

Etablierung eines neuartigen Protein- Expressionssystems in *Ustilago maydis*

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Janpeter Stock

aus Hilden

Düsseldorf, November 2013

aus dem Institut für Mikrobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Michael Feldbrügge
Korreferent: Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Janpeter Stock

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 2010 bis September 2013 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität in dem Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Stock, J., Sarkari, P., Kreibich, S., Brefort, T., Feldbrügge, M., und Schipper, K. (2012). Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of biotechnology* 161, 80-91.

Buerth, C., Kovacic, F., Stock, J., Terfrüchte, M., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Feldbrügge, M., Schipper, K., Ernst, J.F., und Tielker, D. (2014). Uml2 is a novel CalB-type lipase of *Ustilago maydis* with phospholipase A activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 4963-4973

Für meinen verstorbenen Vater

Zusammenfassung	IV
Summary	V
Abkürzungen und Fachbegriffe	VI
1. Einleitung	1
1.1 Expressionssysteme zur Produktion von heterologen Proteinen	1
1.1.1 Prokaryotische Expressionssysteme	1
1.1.2 Eukaryotische Expressionssysteme	2
1.2 Proteinsekretion in Eukaryonten	7
1.2.1 Konventionelle Sekretionsmechanismen	7
1.2.2 Unkonventionelle Sekretionsmechanismen	8
1.3 Der Brandpilz <i>Ustilago maydis</i>	11
1.3.1 Der eukaryotische Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>	11
1.3.2 <i>U. maydis</i> in der biotechnologischen Anwendung	14
1.3.3 Rrm4 abhängige Sekretion der Endochitinase Cts1	17
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2. Ergebnisse	23
2.1 Charakterisierung der Cts1 Sekretion in <i>U. maydis</i>	23
2.1.1 Etablierung eines β -Glucuronidase-Reportersystems zum Nachweis der unkonventionellen Sekretion von Cts1	23
2.1.1.1 Herstellung von β -Glucuronidase-Reporterstämmen	24
2.1.1.2 Analyse der Gus-Aktivitäten der Reporterstämmen	27
2.1.2 Identifizierung von Signalen für die unkonventionelle Sekretion von Cts1	32
2.1.2.1 Bioinformatische Analyse von Cts1	32
2.1.2.2 Untersuchung verkürzter Cts1-Varianten im Gus-Reportersystem	33
2.2 Entwicklung eines Expressionssystems in <i>U. maydis</i>	38
2.2.1 Aufbau des Expressionssystems	38
2.2.2 Funktionelle Analyse des Expressionssystems	40
2.2.3 Quantifizierung von sekretiertem Gus-Cts1-Fusionsprotein	41
2.3 Cts1-vermittelter Export von Lipasen	43

2.3.1 Reduktion der lipolytischen Hintergrundaktivität	44
2.3.1.1 Bioinformatische Analyse möglicher sekretierter <i>U. maydis</i> Lipasen	45
2.3.1.2 Charakterisierung eines <i>uml2</i> Deletionsstammes	45
2.3.2 Etablierung eines Polysorbat-Assays zur Analyse lipolytischer Aktivität	49
2.3.2.1 Analyse der lipolytischen Aktivität mittels Polysorbat-Assay	49
2.3.2.2 Überprüfung der Polysorbathydrolyse durch heterolog exprimierte Lipasen	51
2.3.2.3 Nachweisgrenze des Tween20-Assays für die Lipasen Uml2 und CalB	52
2.3.3 Expression heterologer Lipasen im <i>uml2</i> -Deletionsstamm	53
2.3.3.1 Expression von heterologen Lipase-Fusionsproteinen	53
2.3.3.2 Analyse von heterolog exprimierten Lipase-Fusionsproteinen im Überstand	55
2.3.4 Untersuchung der <i>N</i> -Glykosylierung von Uml2	57
2.3.4.1 Glykosylierung von Uml2-Fusionsproteinen in <i>U. maydis</i>	57
2.3.4.1 Auswirkung der Glykosylierung von Uml2 auf die lipolytische Aktivität	58
3. Diskussion	60
3.1 Der Sekretionsmechanismus von Cts1	60
3.2 Die Funktion der Endochitinase Cts1	64
3.3 Das Potential von <i>U. maydis</i> als Expressionsplattform	67
3.4 Heterologe Expression von Lipasen	69
3.5 Die CalB-Typ Lipase Uml2	73
3.5 Ausblick	76
4 Material und Methoden	78
4.1 Material und Bezugsquellen	78
4.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits	78
4.1.2 Lösungen und Medien	79
4.1.3 Oligonukleotide	80
4.1.4 Plasmide	82
4.1.4.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide	82
4.1.4.2 Plasmidkonstruktionen dieser Arbeit	83
4.1.5 Stämme	88

4.1.6 Computerprogramme und Bioinformatik	90
4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	90
4.2.1 Arbeiten mit <i>E. coli</i>	90
4.2.2 Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	91
4.2.3 Arbeiten mit <i>P. pastoris</i>	93
4.3 Molekularbiologische Standardmethoden	93
4.3.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	93
4.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren	94
4.3.3 PCR Techniken	95
4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	95
4.3.5 Sequenz- und Strukturanalyse	96
4.4 Biochemische Methoden	97
4.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	97
4.4.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten	97
4.4.3 Proteinreinigung	97
4.4.4 Präzipitation von Proteinen	98
4.4.5 Deglykosylierung von Proteinen	99
4.4.6 Elektrophoretische-Auftrennung und Nachweis von Proteinen	99
4.4.7 Enzymaktivitätstests	102
5. Literaturverzeichnis	105

Zusammenfassung

In der industriellen Biotechnologie werden ständig neue nützliche Proteine identifiziert, die mit etablierten Expressionssystemen teilweise nur ineffizient produziert werden können. Daher besteht ein großes Interesse, neue Expressionsplattformen zu entwickeln. Die Sekretion der Produkte ist dabei von Vorteil, da kein aufwendiger Zellaufschluss notwendig ist. Die bei der konventionellen Sekretion in Eukaryonten stattfindende Glykosylierung kann jedoch für bestimmte Produkte, insbesondere zur medizinischen Anwendung, unerwünschte Auswirkungen haben. In dieser Arbeit wurde daher ein neues Expressionssystem im genetisch gut manipulierbaren Basidiomyceten *Ustilago maydis* etabliert, das die Sekretion von unglykosylierten Proteinen ermöglicht. In diesem pilzlichen Mikroorganismus wird während des filamentösen Wachstums mikrotubuliabhängiger mRNA-Transport von dem mRNA-Bindeprotein Rrm4 vermittelt. Dieser Prozess ist für die effiziente Sekretion der Endochitinase Cts1 essentiell. In diesem neuen Expressionssystem wird die Sekretionsmaschinerie von Cts1 genutzt, um Zielproteine zu exportieren. Als 'Proof of Principle' wurde die bakterielle β -Glukuronidase (Gus) eingesetzt. Heterolog exprimiertes Enzym wird im Verlauf der eukaryotischen konventionellen Sekretion aufgrund einer N-Glykosylierung inaktiviert. Im Gegensatz dazu wurde N-terminal an Cts1 fusioniertes Gus im aktiven Zustand in den Überstand exportiert und bestätigte damit die unkonventionell ablaufende Sekretion von Cts1. Die Analyse von verkürzten Cts1-Varianten zeigte außerdem, dass der schwach konservierte N-Terminus für die Sekretion von Cts1 abdingbar ist. Mit der Sekretion der Gus-Fusionsproteine wurde außerdem gezeigt, dass der Cts1-Sekretionsmechanismus dazu genutzt werden kann, auch größere heterologe Proteine zu exportieren. Die Produktion von deutlich anspruchsvolleren Proteinen wurde mit der Expression heterologer Lipasen wie CalB getestet, die mit bakteriellen Expressionssystemen schwer zu produzieren sind. Um die Aktivitäten dieser Lipasen bei möglichst geringer lipolytischer Hintergrundaktivität analysieren zu können, wurde ein für eine CalB-Typ Lipase kodierendes Gen (*uml2*) in *U. maydis* deletiert. Zur Untersuchung der lipolytischen Aktivität von CalB-Typ Lipasen in Zellextrakten und Überständen von *U. maydis* wurde zudem ein Polysorbat-Assay etabliert. Es zeigte sich, dass die in dem *uml2*-Deletionsstamm produzierten Lipasen Uml2, CalB und thermostabiles LipT zwar erfolgreich über den Cts1-Sekretionsweg in den Überstand exportiert wurden, jedoch dort inaktiv vorlagen. Im Gegensatz dazu war konventionell sekretiertes Uml2-Fusionsprotein im Überstand stabil und aktiv. Hiermit zeigt sich, dass auch in diesem, wie in vielen anderen Expressionssystemen, für jedes Produkt individuell getestet werden muss, ob dessen Produktion möglich ist. Mit der erfolgreichen Expression von Gus hat sich jedoch bestätigt, dass dieses neuartige Expressionssystem nach weiterer Optimierung großes Potential besitzt, zukünftig auch industriell relevante Proteine produzieren zu können.

