  
 CESA4\_ARATH RLSMRFERDG EKNKLAPVDV FVSTVDP... .LKEPLI TANTVLSILA  
 CESA8\_ARATH RLSARFEREG EQSQLAAVDF FVSTVDP... .LKEPLI TANTVLSILA  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 ..... WYLEV  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 .....MSGW FTTPDWYLTTL  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2u3 TAATGIFWLY YLTTMYPQQY FCDHARPTLP CSGLPTSETT GCYSSTVNFDF  
 PI\_E7\_4525\_C1 .....  
 CES\_ANABE ..LDQLTPSL PQTDWPIVDV FITCYNE... .PPEM VEQTAQAALA

CESA2\_ARATH VDYPVDKVC YVSDDGAAML TFEALSDTAE FARKWVPFCK KFNIEPRAPE  
 CESA9\_ARATH VDYPVEKVC YVSDDGAAML TFEALSYTAE FARKWVPFCK KFSIEPRAPE  
 CESA5\_ARATH VDYPVDRVAC YVSDDGAAML TFEALSETAE FARKWVPFCK KYTIEPRAPE  
 CESA6\_ARATH VDYPVDKVC YVSDDGAAML TFEALSETAE FARKWVPFCK KYCIEPRAPE  
 CESA1\_ARATH VDYPVDKVC YVSDDGSAML TFEALSETAE FARKWVPFCK KFNIEPRAPE  
 CESAA\_ARATH VDYPVDKVC YVSDDGSAML TFEALSETAE FSKWVPFCK KFNIEPRAPE  
 CESA3\_ARATH VDYPVDKVC YVSDDGAAML SFESLAETSE FARKWVPFCK KYCIEPRAPE  
 CESA7\_ARATH MDYPVEKISC YVSDDGSAML TFEALSETAE FARKWVPFCK KFSIEPRAPE  
 CESA4\_ARATH VDYPVNVKVC YVSDDGSAML LFDLSETSE FARKWVPFCK KYNVEPRAPE  
 CESA8\_ARATH LDYPVDKVC YVSDDGAAML SFESLVETAD FARKWVPFCK KYSIEPRAPE  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 ADVDNVICFR DPIPQWASY FAMLFAEVLTL FALGVLYLGL MWKPVRRGAH  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 AGVDDVVCFH DPPIAQWVAF FALIAAELVS IVLGLYLYLG MWKPVRRGAH  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2u3 ADSGDGYCIK DVPFMSWLMY AMMIFSEFLN YFLGLLFNFS MWRPIRRGAR  
 PI\_E7\_4525\_C1 .....  
 CES\_ANABE IDYPPTKLYV YVLDDG.NSP AMRAMTEKLC IADLQSPLLQ QEANRIDAER

CESA2\_ARATH WYFSQKMDYL KNKVHPAFVR ERRAMKRDEY EFVKINALV ATAQKVPEEG  
 CESA9\_ARATH WYFSQKMDYL KHKVDPAFVM ERRAMKRDEY EFVKINALV SVSQKVPEDG  
 CESA5\_ARATH WYFCHKMDYL KNKVHPAFVR ERRAMKRDEY EFVKINALV ATAQKVPEEG  
 CESA6\_ARATH WYFCHKMDYL KNKVHPAFVR ERRAMKRDEY EFVKINALV ATAQKVPEEG  
 CESA1\_ARATH FYFAQKIDYL KDKIQPSFVK ERRAMKREYE EFKVRINALV AKAQKIPEDG  
 CESAA\_ARATH FYFSQKIDYL KDKIQPSFVK ERRAMKREYE EFKVRINILV AKAQKIPEDG  
 CESA3\_ARATH WYFAAKIDYL KDKVQTSFVK DRRAMKREYE EFKIRINALV SKALKCPEEG  
 CESA7\_ARATH MYFTLKVVDYL QDKVHPTFVK ERRAMKREYE EFKVRINAQV AKASKVPLEG  
 CESA4\_ARATH FYFSEKIDYL KDKVQTSFVK DRRAMKREYE EFKVRINALV AKAQKIPEDG  
 CESA8\_ARATH FYFSLKIDYL RDKIQPSFVK ERRAMKRDEY EFKIRMNALV AKAQKIPEDG  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 YFDEFEPVP DDLWPKVDVL LCHYSEPAEE TIDTLMACMN LQYPPHLLQI  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 YFDEFDPKVP DDLWPKIDVL LCHYSEPAEE TIDTLMACMN LQYPPHLLQI  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2u3 YMNDFKPPIP KEQWPTVDIF LCHYMPEVTD SMQTLKKNCLA MQYPPHLLHI  
 PI\_E7\_4525\_C1 .....  
 CES\_ANABE SHLVERLQKL ESFTSNIQVA EEWLSKSSV PNQDKTTDEV LAQSLQQFIR

CESA2\_ARATH WTMQDGTWPW GNNVRDHPGM IQVFLGHSV RDTDGNELPR LVVVSREKRP  
 CESA9\_ARATH WTMQDGTWPW GNNVRDHPGM IQVFLGHSV CDMDGNELPR LVVVSREKRP  
 CESA5\_ARATH WTMQDGTWPW GNNVRDHPGM IQVFLGNGV RDVENNELPR LVVVSREKRP  
 CESA6\_ARATH WTMQDGTWPW GNSVRDHPGM IQVFLGSDGV RDVENNELPR LVVVSREKRP  
 CESA1\_ARATH WTMQDGTWPW GNNTRDHPGM IQVFLGHSV LDTDGNELPR LIYVSREKRP  
 CESAA\_ARATH WTMEDGTSWP GNNTRDHPGM IQVFLGHSV LDTDGNELPR LIYVSREKRP  
 CESA3\_ARATH WVMQDGTWPW GNNTRDHPGM IQVFLGQNGV LDAEGNELPR LVVVSREKRP  
 CESA7\_ARATH WIMQDGTWPW GNNTKDHPGM IQVFLGHSV FIVEGHELPR LVVVSREKRP  
 CESA4\_ARATH WVMQDGTWPW GNNTRDHPGM IQVFLGKEGA FDIDGNELPR LVVVSREKRP  
 CESA8\_ARATH WTMQDGTWPW GNNTRDHPGM IQVFLGYSGA RDIENNELPR LVVVSREKRP  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 WVCDDGYCKT KWTKGNPVPT VELNKGILET AGDLRQEVAV FMYDRVCDPN  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 YVLDDGYCGS KWTKGNPVPA IELNKVVLEK SGLDRQEVAV FMYDRVCDPN  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2u3 FILDGTYKS VWDANN.HFK VTVNTKVIEV AGDLRGLDL LMHERVVGVP  
 PI\_E7\_4525\_C1 .....  
 CES\_ANABE WLSPK...H HSIAERLKTE RQVLGAIRQ KELELVELTR FRYIARPKPA