Summary

In industrial biotechnology new valuable proteins are frequently identified that can only be produced inefficiently with established expression systems. Hence, there is a great interest in developing novel expression platforms. Secretion of products is advantageous since laborious cell disruption is avoided. However, protein glycosylation during conventional secretion in eukaryotes can lead to undesirable effects in certain products, particularly in medical applications. Therefore, in this thesis a new expression system was established using the genetically amenable basidiomycete *Ustilago maydis*. Notably, the system allows the secretion of unglycosylated proteins. In this fungal microorganism, microtubule-dependent mRNA transport during filamentous growth is mediated by the RNA-binding protein Rrm4. This process is essential for efficient secretion of the endochitinase Cts1. In the novel expression system the secretion apparatus of Cts1 is used to export candidate proteins. As a proof of principle, bacterial β -glucuronidase (Gus) was used. Heterologously expressed enzyme is inactivated by a *N*-glycosylation during conventional secretion in eukaryotes. In contrast, Gus fused *N*-terminally to Cts1 was exported into the supernatant in an active form, confirming the unconventional secretion of Cts1. The analysis of truncated Cts1 variants revealed that the weakly conserved *N*-terminus is dispensable for secretion of Cts1. By investigating the secretion of the Gus fusion proteins it could be shown that the Cts1 secretion mechanism can be exploited to export larger heterologous proteins. The production of more sophisticated proteins was tested by expressing heterologous lipases like CalB. To allow analysing the activity of these lipases at reduced lipolytic background activities, a gene (*uml2*) coding for a CalB-type lipase was deleted in *U. maydis*. To investigate the lipolytic activity of CalB-type lipases in cell extracts and supernatants of *U. maydis*, a polysorbate assay was established. The lipases Uml2, CalB and thermostable LipT produced in the *uml2* deletion strain could successfully be exported by the secretory pathway of Cts1 into culture supernatant, but they were inactive. In contrast, conventionally secreted Uml2 fusion proteins were stable and active in supernatants. This demonstrates that, as observed for many other expression systems, individual testing is necessary to judge the ability of a system to produce a product. However, the successful expression of Gus has shown that following further optimisations in the future this novel expression system has great potential to produce industrially relevant proteins.

Abkürzungen und Fachbegriffe

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	'bovine serum albumin'
bzw.	beziehungsweise
Cbx	Carboxin
C-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäuren
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ECL	'enhanced chemiluminescence'-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung
Gfp	'enhanced green fluorescent protein'
Glk	Glukose
GTH-Tag	Gfp-Tag-Decahistidin-Tag
HA	Human influenza hemagglutinin
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
kb	Kilobasen
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
p.a.	'pro analysis', Klassifikation der Reinheitsstufe
PBS	'phosphate-buffered saline'
PCR	'polymerase chain reaction'
PEG	Polyethylenglycol
PNGaseF	'Peptide-N-Glycosidase F'
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHH-Tag	Strep-TripleHA-Decahistidin-Tag
SP	Signalpeptid
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Expressionssysteme zur Produktion von heterologen Proteinen

Die Isolierung von Proteinen aus natürlichen Ressourcen ist oft sehr kostenintensiv, erzielt nur geringe Ausbeuten oder es besteht die Gefahr der toxischen oder infektiösen Kontamination des Produktes. Erst mit der Entwicklung von molekularen Klonierungstechniken Mitte der 70er Jahre wurde es möglich, Proteine in fremden Wirtsorganismen zu produzieren (Porro *et al.*, 2005). Das wohl bekannteste Beispiel eines heterolog exprimierten Proteins ist das Peptidhormon Insulin, das vor seiner biotechnologischen Herstellung aus den Bauchspeicheldrüsen von Rindern oder Schweinen gewonnen werden musste (Jonson *et al.*, 1983). Heute spielen kommerziell produzierte Proteine allgemein eine wichtige Rolle in der pharmazeutischen Industrie, der Enzymindustrie und der Agrarindustrie. Sie werden unter anderem in den Bereichen von Medizin, Diagnostik, Lebensmittel, Detergenzien, Textilien, Leder, Papier oder Kunststoffe eingesetzt (Demain & Vaishnav, 2009). Der globale Markt von rekombinanten Proteinen wächst rapide an, weshalb es einen ständigen Bedarf an neuen Produktionsplattformen gibt, die gesteigerte Erträge in hoher Qualität und bei geringen Kosten versprechen (van Dijl & Hecker, 2013). Während für die Produktion industriell genutzter Enzyme eher ökonomische Aspekte im Vordergrund stehen, wird für pharmazeutisch genutzte Produkte Sicherheit und Authentizität gefordert (Gellissen, 2000). Allgemein lassen sich die heute genutzten Expressionssysteme in prokaryotischen bakteriellen Systemen wie *Escherichia coli* oder in eukaryotischen Systemen wie Hefen, filamentöse Pilze oder Säugerzellen einteilen.

1.1.1 Prokaryotische Expressionssysteme

Das erste heterolog exprimierte humane Protein, das Peptidhormon Somatostatin wurde in dem gramnegativen Bakterium *E. coli* hergestellt (Itakura *et al.*, 1977). Noch heute werden fast 30% der rekombinanten therapeutischen Proteine mit *E. coli* produziert (Huang *et al.*, 2012a). Allgemein ist es das am häufigsten genutzte Expressionssystem für die Produktion industrieller und pharmazeutischer Proteine, was unter anderem darauf zurückzuführen ist, dass dieser Organismus sehr gut erforscht und in annähernd jedem Labor etabliert ist (Terpe, 2006). Zur Produktion im industriellen Maßstab ist *E. coli* aufgrund des schnellen Wachstums, der geringen Kosten für Medien und der Kultivierbarkeit in großen Fermentern vorteilhaft (Huang *et al.*, 2012a). Als wichtige Argumente gegen die Nutzung von *E. coli* als Expressionssystem, gerade in Bezug auf größere und komplexere Proteine, standen meist das Ausbleiben von posttranslationalen Modifikationen, Disulfidbrücken und der nativen Faltung von Proteinen sowie die Bildung von Einschlusskörperchen ('inclusion bodies') mit unlöslichem und inaktivem Protein, die kostenintensive Denaturierungs- und Zurückfaltungs-/Renaturierungsprozesse verlangen (Choi *et al.*, 2006). Es wurden unterschiedlichste Strate-

gien angewendet, um diese Probleme zumindest für bestimmte Proteine zu umgehen. Beispiele hierfür sind der Transfer eines *N*-Glykosylierungsweges aus *Campylobacter jejuni* auf *E. coli*, die Entwicklung von thioredoxindexizienten Wirtsstämmen, um die Bildung von Disulfidbrücken zu unterstützen, die Koexpression von Chaperonen, die Fusion von Zielproteinen mit stark löslichen Polypeptiden oder die Kultivierung bei geringeren Temperaturen (Wacker *et al.*, 2002; Derman *et al.*, 1993; Bessette *et al.*, 1999; Wall & Pluckthun, 1995; Murby *et al.*, 1996). Auch wenn *E. coli* natürlicherweise nur geringe Proteinmengen sekretiert und heterologe Proteine meist cytoplasmatisch exprimiert werden, können Proteine mit entsprechenden Signalpeptiden auch über die bakteriellen Sekretionssysteme ins Periplasma oder den extrazellulären Raum sekretiert werden (Sandkvist & Bagdasarian, 1996; Terpe, 2006; Mergulhao *et al.*, 2005; Ni & Chen, 2009). Eine periplasmatische Akkumulation der Proteine kann dabei für bestimmte Proteine von Vorteil sein, da hier Enzyme der Dsb-Proteinfamilie die Disulfidbrückenbildung unterstützen können (Shokri *et al.*, 2003). Auf alternative bakterielle Expressionssysteme wie die der Gattungen *Bacillus*, *Streptomyces* oder *Pseudomonas* wird häufig aufgrund ihrer besseren Sekretionssysteme gesetzt (van Dijk & Hecker, 2013; Anne *et al.*, 2012; Chen, 2012). Grampositive Bakterien haben in Bezug auf pharmazeutische Produkte generell den Vorteil gegenüber *E. coli*, dass sie nicht die in der äußeren Membran befindlichen Lipopolysaccharide besitzen, die als Endotoxine pyrogen auf Menschen und andere Säugetiere wirken können (Terpe, 2006).

1.1.2 Eukaryotische Expressionssysteme

Hefen werden für die Produktion rekombinanter Proteine gerne genutzt, wenn diese auf Grund von ausbleibender nativer Faltung oder posttranslationaler Modifikationen nicht in aktiver Form mit bakteriellen Systemen wie *E. coli* produziert werden können. Hefen sind genetisch gut manipulierbar, wachsen auf kostengünstigen Medien zu hohen Zelldichten und sind gut fermentierbar (Gellissen *et al.*, 2005). Ihre Anwendung ist daher deutlich einfacher und kostengünstiger als die von Insekten- oder Säugerzellen (Demain & Vaishnav, 2009). Die rekombinanten Produkte können von den Hefezellen in den Überstand sekretiert werden und sind frei von Endotoxinen und onkogener oder viraler DNA (Damasceno *et al.*, 2012). Die Tatsache, dass *Saccharomyces cerevisiae* bei Molekularbiologen weithin bekannt und in genetischer, biochemischer, physiologischer und fermentationstechnischer Hinsicht gut erforscht war, machten diese Hefe bereits Anfang der 80er Jahre zu einem ersten eukaryotischen Expressionssystem (Porro *et al.*, 2005; Hitzeman *et al.*, 1981). Auch wenn viele pharmazeutisch genutzte Proteine in *S. cerevisiae* produziert wurden (Schmidt, 2004), führt die *N*-verknüpfte Hyperglykosylierung bei humanen Proteinen häufig zu reduzierter Aktivität oder zu ungewollten Immunreaktionen (Demain & Vaishnav, 2009). Weitere Nachteile sind häufig eine geringe Produktivität, die Akkumulation von Proteinen im periplasmatischen Raum und die damit verbundene partielle Degradierung, die Instabilität der Produktionsstämme sowie

die Produktion von Ethanol unter aeroben Bedingungen, weshalb *S. cerevisiae* zu den wenigen 'Crabtree positiv yeasts' gezählt wird (Gellissen *et al.*, 1992; Porro *et al.*, 2005). Andere, unkonventionelle Hefen wie *Kluyveromyces lactis* oder *Yarrowina lipolytica* sind genetisch ebenfalls sehr gut erforscht und werden insbesondere deshalb als Alternative zu *S. cerevisiae* angewendet, weil sie ein breiteres Spektrum an Kohlenstoffquellen nutzen können. *Zygosaccharomyces* Stämme haben gegenüber *S. cerevisiae* den Vorteil, dass sie deutlich stressresistenter sind (Porro *et al.*, 2005). Einige wenige Hefearten, wie *Hansenula polymorpha* und *Pichia pastoris*, sind in der Lage Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zu nutzen. Für die Verstoffwechslung von Methanol benötigte Enzyme können dabei bis zu 30% der intrazellulären Proteinmenge ausmachen. Die Promotoren der Alkoholoxidasen *MOX* (*H. polymorpha*) und *AOX1* (*P. pastoris*) sind entsprechend stark und werden in den Expressionssystemen zur Regulation der heterologen Genexpression eingesetzt (Hollenberg & Gellissen, 1997). Im Vergleich zu *S. cerevisiae* wachsen diese Hefen auch bei unausgereiften Fermentationsprozessen zu extrem hohen optischen Dichten (Porro *et al.*, 2005). In seltenen Fällen wurde zwar von hyperglykosylierten Proteinen berichtet (Scorer *et al.*, 1993; Müller *et al.*, 1998), dennoch sind die N-verknüpften Oligosaccharide bei *P. pastoris* und *H. polymorpha* generell deutlich kürzer als in *S. cerevisiae* (Gellissen, 2005). Darauf aufbauend wurden Stämme beider Hefen gentechnisch modifiziert, mit dem Ziel, die Glykosylierung der heterolog produzierten Proteine an das humane Glykosierungsmuster anzupassen (Kim *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Hamilton *et al.*, 2003; Vervecken *et al.*, 2004). Auch wenn *P. pastoris* und *H. polymorpha* genetisch noch lange nicht so gut charakterisiert sind wie *S. cerevisiae*, erlangt man immer mehr Informationen über die Genome, Transkriptome oder Sekretome verschiedener Stämme dieser beiden Hefen (Ramezani-Rad *et al.*, 2003; De Schutter *et al.*, 2009; Mattanovich *et al.*, 2009; van Zutphen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2012). Gerade die Hochzelldichtefermentation dieser Hefen in methanolhaltigen Medien hat jedoch auch deutliche Nachteile. So birgt das entflammable Substrat gerade in großen Fermentern Gefahren, es entsteht große Wärme und es wird viel Sauerstoff verbraucht. Außerdem kann es zu signifikanter Zellyse kommen, durch die der Überstand mit intrazellulären Proteasen kontaminiert wird (Mattanovich *et al.*, 2009).

Filamentöse Pilze wurden für die Produktion von Proteinen interessant, da sie die natürliche Fähigkeit haben, große Mengen an eigenen Proteinen ins Medium abzugeben (Nevalainen *et al.*, 2005). Hierzu gehört ein großes Spektrum lytischer Enzyme wie Amylasen, Proteasen, (Hemi-) Cellulasen, Pektinasen, Katalasen, Lipasen, Phosphatasen und Glukoseoxidasen. Außerdem werden sie für die Produktion von fermentierten Nahrungsmitteln, primären Metaboliten wie organischen Säuren oder Vitaminen und sekundären Metaboliten wie Antibiotika, Alkaloide oder Gibbereline eingesetzt (van den Hombergh *et al.*, 1997). Die Steigerung der Proteinausbeute wurde häufig durch traditionelle Stammverbesserung über Mutagenese er-

reicht, womit sowohl in *Aspergillus* als auch in *Trichoderma* Stämmen Proteinmengen von mehr als 30 g/L erzielt wurden (Punt *et al.*, 2002; Gouka *et al.*, 1997). Von den noch relativ wenigen filamentösen Pilzgattungen die heute zur Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden, spielt die Gattung *Aspergillus* eine dominante Rolle, was darauf zurückzuführen ist, dass sie auch unter den Stämmen für traditionellen Produktionsprozesse stark vertreten war. Somit gehörten auch die ersten Expressionsplattformen der *Aspergillus* Gattung an (Gellissen, 2005; Ballance *et al.*, 1983; Kelly & Hynes, 1985). Während dafür anfangs der gut erforschte Stamm *Aspergillus nidulans* Verwendung fand, wurden später eher Stämme wie *A. niger*, *A. awamori* und *A. oryzae* genutzt, da sie größere Mengen an rekombinanten Proteinen generierten. Häufig wird für die Sekretion der heterologen Proteine eine Genfusionsstrategie angewendet, bei der ein für das Produkt kodierendes Gen mit einem stark exprimierten endogenen Gen fusioniert wird, welches für ein in großen Mengen sekretiertes Protein wie der α -Amylase aus *A. niger* oder *A. awamori* kodiert (Gouka *et al.*, 1997). Ein anderer Wirt, der zu den meist genutzten filamentösen Pilzen zur Produktion heterologer Proteine gehört, ist *Trichoderma reesei* (Nevalainen *et al.*, 2005). Die von diesem Pilz natürlicherweise produzierten Cellulasen sind wichtige industrielle Produkte, die insbesondere bezüglich der Produktion von Biokraftstoffen aus Celluloseabfällen sehr interessant sind. Heutige generierte, industrielle Produktionsstämme erreichen Proteinsekretionskapazitäten von 100 g/L, die aus bis zu 60% bzw. 20% der beiden wichtigen Cellulasen (CBHI und CBHII) bestehen (Schuster & Schmoll, 2010). Entsprechend wurden die Gene, welche für heterologe Proteine kodierten, häufig mit dem CBHI-Signalpeptid fusioniert und unter der Kontrolle des *chbi*-Promotors exprimiert (Keranen & Penttila, 1995; Schuster & Schmoll, 2010). Manche, gerade eukaryotische Proteine, die in Bakterien oder Hefen aufgrund notwendiger posttranslationaler Modifikationen nicht exprimiert werden konnten, wurden in filamentösen Pilzen richtig gefaltet und in funktioneller Form produziert (van den Hombergh *et al.*, 1997). Fremde Gene können als Tandemwiederholungen stabil ins Genom eingebaut werden, wobei schon bis zu 100 Genkopien integriert wurden. Ein Problem für die Produktion heterologer Proteine mit filamentösen Pilzen ist jedoch, dass in dem Repertoire an lytischen Enzymen auch viele Proteasen vorhanden sind. So besitzt beispielsweise *A. nidulans* etwa 80 Proteasegene (Demain & Vaishnav, 2009). Zur Lösung dieses Problems wurden verschiedenste Ansätze angewandt, wie die klassische Mutagenese, die Herunterregulierung oder Deletion von Proteasen oder die Optimierung der Medien (van den Hombergh *et al.*, 1997). Um auch weniger gut erforschte filamentöse Pilze genetisch manipulieren zu können, wurden in der Vergangenheit unterschiedlichste Transformationsmethoden entwickelt, zu denen auch die Anwendung von *Agrobacterium tumefaciens* gehört (Meyer, 2008, Beijersbergen *et al.*, 2001). Zu den jüngeren erfolgreichen Expressionssystemen gehört *Chrysosporium lucknowense*, der sich durch hohe Transformationsfrequenz, Proteinproduktion bei niedrigem pH, kurze Fer-

mentationszeiten und geringe Proteaseaktivität auszeichnet. Da Stämme gentechnisch zu nicht-filamentös wachsenden Formen verändert wurden, kommt es zu einer geringen Viskosität der Fermentationsbrühe (Demain & Vaishnav, 2009; Nevalainen *et al.*, 2005).

Säugerzellen sind die bevorzugten Produktionssysteme für Glykoproteine, die für die Verabreichung an den Menschen vorgesehen sind (Gellisen, 2005). Das erste mit Säugerzellen hergestellte rekombinante therapeutische Protein war der in CHO- ('chinese hamster ovary') Zellen produzierte und 1987 zur klinischen Nutzung zugelassene gewebespezifische Plasminogenaktivator (t-PA). Obwohl es auch eine Reihe anderer Säugerzelllinien wie Baby-Hamster-Nieren- (BHK), Maus-Myelom- (NS0), humane embryonale Nieren- (HEK)-293 und humanen Netzhaut- (PER.C6) Zellen gibt, werden auch heute fast 70% aller rekombinanten therapeutischen Proteine mit CHO-Zellen produziert (Kim *et al.*, 2012, Jayapal *et al.*, 2007). Da in die Entwicklung einer fertigen Produktionszelllinie viel Geld und Zeit investiert werden müssen, werden Gene, die für gewünschte Produkte kodieren, zunächst meist transient in CHO- oder HEK-Zellen exprimiert, um die generelle Effizienz und Produzierbarkeit des Produktes zu testen (Kim *et al.*, 2012). Stabile Integration von fremder DNA ermöglichen meist auxotrophe Mutanten, wie die Dihydrofolatreduktase (DHFR)-defizienten CHO-Zellen (Urlaub & Chasin, 1980), in die das heterologe Gen und das *dhfr*-Gen über Kotransfektion ins Genom integriert werden (Jayapal *et al.*, 2007). Durch die Zugabe ansteigender Konzentrationen an Methotrexat (MTX), einem Analogon der Folsäure das die DHFR inhibiert, kann die Amplifizierung des DHFR-Locus und damit die Koamplifizierung des Zielgens ermöglicht werden. Hiermit können Zellen generiert werden, die bis zu 100 Kopien des gewünschten Gens im Genom tragen (Kaufman *et al.*, 1985). Bei der zufälligen DNA-Integration kommt es meist zu einer hohen Variabilität der Genexpressionslevel zwischen einzelnen Klonen, was vermutlich häufig auf die Chromatinstruktur und/oder auf vorhandene regulatorische Elemente an der entsprechenden Genomregion zurückzuführen ist. Um daraus resultierende, langwierige Selektionsprozesse zu verkürzen, werden in Vektoren teilweise Cis-Elemente wie S/MARs ('scaffold or matrix attachment elements') oder UCOEs ('ubiquitous chromatin opening elements') eingesetzt, die entsprechende Chromatinstrukturen zugänglicher für die Transkription machen (Zahn-Zabal *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2005; Benton *et al.*, 2002). Eine andere Möglichkeit Produktionsstämme in kürzerer Zeit zu generieren, ist die Anwendung von Cre- oder Flp-Rekombinasesystemen. Dabei werden die entsprechenden Rekombinaseerkennungsequenzen (*loxP* oder *FRT*) durch Transfektion ins Genom integriert und es werden Klone selektiert, bei denen die *loxP/FRT*-Sequenzen in gut zugänglichen Genomregionen liegen. Anschließend kann durch eine weitere Transfektion ein Zielgen über die Rekombinasereaktion in den entsprechenden Locus integriert werden (Kito *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2007).