CESA2\_ARATH GFDHKKAGA MNSLIRVSAV LSNAPYLLNV DCDHYINNSK AIREAMCFMM  
 CESA9\_ARATH GFDHKKAGA MNSLIRVSAV LSNAPYLLNV DCDHYINNSK AIREAMCFMM  
 CESA5\_ARATH GFDHKKAGA MNSLIRVSGV LSNAPYLLNV DCDHYINNSK ALREAMCFMM  
 CESA6\_ARATH GFDHKKAGA MNSLIRVSGV LSNAPYLLNV DCDHYINNSK ALREAMCFMM  
 CESA1\_ARATH GFQHHKKAGA MNALIRVSAV LTNGAYLLNV DCDHYFNNSK AIKEAMCFMM  
 CESAA\_ARATH GFQHHKKAGA MNALIRVSAV LTNGAYLLNV DCDHYFNNSK AIKEAMCFMM  
 CESA3\_ARATH GFQHHKKAGA MNALIRVSAV LTNGPFILNL DCDHYINNSK ALREAMCFMM  
 CESA7\_ARATH GFQHHKKAGA MNALIRVAGV LTNAPFMLNL DCDHYVNSK AVREAMCFMM  
 CESA4\_ARATH GYAHKKAGA MNAMVRVSAV LTNAPFMLNL DCDHYINNSK AIREAMCFMM  
 CESA8\_ARATH GYQHHKKAGA ENALIRVSAV LTNAPFILNL DCDHYVNSK AVREAMCFMM  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 ED.MEYAWR KLHSSANLPS PSRVKVVNRA DCAVGSFRDD YRYP..GLPH

PI_E7_4287_C2_ORF3	ED.MEVYAWR	KLHSSANLPS	PSRPKVVNRA	DCAVGSFRDD	YRYP..GLPH
PI_contig_E7_3169_C2uC3	QDDQSLKSWR	RQHSSVRELK	KEGGKGVQRR	DCAVGSLSDD	YDYRDRGIPR
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	GVPHHAKAGN	LNYAIFSG..	ETSGEFILTL	DADHIPKPQF	LKRVLPLYFYT
CESA2_ARATH	DPQSG.....	KKVCYVQFPQ	RFDGIDRHDR	YSNRNVVFFD	INMKGLDGIQ
CESA9_ARATH	DPQSG.....	KKICYVQFPQ	RFDGIDRHDR	YSNRNVVFFD	INMKGLDGIQ
CESA5_ARATH	DPQSG.....	KKICYVQFPQ	RFDGIDKSDR	YSNRNVVFFD	INMKGLDGLQ
CESA6_ARATH	DPQSG.....	KKICYVQFPQ	RFDGIDRHDR	YSNRNVVFFD	INMKGLDGLQ
CESA1_ARATH	DPAIG.....	KKCCYVQFPQ	RFDGIDLHDR	YANRNIVFFD	INMKGLDGIQ
CESAA_ARATH	DPAIG.....	KKCCYVQFPQ	RFDGIDLHDR	YANRNTVFFD	INLKGLDGIQ
CESA3_ARATH	DPNLG.....	KQVCYVQFPQ	RFDGIDKNDR	YANRNTVFFD	INLRGLDGIQ
CESA7_ARATH	DPQIG.....	KKVCYVQFPQ	RFDGIDTNDR	YANRNTVFFD	INMKGLDGIQ
CESA4_ARATH	DPQLG.....	KKLCYVQFPQ	RFDGIDLNDR	YANRNIVFFD	INMRGLDGIQ
CESA8_ARATH	DPVVG.....	QDVCVQFPQ	RFDGIDKSDR	YANRNIVFFD	VNMRGLDGIQ
PI_E7_4287_C1_ORF3	VTFIG.....	RVKPETHYSK	AGN...INN	LYNEGANGRY	LIILDTPMQP
PI_E7_4287_C2_ORF3	VTVVG.....	RVKPETHYSK	AGN...INN	LYNEGANGRY	MLLLDSDMQP
PI_contig_E7_3169_C2uC3	VTFIG.....	RMKPETHHSK	AGN...INNA	LFNEGADGKY	LLILDNDMKP
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	YNLFNGKYEQ	NRIAFVQTPQ	DFYNIPSPD	FGHRASLYFG	PLQQGKDGMM
CESA2_ARATH	GPIYVGTGCV	FRRQALYGF	APKKKKPPGK	.....	.....
CESA9_ARATH	GPIYVGTGCV	FRRQALYGF	APKKKQPPGR	.....	.....
CESA5_ARATH	GPIYVGTGCV	FRRQALYGF	APKKKTKRM	.....	.....
CESA6_ARATH	GPIYVGTGCV	FRRQALYGF	APKKKKGPRK	.....	.....
CESA1_ARATH	GPVYVGTGCC	FNRQALYGD	PVLTEEDLEP	.....	.....
CESAA_ARATH	GPVYVGTGCC	FNRQALYGD	PVLTEEDLEP	.....	.....
CESA3_ARATH	GPVYVGTGCV	FNRALYGYE	PIKVKHKKP	.....	.....
CESA7_ARATH	GPVYVGTGCV	FRRQALYGYE	PPKPKRPM	.....	.....
CESA4_ARATH	GPVYVGTGCV	FNRPALYGYE	PPVSEKRKKM	TCDCWPSWIC	CCCGGGRN.
CESA8_ARATH	GPVYVGTGTV	FRRQALYGS	PPSKPR....	.....	.....
PI_E7_4287_C1_ORF3	HPKFILATLP	FFFDEDRQD	KAKYICCGIG	CNAVAKLCCA	SCQIAGVPEE
PI_E7_4287_C2_ORF3	HPKFVLATLP	FFFDEDRQY	KNKYSCSMG	CQNAVAKMCCA	SCKIAGVPEE
PI_contig_E7_3169_C2uC3	HPKFLLAVLP	FFFSE.....	.....	.....	.....
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	AAFYTGTNAI	LRREALIN..	.....	.....	.....
CESA2_ARATH	.....	.....	.....TCNCW	PKWCCLCCGL	RKKSKTAKD
CESA9_ARATH	.....	.....	.....TCNCW	PKWCCLCCGM	RKKTGKVKD
CESA5_ARATH	.....	.....	.....TCNCW	PKWCLFCCGL	RKNR..KSKT
CESA6_ARATH	.....	.....	.....TCNCW	PKWCLLFCGS	RKNRKARTVA
CESA1_ARATH	.....	.....	.....NII	VKSCCGSRKK	GKSSKKYNYE
CESAA_ARATH	.....	.....	.....NII	VKSCFCGRKK	GKSRKIPNYE
CESA3_ARATH	.....	.....	.....SLL	SKLCCGSRKK	.NSKAKKESD
CESA7_ARATH	.....	.....	.....ISC	GCCPCFGRRR	.KNKKFSKND
CESA4_ARATH	.....	.....	.....HKSDSSKKKS	GIKSLFSKLK	KKTKKSDDK
CESA8_ARATH	.....	.....	.....ILP	QSSSSSCCL	TKKKQPDPS
PI_E7_4287_C1_ORF3	QISYCSKDCF	ENAMHVQSAV	HRRQVNGTMS	DTRASKIDMR	CMNCDAKLPK
PI_E7_4287_C2_ORF3	RISYCSKECF	ENAMHVQSDL	HRRQVNGTMS	DVRATKKELR	CMNCDSKLGK
PI_contig_E7_3169_C2uC3	.....	.....	.....	.....	.....
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	.....	.....	.....	.....	.....
CESA2_ARATH	K.KTN.TKET	SKQIHALENV	DEGVIVPVS	VEKRSEATQL	KLEKKFGQSP
CESA9_ARATH	N.QRKKPKET	SKQIHALEHI	EEGLQVTN..	AENNSETAQL	KLEKKFGQSP
CESA5_ARATH	TDKKKKNREA	SKQIHALENI	EEG.TKGTND	AAKSPEAAQL	KLEKKFGQSP
CESA6_ARATH	ADKKKKKNREA	SKQIHALENI	EEGRVTKGSN	VEQSTEAMQM	KLEKKFGQSP
CESA1_ARATH	KRRGINRSDS	NAPLNFNEDI	DEGFEG..YD	DERSILMSQR	SVEKRFQSP
CESAA_ARATH	DNRSIKRSDS	NVPLNFNEDI	DEDVEG..YE	DEMSSLVSQK	RLEKRFQSP
CESA3_ARATH	KKKSGRHTDS	TVPVFNLDI	EEGVEGAGFD	DEKALLMSQM	SLEKRFQSA
CESA7_ARATH	MNG.....	.....	.....DVAALGGAE	GDKHELMSEM	NFEKTFGQSS
CESA4_ARATH	TMSSYSRKR	STEAIFFLED	IEEGLEGYDE	LEKSSLSMQK	NFEKRFQSP
CESA8_ARATH	EIYKDAKREE	LDAIFNLGD	LDN...YDE	YDRSMLISQT	SFEKTFGLST
PI_E7_4287_C1_ORF3	NGVCRKCGNH	GADG.EDVSS	LHNSDDVRD	NAVAFVQTPQ	YFRDCIQLQI
PI_E7_4287_C2_ORF3	SGVCRKCNTN	NNNGDADMSI	LHTYSDDVRD	NAVGFVQTPQ	YFRDCVQLQI
PI_contig_E7_3169_C2uC3	.....	...GEAVDGG	GRQYSDDISW	NQVSYVQTPQ	YFEDTPQLTI
PI_E7_4525_C1	.....	.....	.....	.....	.....
CES_ANABE	.....	.....	.....	.....	.....
CESA2_ARATH	VFVASAVLQN	GGVPRNASPA	CLLREAIQVI	SCGYEDKTEW	GKEIGWIYGS
CESA9_ARATH	VLVASTLLLN	GGVPSNVNPA	SLLRESIQVI	SCGYEEKTEW	GKEIGWIYGS
CESA5_ARATH	VFVASAGMEN	GGLARNASPA	SLLREAIQVI	SCGYEDKTEW	GKEIGWIYGS
CESA6_ARATH	VFVASARMEN	GGMARNASPA	CLLKEAIQVI	SCGYEDKTEW	GKEIGWIYGS