Die Weiterentwicklung der Medien für Säugerzelllinien ist von größter Bedeutung. Während früher fötales Rinderserum für die Vermehrung von Säugerzellen essentiell war, werden heute meist serumfreie Medien für die Kultivierung von Zellkulturen im großen Maßstab angewendet. Gründe, die gegen die Verwendung Serum in Medien sprechen, sind die undefinierte Zusammensetzung, das höhere Risiko der Übertragung von Erregern wie Viren und Prionen und die höheren Kosten (Wurm, 2004).

Neben den vorgestellten Expressionssystembereichen können Proteine unter anderem noch mit Insektenzellen, transgenen Pflanzen oder transgenen Tieren produziert werden.

Die baculovirusvermittelte Expression heterologer Proteine in Insektenzellen hat den Vorteil, dass in diesem System viele eukaryotische Proteinprozessierungen und posttranslationale Modifikationen stattfinden können. Für die heterologe Genexpression wird der starke virale Promotor des Polyhedrin-Gens ausgenutzt. Dieses verspricht hohe Ausbeuten, da Polyhedrin, das für die Infektion nicht benötigt wird, in der späten Phase der Insektenzellinfektion natürlicherweise bis zu 50% des Gesamtproteins ausmachen kann (Jarvis, 2009).

Transgene Pflanzensysteme, die zur Produktion rekombinanter Proteine genutzt werden, sind sehr vielfältig und reichen von ganzen Pflanzen, welche im landwirtschaftlichen Maßstab angebaut werden, bis hin zu Pflanzenzellsuspensionen, die in einem vollständig definierten Medium in Bioreaktoren wachsen können. Wichtige Vorteile dieser Systeme sind, dass sie kostengünstig sind, auch in großen Mengen produziert werden können, keine humanen Pathogene darstellen und meist keine aufwendige Infrastruktur benötigen (Fischer *et al.*, 2012). Eine stabile Transformation in den Nukleus wird meist durch die Anwendung von *A. tumefaciens* erreicht. Transiente Expression, die unter anderem auch auf Pflanzenviren als Expressionsvektoren basieren kann, wird häufig genutzt, um die Aktivität des Transformationskonstruktes zu testen und geringe Mengen an Protein zu produzieren, ist jedoch für die Produktion im kommerziellen Maßstab meist unzureichend (Desai *et al.*, 2010).

In transgenen Tieren wie Kaninchen, Schweinen, Schafen, Ziegen oder Kühen können rekombinante Proteine unter anderem in deren Milch produziert werden. Auch wenn die Produktion von Proteinen teilweise hohe und kostengünstige Erträge versprechen, ist die Entwicklung der transgenen Tiere sehr aufwendig und teuer (Houdebine, 2009).

Es zeigt sich, dass jedes Expressionssystem seine spezifischen Vor- und Nachteile hat. Keines der existierenden Systeme ist für die Produktion aller möglichen Proteine optimal. Deshalb ist es angebracht für die Produktion möglichst unterschiedliche Organismen oder Zellen in Betracht zu ziehen um die Ausbeute und Qualität der einzelnen Proteine zu steigern (Gellissen, 2005). Die direkte Sekretion der entsprechenden rekombinanten Proteine in den Kulturüberstand hat bei Expressionssystemen häufig den Vorzug, dass viele Proteine dabei in ihrer nativen Faltung unterstützt werden und spätere Aufbereitungsprozesse des Produktes deutlich vereinfacht werden (Moir & Mao, 1990; Schmidt, 2004).

1.2 Proteinsekretion in Eukaryonten

1.2.1 Konventionelle Sekretionsmechanismen

In der Regel besitzen sekretorische Proteine und Membranproteine N-terminale Signalpeptide, die deren Translokation über das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel zur Plasmamembran vermitteln (Nickel & Rabouille, 2009). Der Prozess beginnt damit, dass Ribosomen bei der Translation solcher Proteine mit Hilfe des Signalerkennungspartikel (SRP, 'signal recognition particle') zum ER gelenkt werden (Walter *et al.*, 1981; Walter & Blobel, 1982). Dabei bindet das SRP an die hydrophobe Signalsequenz, sobald sie das Ribosom verlässt, wodurch die Translation unterbrochen wird. Der Ribosom-SRP-Komplex lokalisiert über eine Interaktion mit einem SRP-Rezeptor an der ER-Membran (Meyer & Dobberstein, 1980; Gilmore *et al.*, 1982), das Ribosom bindet an das Translokon und es kommt zum Fortsetzen der Translation in das ER-Lumen (Johnson & van Waes, 1999). Im ER-Lumen finden wichtige Prozesse statt, die eine Faltung in die native Konformation zum Ziel haben. Dabei falten sich einige Proteine bereits während ihrer Translation in die richtige Konformation, andere benötigen Chaperone, Ko-Chaperone und andere Faltungsenzyme wie Oxidoreduktasen für die passende Faltung und die Ausbildung der nativen Disulfidbrücken (Kleizen & Braakman, 2004). Werden Proteine im Zuge unterschiedlicher, teils mehrfach ablaufender ER-Qualitätskontrollen als nicht nativ gefaltet erkannt, kommt es zum Ausschleusen aus dem ER und zum Abbau der Proteine über die ER-assoziierte Degradierung (ERAD) oder Autophagie (Anelli & Sitia, 2008). Neben vielen weiteren posttranslationalen Proteinmodifikationen findet im ER auch die häufigste Modifikation, die *N*-Glykosylierung statt. Hierbei wird noch während der Proteinsynthese eine *N*-glykosidische Bindung zwischen einem Oligosaccharid-Kern, der aus zwei *N*-Acetylglucosaminen, neun Mannose- und drei Glukosereste ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_9\text{Glc}_3$) zusammengesetzt ist, und der Aminogruppe eines Asparagins in der Konsensussequenz N-x-S/T (wobei x für jede Aminosäure außer Prolin steht) geknüpft. Diese Grundstruktur ist von der Hefe bis zum Menschen, und somit auch in *U. maydis*, konserviert und wird erst im weiteren Verlauf des Sekretionsmechanismus, je nach Organismus, unterschiedlich modifiziert (Fernandez-Alvarez *et al.*, 2010). Haben die Proteine ihre native Konformation eingenommen, werden sie über sogenannte COPII ('coat protein complex')-Vesikel aus dem ER ausgeschleust und zum Golgi-Apparat transportiert. COPI-Vesikel sind für den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER verantwortlich und ermöglichen so unter anderem die Rückgewinnung von ER-residenten Komponenten. An der gezielten Vermittlung der Fusion von Vesikeln mit Zielmembranen sind spezifische 'Tethering'-Komplexe und SNAREs ('soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors') beteiligt (Lee *et al.*, 2004). Im Golgi-Apparat werden die Proteine weiter modifiziert, prozessiert, sortiert und zu

ihren endgültigen Bestimmungsorten wie Lysosom, Plasmamembran oder dem extrazellulären Milieu versendet.

1.2.2 Unkonventionelle Sekretionsmechanismen

Der Großteil der extrazellulären Proteine wird über den ER/Golgi-abhängigen Sekretionsweg ausgeschleust. Es wurden jedoch auch sehr heterogene Gruppen von extrazellulären Proteinen entdeckt, die nicht diesen signalpeptidabhängigen konventionellen Sekretionsweg nutzen, sondern über unkonventionelle, das ER umgehende Sekretionsmechanismen transloziert werden (Nickel, 2005). Generell spielen solche unkonventionell sekretierten Proteine häufig eine Rolle in der Regulation der Immunantwort, des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung sowie der Angiogenese (Nickel & Rabouille, 2009). Diesen Proteinen ist häufig gemein, dass ihre Sekretion nicht konstitutiv abläuft, sondern durch zellulären Stress induziert wird, der entweder während der Entwicklung oder durch geänderte Umgebungsbedingungen auftritt (Giuliani *et al.*, 2011). Ein Grund für die unkonventionelle Sekretion von Proteinen könnte darin liegen, bestimmte posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen oder das oxidierende Milieu in ER und Golgi-Apparat zu umgehen, die eine native Faltung dieser Proteine verhindern würden (Nickel & Rabouille, 2009).

Bei den unkonventionell sekretierten Proteinen kann man zwischen vesikelunabhängigen und vesikelabhängigen Transportmechanismen differenzieren (Abb. 1.1). Für nicht vesikuläre Transportprozesse von cytoplasmatischen Proteinen wurden bereits transporterabhängige und -unabhängige, selbstvermittelte Translokationsprozesse entdeckt (Rabouille *et al.*, 2012). Das am besten untersuchte Beispiel für eine selbstvermittelte Translokation stellt der Fibroblasten Wachstumsfaktor 2 (FGF2) dar (Nickel, 2011). Dabei interagiert der bereits vollständig gefaltete FGF2 mit Ansammlungen saurer Membranlipide der Plasmamembran und es kommt, stimuliert durch eine Phosphorylierung eines Tyrosins, zur Oligomerisierung von FGF2, die eine Insertion des Komplexes in die Plasmamembran ermöglicht (Torrado *et al.*, 2009; Temmerman *et al.*, 2008; Ebert *et al.*, 2010; Steringer *et al.*, 2012). In den extrazellulären Raum gelangt FGF2 dann vermutlich durch die Bindung an Membran-proximale Heparansulfat-Proteoglykane (Zehe *et al.*, 2006).

Zu den transporterabhängigen Sekretionsprozessen gehört die Translokation von lipidierten Peptiden und Proteinen in den extrazellulären Raum über ABC- ('ATP-binding-cassette') Transporter (Nickel, 2005). Bekannte Beispiele hierfür stellen die farnesylierten Paarungspheromonpeptide, der α -Faktor von *S. cerevisiae* und der m-Faktor von *Schizosaccharomyces pombe* dar, die unter ATP-Verbrauch über die ABC-Transporter Ste6p bzw. Mam1 transportiert werden (Michaelis, 1993; Christensen *et al.*, 1997). Die Fähigkeit solcher Transporter neben kurzen Peptiden auch Proteine transportieren zu können, konnte bereits durch Fusion mit Gfp gezeigt werden. Dabei zeigte sich weiter, dass für die Sekretion sowohl die Prozessierung des N-terminalen Propeptids als auch die Prozessierung des CaaX-Motivs am

C-Terminus, mit der die Farnesylierung einhergeht, notwendig sind (Kjaerulff *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass auch andere Proteine, wie HASPB ('hydrophobic acetylated surface protein B') aus verschiedenen *Leishmania* Spezies oder eine Proteinkinase 1 (PfCDPK1) aus *Plasmodium falciparum*, acetyliert sekretiert werden, könnte ein Hinweis darauf sein, dass in vielen eukaryotischen Organismen Lipoproteine durch spezifische ABC-Transporter externalisiert werden (Rabouille *et al.*, 2012).

Andererseits wurde für das *Leishmania* HASPB Protein auch gezeigt, dass es eine Rolle beim sogenannte 'Membrane Blebbing' spielt (Tournaviti *et al.*, 2007). Bei diesem Prozess, der bisher insbesondere für Galectin-Proteine beschrieben wurde, werden mit der Plasmamembran assoziierte Proteine durch das Abschnüren von Mikrovesikeln in den extrazellulären Raum abgegeben (Hughes, 1999). HASPB wird während des infektiösen Stadiums des parasitären Lebenszyklus an freien Ribosomen synthetisiert, am N-Terminus sowohl myristyliert als auch palmyliert und damit an der Plasmamembran verankert (Tournaviti *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass eine Mutation der Myristylierungsstelle in einer cytoplasmatischen Lokalisierung resultierte, wohingegen eine Mutation der Palmylierungsstelle zur Lokalisierung am Golgi-Apparat führte (Denny *et al.*, 2000). HASPB könnte also nach einer Verankerung an der äußeren Golgi-Membran über sekretorische Vesikel, über endosomale Strukturen oder einen vesikelunabhängigen Prozess an die Plasmamembran gelangen und hier über Transporter an die Außenseite der Plasmamembran translozieren und über Exovesikel abgegeben werden (Nickel, 2005; Denny *et al.*, 2000; Tournaviti *et al.*, 2007).

Für unkonventionelle vesikuläre Sekretionswege werden verschiedene Mechanismen postuliert, an denen sekretorische Lysosomen, die bereits beschriebenen Mikrovesikel oder aus Endosomen gereifte MVBs ('multivesicular bodies') beteiligt sein könnten (Rabouille *et al.*, 2012). Eine genaue Aufschlüsselung, welcher der membranabhängigen Prozesse jeweils für die Translokation einzelner Proteine verantwortlich gemacht werden kann, ist häufig schwierig. Für das Zytokin Interleukin-1 β (IL-1 β) wird vermutet, dass es über alle drei Mechanismen aus der Zelle transportiert werden kann. In Makrophagen kommt es induziert durch Stress, toxische Substanzen oder Pathogene zur Ausbildung von Inflamosomen. Diese aktivieren die Cysteinprotease Caspase1, die das IL-1 β Vorläuferprotein proteolytisch in seine aktive Form spaltet. Für die Sekretion können cytosolisches IL-1 β und Caspase1 direkt über Mikrovesikel über die Zellmembran gelangen oder in sekretorische Lysosomen translozieren, wobei der genaue Ablauf dieser Translokation jedoch nicht bekannt ist. Die Lysosomen fusionieren schließlich mit der Plasmamembran und aktives IL-1 β wird freigegeben. Außerdem kann der Caspase1-IL-1 β -Komplex auch von internalisierten Vesikeln in Endosomen eingeschlossen werden und schließlich über die Fusion von MVBs mit der Plasmamembran in Exosomen ausgeschleust werden (Nickel & Rabouille, 2009). In der Vergangenheit wurde

meist postuliert, dass IL-1 β bereits aktiv in den extrazellulären Raum abgegeben wird. Die Tatsache, dass inaktives IL-1 β Vorläuferprotein jedoch auch ohne Inflammosomaktivierung in Überständen nachgewiesen wurde (Keller *et al.*, 2008), könnte für eine konstitutive Sekretion von IL-1 β Vorläuferprotein sprechen, welches dann extrazellulär im Zuge der Entzündungsreaktion durch Caspase1 aktiviert wird (Rabouille *et al.*, 2012).

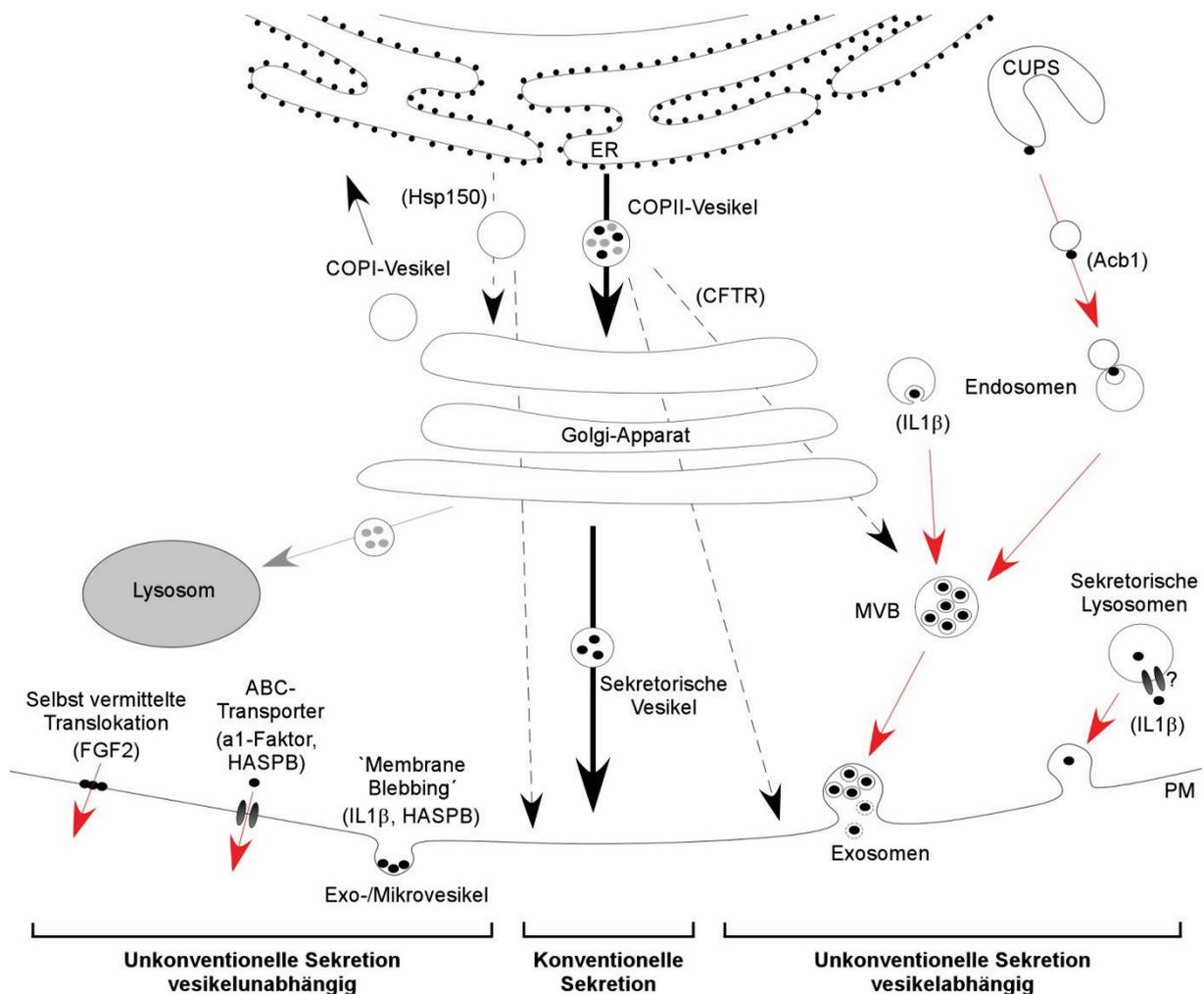


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung postulierter Proteinsekretionswege in Eukaryonten. Der Verlauf unkonventioneller Sekretionswege wird durch rote Pfeile und der konventioneller Sekretionswege durch breite, schwarze Pfeile angezeigt. Sekretionswege die am ER beginnen, jedoch COPII-Vesikel und/oder Golgi-Apparat unabhängig ablaufen sind durch gestrichelte Pfeile gekennzeichnet. Grau eingefärbte Proteine haben das Lysosom, schwarze Proteine die Plasmamembran oder den extrazellulären Raum als Ziel. Links sind unkonventionelle Sekretionswege, wie die selbstvermittelte Translokation, Sekretion über ABC-Transporter oder über 'Membrane Blebbing' gezeigt, die unabhängig von intrazellulären Vesikeln ablaufen können. Mittig ist der konventionelle Sekretionsmechanismus über ER, Golgi-Apparat und sekretorische Vesikel dargestellt. Rechts sind vesikelabhängige unkonventionelle Sekretionsmechanismen über Endosomen/MVBs und über sekretorische Lysosomen gezeigt. Beispielproteine, deren Sekretionsmechanismen im Text näher erläutert werden, sind in Klammern angegeben. Als Quellen für die Erstellung der Abbildung dienen: (Nickel, 2005; Nickel & Rabouille, 2009; Rabouille *et al.*, 2012; Malhotra, 2013).