CESA1\_ARATH VFIAATFMEQ GGIPPTTNP TLLKEAIHVI SCGYEDKTEW GKEIGWIYGS  
 CESA9\_ARATH VFIAATFMEQ GGLPSTTNPL TLLKEAIHVI SCGYEAKTDW GKEIGWIYGS  
 CESA3\_ARATH VFVASTLMEN GGVPVSATPE NLLKEAIHVI SCGYEDKSDW GMEIGWIYGS  
 CESA7\_ARATH IFVTSTLMEE GGVPSSSPA VLLKEAIHVI SCGYEDKTEW GTELGWYIYGS  
 CESA4\_ARATH VFIASTLMEN GGLPEATNTS SLIKEAIHVI SCGYEEKTEW GKEIGWIYGS  
 CESA8\_ARATH VFIESTLMEN GGVPDSVNPS TLIKEAIHVI SCGYEEKTEW GKEIGWIYGS  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 G.DPMGHRNA TFYDAIQTGQ DGYDCASFAG TNAMFRREAL DSIGGIQYGS  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 G.DPLGHRNS TFYDAIQTGQ DGYDCASFAG TNALIRREAL DSIGGIQYGT  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2uC3 MGDPCGHKNT IFFDAVQCGR DGFDSAFAFAG TNAVFRQQAF DSIGGICYGT  
 PI\_E7\_4525\_C1 .....  
 CES\_ANABE ..... VGLQYFADDF TKDEKRLDEF QLVGGLSSNS

CESA2\_ARATH VTEDILTGFK MHCHGWRSVY CM..... PKRAAFKGS PNLSDRLHQ  
 CESA9\_ARATH VTEDILTGFK MHCHGWRSVY CM..... PKRAAFKGS PNLSDRLHQ  
 CESA5\_ARATH VTEDILTGFK MSHGWRSVY CT..... PKIPAFKGS PNLSDRLHQ  
 CESA6\_ARATH VTEDILTGFK MSHGWRSVY CT..... PKLAAFKGS PNLSDRLHQ  
 CESA1\_ARATH VTEDILTGFK MHARGWISY CN..... PPRPAFKGS PNLSDRLNQ  
 CESA8\_ARATH VTEDILTGFK MHARGWISY CV..... PSRPAFKGS PNLSDRLNQ  
 CESA3\_ARATH VTEDILTGFK MHARGWRSY CM..... PKLPAFKGS PNLSDRLNQ  
 CESA7\_ARATH ITEDILTGFK MHCRGWRSY CM..... PKRPAFKGS PNLSDRLNQ  
 CESA4\_ARATH VTEDILTGRF MHCRCWKS VY CM..... PKRPAFKGS PNLSDRLHQ  
 CESA8\_ARATH ITEDILTGRF MHCRCWRSY CM..... PLRPAFKGS PNLSDRLHQ  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 LTEDCYTGQV LCSMGWKAQY FRKDFEGEPS ERIRLAELI PDSVAGSLAQ  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 LTEDCYTGER LVSMGWKALY FRKDFEGEAE ERIRLAELI PDSVAGAMAQ  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2uC3 QTEDAYTGNV LHTSGWDSVY FRKDFEGDAK DRIRLCEGAV PDTVAAMAAQ  
 PI\_E7\_4525\_C1 .....A DRIRLAEGAV PESVAALAQ  
 CES\_ANABE ITEDMNTAMR LHGAGWKS VY HH..... ..ELLAELI PDDLSSTLKQ

CESA2\_ARATH VLRWALGSVE IFLSRHCPIW YGYGG.....GLK WLERFSYINS  
 CESA9\_ARATH VLRWALGSVE IFLSRHCPIW YGYGG.....GLK WLERFSYINS  
 CESA5\_ARATH VLRWALGSVE IFLSRHCPIW YGYGG.....GLK WLERFSYINS  
 CESA6\_ARATH VLRWALGSVE IFLSRHCPIW YGYGG.....GLK WLERFSYINS  
 CESA1\_ARATH VLRWALGSIE ILLSRHCPIW YGYHG.....RLR LLERIAINT  
 CESA8\_ARATH VLRWALGSIE ILLSRHCPIW YGYNG.....RLK LLERIAINT  
 CESA3\_ARATH VLRWALGSVE IFLSRHCPIW YGYNG.....RLK FLERFAYVNT  
 CESA7\_ARATH VLRWALGSVE IFFSRHSPW YGYKGG.....KLK WLERFAYANT  
 CESA4\_ARATH VLRWALGSVE IFFSRHCPLW YAWGG.....KLK ILERLAYINT  
 CESA8\_ARATH VLRWALGSVE IFLSRHCPLW YGCSGG.....RLK LLQRLAYINT  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 RKRWAKGNFQ IALMNKKTQY FDPWKMPEA QIPSYHKNK FMRRVYFNS  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 RKRWAKGNFQ IALMKNKNV ADPEWKRPHV DIPKYRPNP FMRRVYFNS  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2uC3 KKRWAKGAVQ ILLMK.NESE VDPDWRPPRV PAPDPKPSLT FPRKMFFYDS  
 PI\_E7\_4525\_C1 RKRWAKGNFQ IFLRN.KKSL VDEWATPQV ELPPKRKINK FMRWVFMNL  
 CES\_ANABE RLRWAQGTIQ VLVKENPLRK S.....GLT FWQRLQYFKT