Ein weiteres interessantes, in *Dictyostelium* Zellen sowie *S. cerevisiae* näher untersuchtes, unkonventionell sekretiertes Protein ist das Acetyl-CoA-Bindeprotein (AcbA/Acb1). In einem Übersichtsartikel von Vivek Malhotra (2013) wurde für Acb1 jüngst ein möglicher Sekretionsprozess postuliert, an dem sogenannte CUPS ('component for unconventional protein secre-

tion'), intermediäre Vesikel und MVBs beteiligt sind. Dabei kommt es zunächst durch Nährstoffmangel zur Ausbildung der CUPS in räumlicher Nähe des ERs. Ebenfalls durch Nährstoffmangel induzierte posttranslationale Modifikationen von Acb1, wie die Bindung von Acetyl-CoA, ermöglichen die Verankerung an der cytoplasmatischen Seite der CUPS-Membran. Die CUPS bilden bisher nicht näher charakterisierte Acb1-enhaltende vesikuläre Intermediate, die schließlich mit spezifischen Endosomen fusionieren, wobei Acb1 durch Internalisierung in luminalen Vesikeln der Endosomen eingeschlossen werden. Schließlich würde Acb1 durch die Fusion von MVBs und Plasmamembran in Exosomen sekretiert werden.

Neben diesen sehr unterschiedlichen unkonventionellen Sekretionsmechanismen für Proteine ohne ER-Signalpeptid gibt es auch Proteine, die zwar ein Signalpeptid besitzen und darüber in das ER translatiert werden, dann jedoch im weiteren Sekretionsverlauf den Golgi-Apparat umgehen und/oder das ER nicht über COPII-Vesikel verlassen. So konnte für das Hitzeschockprotein Hsp150 in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass dessen Sekretion auch ohne funktionelles Sec24 und Sec13 Protein funktioniert. Da Sec24 und Sec13 COPII Hüllproteine sind, die für die Abschnürung von COPII-Vesikeln vom ER benötigt werden, konnte so eine COPII vermittelte Sekretion ausgeschlossen werden (Fatal *et al.*, 2002; Karhinen *et al.*, 2005).

Sekretionsmechanismen, die den Golgi-Apparat umgehen, konnten insbesondere durch die Blockierung des Vesikeltransports vom ER zum Golgi-Apparat entdeckt werden (Rabouille *et al.*, 2012). Das dazu verwendete BrefeldinA inhibiert die Membranrekrutierung einer GTPase, die für die COPI-Vesikelbildung notwendig ist (Helms & Rothman, 1992). Ein Beispiel für einen solchen 'Golgi-bypass'-Sekretionsmechanismus stellt der humane Ionenkanal CFTR ('cystic fibrosis transmembrane conductance regulator') dar. Analysen mit BHK ('baby hamster kidney') und CHO ('chinese hamster ovary') Zelllinien zeigen, dass CFTR vom ER über COPII-Vesikel direkt in späte Endosomen und schließlich an die Zelloberfläche gelangen könnten, ohne dabei den Golgi-Apparat zu passieren (Yoo *et al.*, 2002).

1.3 Der Brandpilz *Ustilago maydis*

1.3.1 Der eukaryotische Modellorganismus *Ustilago maydis*

Der eukaryotische Modellorganismus *Ustilago maydis* ist ein parasitär lebender Basidiomycet und der Erreger des Maisbeulenbrandes. In Folge einer Infektion der Maispflanze können sich tumorähnliche Gallen bilden, in denen das Pilzmyzel proliferiert und schließlich große Mengen an melanisierten Sporen entstehen, die dem Mais das verbrannte (lat.:ustilare) Aussehen geben (Abb. 1.1) (Christensen, 1963). Bereits 1964 wurde am Modellorganismus *U. maydis* die homologe Rekombination von DNA entdeckt (Holliday, 1964). In den letzten Jahrzehnten ist *U. maydis* jedoch insbesondere für die Erforschung der Interaktion von Pflanzenpathogen und Wirt von großem Interesse (Brefort *et al.*, 2009; Dean *et al.*, 2012). Dies ist

zum einen darauf zurückzuführen, dass der Wirt Mais bereits seit über hundert Jahren als Modellorganismus dient (Lawrence *et al.*, 2008) und zum anderen, dass *U. maydis* mit seinen lediglich zwei Wirten *Zea mays* und dessen Vorfahren Teosinte sehr wirtsspezifisch ist (Banuett, 1992). Der in der Familie der *Ustilaginaceae*n am besten charakterisierte Pilz dient heute auch der Analyse vieler zellbiologischer Prozesse wie der Regulation des Zellzyklus, der Signaltransduktion, dem Aufbau des Cytoskeletts und dem zellulären Transport von Vesikeln und mRNA (Banuett & Herskowitz, 2002; Garrido & Perez-Martin, 2003; Feldbrügge *et al.*, 2004; Basse & Steinberg, 2004; Becht *et al.*, 2006; Lenz *et al.*, 2006; Baumann *et al.*,

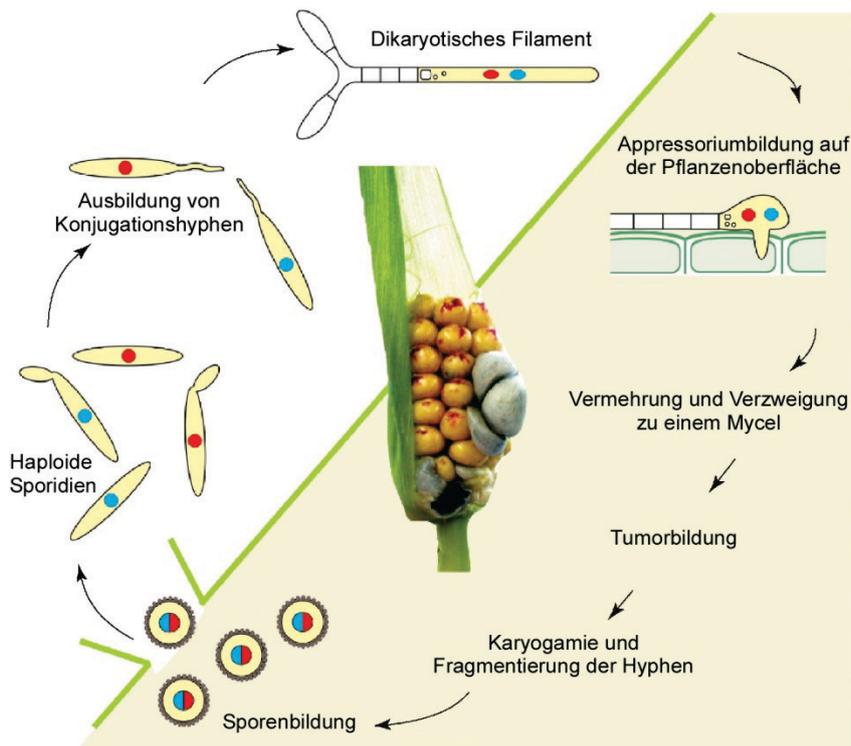


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*

Haploide Sporidien vermehren sich vegetativ durch hefeartige Knospung. Nehmen sich Sporidien unterschiedlichen Paarungstyps über Pheromone wahr, bilden sie Konjugationshyphen. Kommt es zur Paarung, entsteht ein dikaryotisches Filament, welches apikal auswächst und basal leere Abschnitte aufbaut. Über Appressorienbildung dringt der Pilz in die Pflanze ein und es kommt durch Proliferation und Verzweigung der Hyphen zur Bildung eines Myzels. In den schließlich entstehenden Tumoren (Brandgallen) führt Karyogamie und Fragmentierung der Hyphen zur Bildung von Sporen. Diese können in die Umwelt freigesetzt werden und bei günstigen Bedingungen auskeimen. Abbildung modifiziert nach Feldbrügge *et al.*, 2004.

2012). *U. maydis* besitzt einen biphasischen, sexuellen Lebenszyklus, der sich in eine saprotrophe Phase außerhalb des Wirtes und eine parasitäre biotrophe Phase einteilen lässt (Abb. 1.2). Die saprotrophe Phase beginnt mit dem Auskeimen von diploiden Teliosporen. Die durch die Meiose entstehenden haploiden, zigarrenförmigen Sporidien sind in der Lage, sich vegetativ durch hefeartige Knospung zu vermehren. Kommen zwei dieser Sporidien mit unterschiedlichem Paarungstyp in räumliche Nähe zueinander, nehmen sie dies über

ihr Paarungspheromonsystem wahr, treten in einen G2-Phase-Zellzyklusarrest ein und bilden Konjugationshyphen in Richtung des Pheromongradienten aus (Spellig *et al.*, 1994, Snetselaar *et al.*, 1996, Garcia-Muse *et al.*, 2003). Treffen diese Konjugationshyphen schließlich aufeinander, fusionieren sie und es bildet sich das dikaryotische Filament aus. Dieses wächst am apikalen Pol weiter aus und am basalen Pol werden durch die Ausbildung von Vakuolen und dem Einziehen von Septen leere Abschnitte gebildet (Lehmler *et al.*, 1997, Steinberg *et al.*, 1998).

Die Bildung eines Appressoriums am apikalen Pol ermöglicht schließlich das Eindringen des Pilzes in die Maispflanze, womit die biotrophe Phase des Lebenszyklus beginnt (Snetselaar & Mims, 1994). Die Pilzhyphe wächst dabei zunächst intrazellulär, wobei die Plasmamembran der Pflanzenzelle intakt bleibt und die Pilzhypfen umgibt (Snetselaar & Mims, 1994). Mit fortschreitender Proliferation wachsen die verzweigten Hyphen schließlich auch in den Apoplast des Mesophylls ein (Doehlemann *et al.*, 2008b). Zur Ausbildung der großen Tumore kommt es hauptsächlich durch Teilungen und Vergrößerungen von Pflanzenzellen, die vermutlich auf ein Eingreifen des Pilzes in den Phytohormonhaushalt der Maispflanze zurückzuführen ist (Doehlemann *et al.*, 2008a). In den Tumoren kommt es schließlich zur Karyogamie und die sporogenen Hyphen differenzieren sich zu den Teliosporen (Banuett, 1995, Feldbrügge *et al.*, 2004, Martinez-Espinoza *et al.*, 2002). Brechen die Tumore auf, geben sie die Sporen in die Umwelt ab, wo sie unter geeigneten Bedingungen auskeimen (Christensen, 1963).

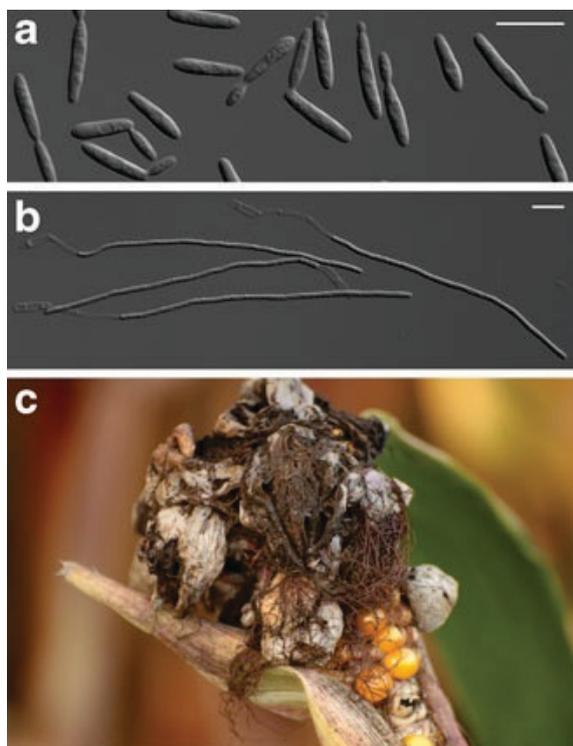


Abbildung 1.3: Der Dimorphismus von *U. maydis* (a) Hefeartig knospende haploide Zellen des AB33 Laborstammes. Kultiviert wurden die Sporidien in CM-Flüssigmedium. (b) Filamente von AB33. Simultanes filamentöses Wachstum wurde durch einen Wechsel des CM-Flüssigmediums zu nitrathaltigem NM-Flüssigmedium und anschließender sechsstündiger Kultivierung erreicht. (c) Mit *U. maydis* infizierte Maispflanze. In dem am Maiskolben entstandenen Tumor haben sich schwarze Teliosporen gebildet. Abbildung modifiziert nach Feldbrügge *et al.*, 2013.

Der morphologische Wechsel von der haploiden Sporidie zum biotroph wachsenden dikaryotischen Myzel ist auf genetischer Ebene maßgeblich von den Paarungstyp-Loci *a* und *b* abhängig (Bölker, 2001, Feldbrügge *et al.*, 2006). Für den biallelischen *a*-Locus existieren die Allele *a1* und *a2*. Hier sind unter anderem die Gene vorhanden, die für die jeweiligen Pheromonrezeptoren Pra1 bzw. Pra2 und die Pheromonvorläuferproteine Mfa1 bzw. Mfa2 kodierenden. Haploide Sporidien nehmen mit ihrem Pheromonrezeptor nur das jeweils fremde Pheromon wahr. Zur Ausbildung und Fusion von Konjugationshyphen kommt es somit nur dann, wenn die beteiligten Sporidien unterschiedlichen *a*-Genotyps sind (Bölker *et al.*, 1992). Die Ausbildung und Aufrechterhaltung des dikaryotischen Filaments wird durch den multiallelischen *b*-Locus kontrolliert. Dieser kodiert für die zwei Homeodomänen-Proteine bWest (bW) und bEast (bE).

Sie bilden einen heterodimeren Transkriptionsfaktor, sofern die entsprechenden Proteine unterschiedlichen Allelen entstammen (Gillissen *et al.*, 1992, Kämper *et al.*, 1995). Die Erforschung dieser Paarungstyp-Loci war für die Wei-

terentwicklung von *U. maydis* als genetisch leicht zu manipulierenden Modellorganismus von entscheidender Bedeutung. Sie legte auch den Grundstein für die Entwicklung von Stämmen, mit denen das filamentöse Wachstum und die Infektion der Maispflanze auch durch haploide Zellen untersucht werden konnte (Bölker *et al.*, 1995, Brachmann *et al.*, 2001). So wird im solopathogenen haploiden SG200 Stamm über die Expression eines aktiven bW/bE-Heterodimers die Infektion von Maispflanzen unabhängig von der Paarung ermöglicht (Bölker *et al.*, 1995, Kämper *et al.*, 2006).

Bei dem ebenfalls haploiden AB33 Stamm (Abb. 1.3) steht die Expression des bW/bE-Heterodimers unter der Kontrolle des Promotors einer Nitratreduktase (P_{nar}). Da dieser durch Ammonium reprimiert und über Nitrat induziert wird (Banks *et al.*, 1993), kann das filamentöse Wachstum durch einen Wechsel der Stickstoffquelle im Medium ausgelöst werden. Dies ermöglicht es, haploide Sporidien sowohl in Flüssigkulturen als auch auf Festmedien simultan zu Filamenten auswachsen zu lassen (Brachmann *et al.*, 2001).

1.3.2 *U. maydis* in der biotechnologischen Anwendung

Nach der langjährigen Erforschung von *U. maydis* als Modellorganismus ist es eine logische Konsequenz, erlangtes Wissen nun auch für biotechnologische Anwendungen zu nutzen. Wie bei der Grundlagenforschung könnte auch im biotechnologischen Bereich gerade der in eine saprotrophe Phase und eine biotrophe Phase geteilte Lebenszyklus Vorteile mit sich bringen.

Die haploide saprotrophe Phase des Lebenszyklus erleichtert zunächst einmal die genetische Manipulation des Pilzes. Viele für eine gentechnische Veränderung von *U. maydis* grundlegenden Methoden, wie DNA Isolierung und Transformation und wichtige Werkzeuge, wie autonom replizierende und exprimierende Plasmide, wurden bereits vor über 20 Jahren entwickelt und über die Zeit weiter verbessert und vereinfacht (Specht *et al.*, 1982, Wang *et al.*, 1988, Fotheringham & Holloman, 1989, Bölker *et al.*, 1995, Brachmann *et al.*, 2004, Tsukuda *et al.*, 1988, Kinal *et al.*, 1991, Kojic & Holloman, 2000). Wichtige genetische Elemente wie dominante und essentielle Selektionsmarker (Tsukuda *et al.*, 1988, Keon *et al.*, 1991, Kügel *et al.*, 1993, Gold *et al.*, 1994, Banks & Taylor, 1988, Kronstad *et al.*, 1989, Fotheringham & Holloman, 1989), konstitutive und induzierbare Promotoren (Spellig *et al.*, 1996, Bottin *et al.*, 1996, Urban *et al.*, 1996, Brachmann *et al.*, 2001, Zarnack *et al.*, 2006) sowie Reporter zur Lokalisierung, Detektion oder Affinitätsreinigung von Proteinen (Spellig *et al.*, 1996, Müller *et al.*, 1999, Romeis *et al.*, 2000, Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Becht *et al.*, 2006, Kämper *et al.*, 2006, König *et al.*, 2009, Baumann *et al.*, 2012, Straube *et al.*, 2005) sind gut etabliert. Die unterschiedlichen Genkassetten lassen sich durch ein benutzerfreundliches *SfiI*-Klonierungssystem (Brachmann *et al.*, 2004) leicht kombinieren und ermöglichen es, Gendeletionen, Genfusionen oder den Austausch von Promotoren in kürzester Zeit umzusetzen. Um die, aufgrund der limitierten Selektionsmarker, begrenzte genetische Manipu-

lierbarkeit von *U. maydis* zu überwinden, wurde ein FLP/FRT-System entwickelt, durch das Resistenzkassetten nach erfolgreicher Insertion wieder aus dem Genom rekombiniert werden können (Khrunyk *et al.*, 2010). Seit der Sequenzierung des *U. maydis* Genoms (Kämper *et al.*, 2006) sind auch die üblichen Methoden zur Transkriptom- und Proteom-Analyse erfolgreich angewendet worden (Kämper *et al.*, 2006, Scherer *et al.*, 2006, Böhmer *et al.*, 2007, Müller *et al.*, 2008, Heimel *et al.*, 2010, Koepke *et al.*, 2011, Couturier *et al.*, 2012).