CESA2\_ARATH VVYPWTSPLP IVYCSLPAVC LLTGKFIVPE ISNYAGILFM LMFISIAVTV  
 CESA9\_ARATH VVYPWTSPLP LVYCSLPAIC LLTGKFIVPE ISNYAGILFL LMFMSIAVTV  
 CESA5\_ARATH VVYPWTSIPL LVYCSLPAIC LLTGKFIVPE ISNYASILFM ALFGSIAVTV  
 CESA6\_ARATH VVYPWTSPLP IVYCSLPAIC LLTGKFIVPE ISNYASILFM ALFSSIAVTV  
 CESA1\_ARATH IVYPIITSIP IAYCILPAFC LITDRFIPE ISNYASIWFI LLFISIAVTV  
 CESA8\_ARATH IVYPIITSIP LAYCMLPAFC LITNTFIPE ISNLASLCFM LLFASIVASA  
 CESA3\_ARATH TIYPITSIP LMYCTLPAVC LFTNQFIPO ISNIASIWFL SLFLSIFATG  
 CESA7\_ARATH TIYPITSIP LAYCILPAIC LLTDKFIMPP ISTFASLFI SLFMSIIVTV  
 CESA4\_ARATH IVYPIITSIP LAYCTIPAVC LLTGKFIPT INNFAWIFL ALFLSIIATA  
 CESA8\_ARATH IVYPIITSIP VAYCTLPAIC LLTGKFIPT LSNLASMFL GLFISIIILTS  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 TLYPLGSIPA ILFYITLYF LFSGYAPIYM AGARLVYALV PKLLIQGVLS  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 TLYPIDSIPV ILLYITLYF LYTG.....  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2uC3 VLYPFGSIPA LCYVSIIVY LCTGDPIYA RGTKFLYSFL PVTFCRWVNL  
 PI\_E7\_4525\_C1 TVYPIGSFPA IFFYITGYF LYTGQAPIYT SGLRLLMALV PKIVAQSILS  
 CES\_ANABE MYSYFSGFAT LIFISCIPIY FFTEIVPVKT YGTDFILHFL PTFIINRLTF

CESA2\_ARATH ILEMQWGGVG IDDWWRNEQF WVIGGASSHL FALFQGLLKV LAGVNTNFTV  
 CESA9\_ARATH ILEMQWGGVG IDDWWRNEQF WVIGGVSSHL FALFQGLLKV LAGVSTNFTV  
 CESA5\_ARATH ILEMQWGGVG IDDWWRNEQF WVIGGVSAHL FALFQGLLKV LAGVNTNFTV  
 CESA6\_ARATH ILEMQWGGVG IDDWWRNEQF WVIGGVSAHL FALFQGLLKV LAGVNTNFTV  
 CESA1\_ARATH ILELRWSGVS IEDDWWRNEQF WVIGGSAHL FAVFQGLLKV LAGIDTNTFTV  
 CESA8\_ARATH ILELRWSGVS IEDDWWRNEQF WVIGGSAHL FAVFQGLLKV LAGIDTNTFTV  
 CESA3\_ARATH ILEMWWSGVS IEDDWWRNEQF WVIGGVSAHL FAVFQGLLKV LAGIDTNTFTV  
 CESA7\_ARATH ILELRWSGVS IEEWWRNEQF WVIGGSAHL FAVVQGLLKI LAGIDTNTFTV  
 CESA4\_ARATH ILELRWSGVS INDLWRNEQF WVIGGVSAHL FAVFQGLLKV LFGVDTNFTV  
 CESA8\_ARATH VLELRWSGVS IEDLWRNEQF WVIGGVSAHL FAVFQGLLKV LAGLDTNFTV  
 PI\_E7\_4287\_C1\_ORF3 ALSNRT..VD NSDVIRSQEV WFA.YAFTNC TAVLEAFWWW ITGKEPKWFN  
 PI\_E7\_4287\_C2\_ORF3 .....  
 PI\_contig\_E7\_3169\_C2uC3 LLANRA..VD NNDVWRAQQT WFS.FSFITM MAIVEAIQAR VTGKDKSWAN  
 PI\_E7\_4525\_C1 ALSNRT..VD NDDVLRSQQT WFS.YAFVHV MAVFETIYWK ITGKEAAWAN



```

CES_ANABE          VVAIWG..IP ASEIWRSEQ. ....YAIALF PIFIQAVWSV FTGQKMNFOV

CESA2_ARATH       TSK..AADDG AFSELYIFKW TLLIPPTTL LIINIIGVIV GVSDAISNGY
CESA9_ARATH       TSK..AADDG EFSELYIFKW TLLIPPTTL LIINIVGVIV GVSDAINNGY
CESA5_ARATH       TSK..AADDG EFSELYIFKW TLLIPPTTL LIINIVGVIV GISDAISNGY
CESA6_ARATH       TSK..AADDG EFSLYLFWK TLLIPMTL  LIINIVGVIV GVSDAISNGY
CESA1_ARATH       TSK.ATDEDG DFAELYIFKW TALLIPPTV LLVNLIGIVA GVSYAVNSGY
CESAA_ARATH       TSK.ASDEDG DFAELYVFWK TLLIPPTI  LLVNLVGIVA GVSYAINSGY
CESA3_ARATH       TSK.ASDEDG DFAELYLFWK TLLIPPTTL LIVNLVGIVA GVSYAINSGY
CESA7_ARATH       TSK.ATDDD. DFGELYAFKW TLLIPPTV  LIINIVGVVA GISDAINNGY
CESA4_ARATH       TSKGASDEAD EFGDLYLFWK TLLIPPTTL IILNMVGIVA GVSDAINNGY
CESA8_ARATH       TSK..TADDL EFGELYIVKW TLLIPPTSL LIINLVGVVA GFSDALNKGY
PI_E7_4287_C1_ORF3
PI_E7_4287_C2_ORF3
PI_contig_E7_3169_C2uC3
PI_E7_4525_C1
CES_ANABE          TGGASRGSTA ELPNVIIFFG TVVGLWSV  RFLA.....
.....
TGAGQKTSWT EIPNVLFFFT LLFSQVALV RFFEYENATN PWN....YVS
TGALGGNSIM ELPNLLVFLA MVFGMMWDTV RYFAGYNNAA TTHGTPLYFA
TPK.....ER QSGIYLSMIW PQLLIFFLTI IGIFWS....

CESA2_ARATH       DSWGPLFGRL FFWLWVIVHL YPFLKGLGK QDKMPTIIVV WSILLASILT
CESA9_ARATH       DSWGPLFGRL FFWLWVIVHL YPFLKGLLKG QDRVPTIILV WSILLASILT
CESA5_ARATH       DSWGPLFGRL FFAFWVILHL YPFLKGLLKG QDRMPTIILV WSILLASILT
CESA6_ARATH       DSWGPLFGRL FFWLVIIHL  YPFLKGLLKG QDRMPTIIVV WSILLASILT
CESA1_ARATH       QSWGPLFGKL FFWLVVIAHL YPFLKGLLGR QNRTPTIVIV WSVLLASIFS
CESAA_ARATH       QSWGPLMGKL LFAFWVVAHL YPFLKGLLGR QNRTPTIVIV WSALLASIFS
CESA3_ARATH       QSWGPLFGKL FFAFWVIVHL YPFLKGLMGR QNRTPTIVVV WSVLLASIFS
CESA7_ARATH       QSWGPLFGKL FFSFWVIVHL YPFLKGLMGR QNRTPTIVVI WSVLLASIFS
CESA4_ARATH       GSWGPLFGKL FFAFWVIVHL YPFLKGLMGR QNRTPTIVVL WSILLASIFS
CESA8_ARATH       EAWGPLFGKV FFAFWVILHL YPFLKGLMGR QNRTPTIVIL WSILLASVFS
PI_E7_4287_C1_ORF3
PI_E7_4287_C2_ORF3
PI_contig_E7_3169_C2uC3
PI_E7_4525_C1
CES_ANABE          .....
.....
AMFFGFFVMS QFYPMVKMSI TEYCGWDHTA ATFTANVFGS LLVVYIVVFV
SLFLGGFLAS QLGPMVRMSL QTYFGWSHKS LTDQGNIVGS FSLAFVLIIIL
.....LYS FAIGRLNHPW VNLNSSWAV YNLLLLSGII

CESA2_ARATH       LLWVRVNPV  AKGGPVLEIC  GLNCGN.
CESA9_ARATH       LLWVRVNPV  SKDGPVLEIC  GLDCLK.
CESA5_ARATH       LLWVRVNPV  AKGGPILEIC  GLDCL..
CESA6_ARATH       LLWVRVNPV  AKGGPILEIC  GLDCL..
CESA1_ARATH       LLWVRINPV  DANPNANNFN  GKGGVF.
CESAA_ARATH       LLWVRINPV  STTGVMNSNF  MGE....
CESA3_ARATH       LLWVRIDPFT SRVTGPDILE  CGINC..
CESA7_ARATH       LLWVRIDPFV LKTRKPDTSK CGINC..
CESA4_ARATH       LVWVRIDPFL PKQTGPLLKQ  CGVDC..
CESA8_ARATH       LVWVRINPV  SKTDTTSLSL  NCLLIDC
PI_E7_4287_C1_ORF3
PI_E7_4287_C2_ORF3
PI_contig_E7_3169_C2uC3
PI_E7_4525_C1
CES_ANABE          .....
.....
QLWQVYYEGN LQVAQGTDAG GSAAAT.
CIWVYVETPN HSIFG.....
RASVWQMPKY  DSKKV.....

```

## 8.2 Multiples Alignment der Chitin-Synthase-Sequenzen

Lucilia	MSNIRHRPLAPPGTGSDSDNFTDDESTPLTQDIYGGSQRTIQETKGWDVFRDPPPIKIETG	60
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	-----MAASGGRRRDEASDNSDDELTPLANDTYGGSQRTVQETKGWDVFRFPKQDSI	54
Aedes	-----MKNNGNNLQYFTESDDDEETLMIK-----KVQODTKLWDSFRDPPVQQTSG	48
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	STANQECLELTVKILKIFAYIFTFIIVLLGGVVAKGCVLFMTSQIRKDKRIEYCNKDLGR	120
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	SMETQKWLEFTVRMLKVMAYLVVFFVVVLGSGVLAKGTMLFMTSLKKDRRLEYCNKNLGR	114
Aedes	SAASQDYLVSFVFKLKVFTYIFVFLVTLAAACLSKMSFLMNTSNVKEGVKNRYCDVRQ-P	107
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	DKTFVVKLPEEERIAWIWALIIAFSIPEVGLIRSARICFFKTFKVPKTHFLFMFIMES	180
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	DKQFIVSLPDEERVAMWAVLAAFAIPELGTLIRSIRICFFKSKRPSFVQFMVVFIAES	174
Aedes	DKQFEAIIPTEQRIGWMAIIISFTIPEVGTLIRAARICFFKNIPRPTFQQLAVVALMEG	167
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	LNTFGTALLMFVVLQDLAIQGAMLTNCLCVIPGILGLMSRSTSKEGKRFKMLIDLVAVA	240
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	LHTIGMGLLFFKILPELDVIKGAMVTNCLCIIPAILGLLSRNSRDSKRFRVIVDMAAIV	234
Aedes	FHVTGLAMLAFILIPNMDAVKAVMLTNCVCLVPAAILGLLSRSSAESKLPFKYTVVDVLAI	227
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	AQVTGFVIWPLENRKELWVIPVACLMSVSCGWENYVTSQSSFALIRSMGRVKDDLKYTR	300
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	AQVTGFFVWPLENKPVLWLIIPVSALCISLGGWENYVTRQSPIGIKSLARLKDGLNFSR	294
Aedes	AQVTGFVVWPLLSNSFELWFIPAAVFLVSCWENYLSLSKSYFRPFATLATIREKLTETR	287
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	YFSHMFLSIWKISLFLCSVLLIYWIQGEPEGNIFGLFSDAFGPHKISVDELATTLTNSLP	360
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	YYTYRFMSIWKIFVMMCNLFFIWLEGDEPSMFFQLFNAGFGQHNIVVEEVQIQLGGTVI	354
Aedes	YSTYLFVSPFKVLLFMAAG--VYLSGQAVPDDFFAMFNSNGWGNHTIVVREMEAILN-EKF	343
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	DTLD--AADIDSIDIEASYNTVVVYVLLIQIFGAYLCYIFGKFAKILIQGFSYAFPVSLT	418
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	PDLANITLTGDSIEVAAAYNSAVYVMLIQIFAAYICYIFGKFAKILIQGFSYAFPINLV	414
Aedes	PDLSSITSDLEVL EIFPVKNAVLWITVTHVLCYVCIYFISKFSCKIHIQSFMAFPINLT	403
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	VPVAVSLLIAACGIRIDDPFFFHDTIPDYLFFTSPSNFRSNDVFTNQMAWAWILWLLSQT	478
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	IPLVVNFLIAACGIRNGDTCFFHGTIPDYLFFESPPVFTLSDFISRQMAWIWLLWLLSQT	474
Aedes	VPVVTLLLVFCGLREADVCVFNGILPDYLFRRMPPIYYLFDYVVVNEFSWLWLLWLLSQT	463
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	WIGLHIWTPK CERLATTEKLFVKPMYCSLLIDQSMAMNRRRDDQADVKTEDLSEIEKEKG	538
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	WITHIWTPKAERLASTEKLYVLPYNGLLIDQSMALNRKRDQKDVKTEDLAEIEKEKG	534

Aedes	WITRHLWMPKSDRNASTEKLFVTPMYSLLVDQSVAMNRRREDQEDFVKK--IDMVKVKD	521
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	DEYYETISVHTDGSAIQSKPTIKSSDHITRIYSCATMWHVTKDEMIIEFLKSIMRDEDEC	598
Drosophila	-----	
helicoverpa	-----	
Manduca	DEYYETISVHTDN-TGSSPKAVKSSDSITRIYACATMWHETKDEMMIEFLKSILRLDEDQC	593
Aedes	TEKANEIDAKANE---RKNDTIKPYDRIPQIFICATMWHETKEELMEFLKSILRLDEDQC	578
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	ARRVAQKYLRV---VDPDYEFETHIFFDDAFEISD---HSDDDIQVNRVFKLLVATMD	651
Drosophila	-----HE---LDPDYEFETHIFFDDAFEISD---HSDDDIQVNRVFKLLIATMD	44
helicoverpa	-----DPDYEFETHIFFDDAFEISD---HSDDDSQVNRVFKLLVDTID	41
Manduca	ARRVAQKYLRV---VDPDYEFETHIYLDDAFEISD---HSDDDSQVNRVFKLLVDTID	646
Aedes	ARRMAMKHIQATKEDIDPDYDLETHIFFDDAFVNDKSKCESANDSPLNSYVKTLLINLE	638
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	DAASEIHQTRIRIRPPKKYPTPYGGRLVWTLPGKTKFFAHLKDKDRIRHRKRWSQVMYMY	711
Drosophila	EAASEIHQTTIRLRPPKKYPTPYGGRLVWTLPGKTKFITHLKDKDRIRHRKRWSQVMYMY	104
helicoverpa	EAASEVHQTNIRIRPPKRLPAPYGGRLVWTLPGKTKMICHLKDKAKIRHRKRWSQVMYMY	101
Manduca	EAAENVHQTNIRIRPPKKYPAPYGGRLVWTLPGKTKMICHLKDKAKIRHRKRWSQVMYMY	706
Aedes	EAALEVYKTKMRIYPPTKIIVTPYGGRLIWLTPGRTKMIAHLKDKNKIRHRKRWSQVMYMY	698
Contig_1_pinfestans	-----FALKESKSSKLDSSHQWYFNAFAE	23
Contig_2_pinfestans	-----TSKGFETLNCARLDCWIEGRVKEKHPR-----	28
	:: . :	
Lucilia	YLLGHRLMELPIVDRKDTIAENTYLLTLDGDIIDFKPNAVTLLVLDLMMKKNLGAACGRI	771
Drosophila	YLLGHRLMELPISVDRKDAIAENTYLLTLDGDIIDFKPNAVTLLVLDLMMKKNLGAACGRI	164
helicoverpa	YLLGHRLMELPISVDRKEVMAENTYLLTLDGDIIDFKPNAVTLLVLDLMMKKNLGAACGRI	161
Manduca	YLLGHRLMELPIVDRKEVMAENTFLTLDGDIIDFKPNAVTLLVLDLMMKKNLGAACGRI	766
Aedes	YLLGYRIMQLNTTPERKMVIAQNTYLLALDGDIDFKPNAVTLLVLDLMMKKNLGAACGRI	758
Contig_1_pinfestans	QIQ-----PEYTAVMVGTMLTKSALYHLLFAFERNHQIGGACGQL	64
Contig_2_pinfestans	-----PGVHKVGIIP-VSNWDEDVWGPYLDEEARMWYTPVYCP	66
	. : . : . :	
Lucilia	HPVG-----SGPMVWYQLFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSGPGCFSLFRGKALMDNVMK	826
Drosophila	HPVG-----SGPMVWYQLFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSGPGCFSLFRGKALMDNVMK	219
helicoverpa	HPVG-----SGPMVWYQMFYEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSGPGCFSLFRGKALMDNVMK	216
Manduca	HPVG-----SGPMVWYQLFEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSGPGCFSLFRGKALMDNVMK	821
Aedes	HPVG-----TGPVWYQIFYEYAIGHWLQKATEHMIGCVLCSGPGCFSLFRGKALMDNVMK	813
Contig_1_pinfestans	TVEKPFENLNSWVISAQHFEYKISNILDKSLSECFGFISVLPGAFSAYRYEABIRGAPLDA	124
Contig_2_pinfestans	HPID-----FSNMGYRLRCVETGRRRPRLMICITMYNEGPPQLKATLKLANNLA	115
	. : * : . : . :	
Lucilia	KYTTSDEARHYVQYD---QGEDRWLCTLLLQRG---YRVEYSAASDAYTHCPEGFNEF	879
Drosophila	KYTTSDEARHYVQYD---QGEDRWLCTLLLQRG---YRVEYSAASDAYTHCPEGFNEF	272
helicoverpa	KYTLRSDEARHYVQYD---QGEDRW-----	238
Manduca	KYTLRSDEARHYVQYD---QGEDRWLCTLLLQRG---YRVEYSAASDAYTHCPEGFSEF	874
Aedes	KYTTKSDQARHYVQYD---QGEDRWLCTLLLQK---FRVEYSAASDAYTHAPEGFNEF	866
Contig_1_pinfestans	YFQTLNIDLVDLGPFIGNMYLAEDRILSFEVVARCKDKWMTMHYVKDAVARTDVPDHLVGL	184
Contig_2_pinfestans	YLKEQKDHKHTLSRD---FAGDDVQVNVLLCIVA-----	147
	. : . : *	
Lucilia	YNQRRRWVPSTIANIMDLLGDAKRTIKINDNISLIFYQMLMGGTILPGGTIFLMLVG	939
Drosophila	YNQRRRWVPSTIANIMDLLADAKRTIKINDNISLIFYQMLMGGTILPGGTIFLMLVG	332
helicoverpa	-----	
Manduca	YNQRRRWVPSTVANIMDLLVCKHTIKINDNISTPYIAYQMLMGGTILPGGTIFLMLVG	934
Aedes	YNQRRRWVPSTIANIFDLLGDAKRVKTNNSISMPYIVYQSMFMFGTILPGGTIFLMMVG	926
Contig_1_pinfestans	ISQRKRWLNCFAFFATLFSIWNWGRYIYSES-----	214
Contig_2_pinfestans	--DGREQVNDKMLDYMEAT-----	164
Lucilia	AFVAEFRIDNWTSFHYNIIPILGFMFICFTCKANIQLFVAQVLS TAYALIMMAVIVGTAL	999
Drosophila	AFVAEFRIDNWTSFHYNIVPILAFMFICFTCKSNIQLFVAQVLS TAYALIMMAVIVGTAL	392
helicoverpa	-----	
Manduca	AFVAEFRIDNWTSEYNYLPIAIFVFCFTMKSEYQLLVAQILS TAYALIMMAVIVGTAL	994
Aedes	ALVAVFRIDIWTSFLWNGVPLAVFMAICFWMKQYQLMAAFFISASYSLVMMAVIVGIVI	986
Contig_1_pinfestans	-----HSFTRKMAFLFFYLHYLLYTAFTFFLPANLYLALFFIVFQGF-----	256
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	QLGEDGIGSPSAIFLISMVGSFIAACLHPQEFWCISAGLIYLLSIPSMYLLLLIYSIIN	1059

Drosophila	QLGEDGIGSPSAIFLISMVGSFFIAACLHPQEFWCITCGLIYLLSIPSMYLLLLILYSIIN	452
helicoverpa	-----	
Manduca	QLGEDGIGSPSAIFLISLSSFFIAACLHPQEFWCIVPGIYLLSIPSMYLLLLILYSIIN	1054
Aedes	QVMEDGILAPSSVFFMAVALQIVVTGLLHPQEMEALPAGLVYYITIPSMYMLLVIYSVFN	1046
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	LNAVSWGTRVVAKTKKEMEAEKKAEEAAKKAKQKSMGLFLOGGVGNNGDEEGSVEFS	1119
Drosophila	LNVVSWGTRVVAKTKKLEAEKKAEEAKKRVKQKSMLSFLOGIGDNGDEEGSVEFS	512
helicoverpa	-----	
Manduca	LNVVSWGTRVQTKTKKEIEQEKEAEKKAQKSLGFLQG--VNSNEEESIEFS	1112
Aedes	MNDVSWGTR-----NPTEAPKAAPVQVPGKMKHLGLYRS---GDQDEGSINF	1096
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	LAGLSRCIFCTHGKTSDEKQQLTTIAESLDTIKNRIDSIEQTINPHDQHSRHRRRRTS	1179
Drosophila	LAGLFRCIFCTHGKTSDEKQQLTIAESLDTIKHRMDTIESAVDPHGHHASRHRRRRTS	572
helicoverpa	-----	
Manduca	FAGLFKCLLCTHPKGNEEKVQLLHIASTLEKLEKKLEVVEKAVDPHGIARSRKLSLGHGR	1172
Aedes	VSGLFSCFLCTHPKSSAEKEQMVQVASSLAEINSKMKDLELKL---GTVTVMRSSDD	1152
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	SGSKDHLLSSVAEKSGDESEESDSDTS--VERKQERDFLTNPYWIEDPDLRKGEVDFLSS	1238
Drosophila	SGSKDHLLTSSVAEKSGDESDSDTS--AEPKQERDFLTNPYWIEDPVRKGEVDFLSS	631
helicoverpa	-----	
Manduca	STNGDHLNPLAEGPEEENDSDSDTGTSTSTEPRERRDDLINPYWIEDPDLKRGEVDFLSP	1232
Aedes	DDVDEMSCLDMQGGSPNGVSSPIQTVKNSELEPEKQINYLDPWLYDVLNRNGDTETISA	1212
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	AELQFWKDLNDKYLFPIDNDPVEQARIAKDLKELRDSSVFFFMVNALIVSIVFLLQLNK	1298
Drosophila	TEIQFWKDLIDQYLYPIDNDPVEQARIAKDLKELRDSSVFAFFMINALFVLIVFLLQLNK	691
helicoverpa	-----	
Manduca	PEIQFWKDLNDKYLPIDEKDKARISRDLEKELRDSSVFSFFMINALFVLIVFLLQLNK	1292
Aedes	SEEQFWIELIEKSSNP--GSDREAESEMOSQLKNLRLDVLAVFAVMANALFVLIVFLLQLNK	1271
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	DNHVKWPFVVRTNITYDESTQEVHISKDYLQLEPIGLVFVFFFALILVIQFTAMLFHRF	1358
Drosophila	DNHVKWPFVVRTNITYDESTQEVHISKEYLQLEPIGLVFVFFFALILVIQFTAMLFHRF	751
helicoverpa	-----	
Manduca	DNHVKWPFVVRTNITYDEVSREVLISKEYLQLEPIGLVFVFFFALILVIQFTAMLFHRF	1352
Aedes	KDLHIQWVFNKNTISFDESTVEIIVRREFLKIEPIGLVFVFFFGLILVIQFVAMLMHRF	1331
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	GTLSHILASTEIN--FFKKKSEDLSQDALIDKHAVEIVKNLQRLQIGDGDYDNDSGSGPDR	1417
Drosophila	GTISHILASTEIN--FCCKKSEDLTQDQLIDKHAVEIVKNLQRLQIGDGDYDNDSGSGPDR	810
helicoverpa	-----	
Manduca	GTISHILSSTELNWFCTKKSDLLSQDALLDKNAIAIVKDLQKLNGLDDDYDNDSGSGPHN	1412
Aedes	GTISQILASTQLNWCYCKKAKDMSLDAELRENAVEIARRLQRPKPQWDEEDLEDDQ--KA	1389
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	IARRKTIQNLEKARQPRRQIGTLDVAFKKRFMKLTAAEENNPSTPILTRRLTMRAETIRA	1477
Drosophila	IARRKTIQNLEKARQPRRQIGTLDVAFKKRFLKLTAAEENNPATPILTRRLTMRAETIRA	870
helicoverpa	-----	
Manduca	VGRRKTIIHNLEKARQKRNIGTLDVAFKKRFNMNAND--GPGTPVLNRKMTLRRETLKA	1470
Aedes	IGRRDTIHRILYQHKNQDWSNLEANFKRNYKD-----GDLNLGGLRSLSRKTLNV	1441
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	
Lucilia	LEVRKNSVMAERRKSAMQTLGAKNEYGIAAVSTLNNNGGIPNVRSGRVSNAGINIKDVFN	1537
Drosophila	LEVRKNSVMAERRKSAMQTLGAKNEYGITGAPINNNGALPNQRSGRVSNAGISIKDVFN	930
helicoverpa	-----	
Manduca	LETRRNSVMAERRKSQMOTLGANNEYGVGTG--MLNNNLGPRH---RPSNANISVKDVF-	1523
Aedes	LDTRRKS--MAEQRKIRKSLRGQNPYDTAG--DLWYQGSPPDSGLNQRKTSPPGYNGAAR	1498
Contig_1_pinfestans	-----	
Contig_2_pinfestans	-----	

---

```

Lucilia          VNGGPSEQIYGSNNG-AVNQGYEHVN-EDDDGNSLRLTTRNPP-----QVTWGTYSN-- 1588
Drosophila      VNGGGAEQIYGSNNGGTTINQGYEHVIDEDGDGNSLRLTTRNPHPHHQQVSWGQNTNGGG 990
helioverpa     -----
Manduca        -----AEPNGGQINQAYEASLGDDDDTNSMRLQPRNQ-----VSF----- 1559
Aedes          GPPSNQSPNFEGNNRGRVNYAYQIDEELEDYSEEDTMEFERPTLQMEMTERPTPKSKR- 1557
Contig_1_pinfestans -----
Contig_2_pinfestans -----

```

```

Lucilia          ---TGRM--- 1592
Drosophila      GNGTGRL--- 997
helioverpa     -----
Manduca        ---QGRF--- 1563
Aedes          ---KSRVAF 1564
Contig_1_pinfestans -----
Contig_2_pinfestans -----

```

---

### 8.3 Zugangsnummern der verwendeten Cellulose-Synthase-Sequenzen

gil145843794	<i>Phytophthora infestans</i>
gil145843802	<i>Phytophthora sojae</i>
gil145843810	<i>Phytophthora ramorum</i>
gil161377585	<i>Porphyra yezoensis</i>
gil75907790	<i>Anabaena variabilis</i>
gil17231249	<i>Nostoc sp.</i>
gil186681916	<i>Nostoc punctiforme</i>
gil66825803	<i>Dictyostelium discoideum</i>
gil158337976	<i>Acaryochloris marina</i>
gil170078717	<i>Synechococcus sp.</i>
gil167359699	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
gil123444247	<i>Yersinia enterocolitica</i>
gil193068518	<i>Escherichia coli</i>
gil161984835	<i>Shigella boydii</i>
gil72383862	<i>Ralstonia eutropha</i>
gil126462740	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
gil81300960	<i>Synechococcus elongatus</i>
gil15891626	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
gil16766905	<i>Salmonella typhimurium</i>
gil150377323	<i>Sinorhizobium medicae</i>
gil31790488	<i>Citrobacter sp.</i>
gil146313562	<i>Enterobacter sp.</i>
gil156450549	<i>Methylobacterium chloromethanicum</i>
gil167908433	<i>Burkholderia pseudomallei</i>
gil26989354	<i>Pseudomonas putida</i>
gil163729173	<i>Vibrio fischeri</i>
gil75761797	<i>Bacillus thuringiensis</i>
gil54308909	<i>Photobacterium profundum</i>
gil171058757	<i>Leptothrix cholodnii</i>
gil169174471	<i>Arthrobacter chlorophenolicus</i>

---

gil34498133	<i>Chromobacterium violaceum</i>
gil186903687	<i>Cyanothece sp.</i>
gil108797386	<i>Mycobacterium sp.</i>
gil87306703	<i>Blastopirellula marina</i>
gil119717056	<i>Nocardioides sp.</i>
gil78186854	<i>Pelodictyon luteolum</i>
gil126700162	<i>Clostridium difficile</i>
gil163847514	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
gil187479104	<i>Bordetella avium</i>
gil156741104	<i>Roseiflexus castenholzii</i>
gil114145584	<i>Ciona intestinalis</i>
gil40748280	<i>Ciona savignyi</i>
gil22297551	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>
gil159883668	<i>Oikopleura dioica</i>
gil159883666	<i>Oikopleura dioica</i>
gil189208221	<i>Pyrenophora tritici</i>
gil27462651	<i>Arabidopsis thaliana</i>
gil21954719	<i>Mesotaenium caldariorum</i>
gil16081602	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
gil1706956	<i>Gossypium hirsutum</i>
gil47933334	<i>Pinus radiata</i>
gil162955782	<i>Eucalyptus grandis</i>
gil37781495	<i>Populus tremuloides</i>
gil66269692	<i>Bambusa oldhamii</i>
gil162460685	<i>Zea mays</i>
gil172044097	<i>Oryza sativa</i>
gil168010390	<i>Physcomitrella patens</i>
gil49615363	<i>Acacia mangium</i>
gil114793219	<i>Physcomitrella patens</i>
gil223474272	<i>Aciduliprofundum boonei</i> T469
gil70606831	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM 639

---

---

#### 8.4 Zugangsnummern der verwendeten Chitin-Synthase-Sequenzen

gil169870317	<i>Aphanomyces euteiches</i>
gil1345811	<i>Saprolegnia monoica</i>
gil58264402	<i>Cryptococcus neoformans</i>
gil231787	<i>Rhizopus microsporus</i>
gil3121861	<i>Phycomyces blakesleeanus</i>
gil70982151	<i>Aspergillus fumigatus</i>
gil190409171	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
gil122065154	<i>Ustilago maydis</i>
gil1705828	<i>Emericella nidulans</i>
gil189194179	<i>Pyrenophora tritici</i>
gil164429219	<i>Neurospora crassa</i>
gil156049117	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
gil154272093	<i>Ajellomyces capsulatus</i>
gil154299814	<i>Botryotinia fuckeliana</i>
gil5921754	<i>Mucor racemosus</i>
gil50429185	<i>Fusarium oxysporum</i>
gil19068024	<i>Glomerella graminicola</i>
gil6176510	<i>Blumeria graminis</i>
gil149235319	<i>Lodderomyces elongisporus</i>
gil1168945	<i>Candida albicans</i>
gil145613215	<i>Magnaporthe grisea</i>
gil156720201	<i>Pleurotus ostreatus</i>
gil154270648	<i>Ajellomyces capsulatus</i>
gil119191101	<i>Coccidioides immitis</i>
gil121706256	<i>Aspergillus clavatus</i>
gil6165997	<i>Exophiala dermatitidis</i>
gil119490296	<i>Neosartorya fischeri</i>
gil53801262	<i>Beauveria bassiana</i>
gil50429187	<i>Fusarium oxysporum</i>
gil6166424	<i>Penicillium chrysogenum</i>



---

gil14275780	<i>Tuber borchii</i>
gil19113750	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
gil5921767	<i>Ampelomyces quisqualis</i>
gil11138310	<i>Arthroderma benhamiae</i>
gil14330425	<i>Gibberella zeae</i>
gil16555225	<i>Plasmopara viticola</i>
gil13928447	<i>Aphanomyces cochlioides</i>
gil118400291	<i>Tetrahymena thermophila</i>
gil146175807	<i>Tetrahymena thermophila</i>
gil1118179	<i>Phytophthora capsici</i>
gil1314787	<i>Achlya ambisexualis</i>
gil74100921	<i>Pythium insidiosum</i>
gil167384657	<i>Entamoeba dispar</i>
gil67470111	<i>Entamoeba histolytica</i>
gil86561407	<i>Caenorhabditis elegans</i>
gil146152115	<i>Mytilus galloprovincialis</i>
gil41818394	<i>Spodoptera frugiperda</i>
gil83033256	<i>Ostrinia furnacalis</i>
gil94734225	<i>Danio rerio</i>
gil170062736	<i>Culex pipiens</i>
gil157131336	<i>Aedes aegypti</i>
gil60459510	<i>Manduca sexta</i>
gil20178263	<i>Meloidogyne artiellia</i>
gil9963823	<i>Lucilia cuprina</i>
gil9963869	<i>Drosophila melanogaster</i>
gil50120974	<i>Pectobacterium atrosepticum</i>
gil222149621	<i>Agrobacterium vitis</i>

## **Danke...**

Ich danke Herrn Prof. Dr. William Martin herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut. Seine Motivation, Begeisterung und Diskussionsbereitschaft haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Georg Groth danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Klaus Tietjen von Bayer CropScience für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten und für die tolle Kooperation. Seine begeisternde und motivierende Art sowie seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft haben meine Arbeit stets kritisch begleitet und gefördert.

Frau Dr. Sabine Metzger vom BMFZ danke ich für die tolle Einarbeitung in die Mikrosequenzierung und für ihre stete Hilfsbereitschaft am ESI.

Für die Hilfe und die Geduld bei der Beantwortung von bioinformatischen Fragen danke ich den Bioinformatikern des Institutes, im Besonderen Dipl.-Biol. Christian Eßer und ebenfalls Dr. Corinna Schorn und Dr. Catherine Sirven von Bayer CropScience.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Dr. Sara Tucci und Dr. Silke Rosnowsky.

Ich danke allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für die schöne gemeinsame Zeit und die gute Zusammenarbeit, aber ganz besonders Dipl.-Biol. Christian Eßer, Dr. Sara Tucci und Dipl.- Biol. Verena Zimorski für ihre Freundschaft. Dr. Silke Rosnowsky und Ovidiu Popa danke ich außerdem für die angenehme Atmosphäre im Büro.

Ein herzliches Dankeschön an Doris Matthe und Marianne Limpert, die bei Fragen und Problemen mit Verwaltung und Verträgen immer hilfsbereit zur Seite standen.

Meiner Schwester Nina Delvos danke ich für die Verbesserung meines Englischs.

Mein letzter Dank gilt meinen Eltern und Christian Pinzger dafür, dass sie immer an mich geglaubt und mich bedingungslos unterstützt haben.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde weder in der vorgelegten noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, 12. Mai 2009

(Britta Delvos)