Ein weiterer wichtiger Vorteil den die haploide saprophytische Phase des Lebenszyklus mit sich bringt, ist die unkomplizierte Kultivierung der haploiden Sporidien, die es auch ermöglichen würde, bestehende Infrastrukturen in industriellen biotechnologischen Anlagen zu nutzen. *U. maydis* erreicht bei exponentiellem Wachstum in Schüttelkolben eine Verdopplungszeit von unter zwei Stunden und optische Dichten von über 8, womit das Wachstumsverhalten kaum schlechter ist als in vergleichbaren Organismen wie *S. cerevisiae*. Die erfolgreiche Fermentation von *U. maydis* wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen berichtet, wobei sowohl die konventionelle 'Batch-', 'Fed-batch-' und kontinuierliche Fermentation als auch die Fermentation in Membranbioreaktoren angewendet wurde (Feldbrügge *et al.*, 2013). Erste Fermentationen von *U. maydis* in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass damit problemlos optische Dichten von 20 bis 30 erreicht werden könnten, je nachdem ob es sich um eine 'Batch' oder 'Fed-batch' Fermentation handelt (M. Terfrüchte, Bachelorarbeit 2011). Auch wenn die relativ teure Glukose bei der Kultivierung als effizienteste Kohlenstoffquelle erscheint, ist *U. maydis* zusätzlich in der Lage, auf deutlich günstigeren Zuckern, behandelten Pflanzenresten oder pflanzlichen Ölen zu wachsen (Feldbrügge *et al.*, 2013).

Die biotrophe Phase des Lebenszyklus könnte andere biotechnologisch nutzbare Vorteile mit sich bringen. Für die Besiedelung der Maispflanze benötigt *U. maydis* viele Enzyme zur Degradierung von Pflanzenbestandteilen. Ein solches enzymatisches Potential könnte im biotechnologischen Biomasseabbau genutzt werden. Untersuchungen von Genclustern, die für viele sekretierte Proteine kodieren, sowie Sekretomanalysen deuten zwar darauf hin, dass *U. maydis* im Vergleich zu nekrotrophen Pilzen ein relativ geringes Spektrum solcher lytischen Enzyme sekretiert (Kämper *et al.*, 2006, Müller *et al.*, 2008). Andererseits konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass sekretorische *U. maydis* Enzyme, wie Arabinofuranosidasen und Oxidoreduktasen, im Zusammenspiel mit lytischen Enzymen von anderen Organismen wie *Trichoderma reesei* zum effektiveren Abbau von Lignozellulose beitragen könnten (Couturier *et al.*, 2012). Es wird diskutiert, dass in diesem Bereich der biotechnologischen Verwertung von Pflanzenresten spezifische lytische Enzyme oder gar genetisch veränderte Stämme von *U. maydis* eingesetzt werden könnten (Feldbrügge *et al.*, 2013).

In Bezug auf die biotechnologische Nutzung des Pilzes sind auch von *U. maydis* synthetisierte Sekundärmetaboliten wie Glykolipide oder Siderophore sehr interessant (Feldbrügge *et al.*, 2013). Es konnte bereits in den 50er Jahren gezeigt werden, dass *U. maydis* unter be-

stimmten Kultivierungsbedingungen große Mengen an Glycolipiden, sowohl Cellobiose-Lipiden (CL, auch als Ustilaginsäure bekannt) als auch Mannosylerythritol-Lipide (MEL) produzieren kann (Haskins, 1950, Boothroyd *et al.*, 1956). Diese, zu den Biotensiden gehörenden amphiphilen Verbindungen haben gegenüber erdölbasierten, chemischen Tensiden den Vorteil, dass sie aufgrund ihrer geringeren Toxizität und der biologischen Abbaubarkeit deutlich umweltverträglicher sind (Kitamoto *et al.*, 2002). Biotenside könnten nicht nur in den für Tenside typischen Bereichen wie Papier-, Textil-, Polymer-, Plastik- oder Kosmetikindustrie, sondern auch für pharmazeutische und antimikrobielle Anwendungen genutzt werden (Kitamoto *et al.*, 2002, Singh & Cameotra, 2004). Obwohl Glycolipide auch von anderen Mikroorganismen aus den Gattungen *Pseudomonas*, *Candida*, *Rhodococcus* und *Pseudozyma* produziert werden, ist *U. maydis* die am besten charakterisierte Spezies (Liu *et al.*, 2011) und besitzt damit ein großes Potential, zur industriellen Produktion von CLs und MELs beizutragen. Dafür spricht außerdem die teilweise weit fortgeschrittene Aufklärung der jeweiligen Synthesewege in *U. maydis* (Feldbrügge *et al.*, 2013).

Wie viele andere Mikroorganismen bildet *U. maydis* unter Eisenmangel kleine Cyclohexapeptide, die sogenannten Siderophore. Die synthetisierten Eisenchelatbildner Ferrichrom und Ferrichrom A werden sekretiert und dienen dem Pilz zur Aufnahme von Eisen aus seiner Umwelt (Budde & Leong, 1989). Vom biotechnologischen Aspekt gesehen, sind Siderophore für Anwendungen in der Medizin oder Landwirtschaft von Interesse. Dabei könnten sie unter anderem zur Behandlung von Patienten mit Eisenüberschuss eingesetzt werden, über ihre Affinität zu Bakterien die Wirkung von Antibiotika verbessern oder das Wachstum von Pflanzen erhöhen (Neilands, 1995).

Einen wichtigen Beitrag könnte *U. maydis* eines Tages auch in der Biokraftstoffherstellung aus erneuerbaren Ressourcen leisten (Feldbrügge *et al.*, 2013). Bei der heute schon kommerziell durch *Aspergillus terreus* produzierten Itaconsäure handelt es sich um eine Plattformchemikalie, aus der eine Vielzahl von Produkten wie Kunststoffe, Tenside, bioaktiven Verbindungen oder eben potentielle Biokraftstoffe generiert werden können (Okabe *et al.*, 2009, Klement *et al.*, 2012). Die Produktionsmengen von Itakonsäure liegen bereits bei genetisch unveränderten *U. maydis* Stämmen nur moderat unter denen von über Jahre optimierten *Aspergillus terreus* Stämmen (Okabe *et al.*, 2009, Klement *et al.*, 2012). Die Produktion mit *U. maydis* hätte jedoch im Vergleich zum filamentösen *A. terreus* den Vorteil der leichter fermentierbaren hefeartigen Wachstumsform (Klement *et al.*, 2012). Eine sehr wichtige Voraussetzung für den Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie ist die Sicherheit, solche Organismen ohne Gefahr für Mensch, Tier oder Umwelt nutzen zu können. Auch wenn es sich bei *U. maydis* um einen pathogenen Pilz handelt, gibt es überzeugende Argumente dafür, dass der Pilz auch den, von der FDA ('Food and Drug Administration') vergebenen, GRAS ('Generally Recognized As Safe') Status erlangen könnten. Eines dieser

Argumente ist die bereits beschriebene Tatsache, dass sich das Wirtsspektrum dieses Pflanzenpathogens auf die Wirte *Zea mays* und Teosinte beschränkt (Banuett, 1992). Durch *U. maydis* auftretende Ernteauffälle liegen mit unter zwei Prozent (Martinez-Espinoza *et al.*, 2002) deutlich unter denen von anderen Pflanzenpathogenen. So wird der Pilz in südamerikanischen Ländern wie Mexiko auch nicht als Plage angesehen, da befallene Maiskolben hier als Delikatesse gelten. Die als 'Huitlacoche' benannten Brandgallen wurden dort bereits vor Jahrhunderten von den Azteken als Nahrung geschätzt (Valverde *et al.*, 1993) und werden heute sogar industriell vermarktet (Tracy *et al.*, 2007).

Obwohl sich *U. maydis* aufgrund der vielen, bereits beschriebenen Vorteile generell auch für die Anwendung als Expressionsplattform von heterolog exprimierten Proteinen eignen würde (Feldbrügge *et al.*, 2013), ist das in dieser Arbeit vorgestellte Expressionssystem der erste Versuch dies auch umzusetzen und auszutesten.

1.3.3 Rrm4 abhängige Sekretion der Endochitinase Cts1

Erst kürzlich konnte auch in *U. maydis* die vermutlich unkonventionell sekretierte Endochitinase Cts1 identifiziert werden. Die Sekretion von Cts1 ist in Filamenten von einem funktionellen Rrm4-Protein abhängig (Koepke *et al.*, 2011). Rrm4 ist ein mRNA-Bindeprotein, das spezifische mRNAs in Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNP-'messenger ribonukleoprotein') entlang von Mikrotubuli transportiert und eine wichtige Rolle in der Regulation des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung spielt (Becht *et al.*, 2005, Becht *et al.*, 2006). In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mRNPs dabei mit Endosomen assoziiert sind, die sich wiederum über Motorproteine entlang von Mikrotubuli bewegen (Baumann *et al.*, 2012).

Das ELAV-Typ mRNA-Bindeprotein Rrm4 besitzt N-terminal drei RNA-Erkennungsmotive (RRM, 'RNA recognition motifs') und C-terminal eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne die auch aus dem Poly-(A)-bindenden Protein als PABC-Domäne bekannt ist (Becht *et al.*, 2005, Kozlov *et al.*, 2010, Kozlov *et al.*, 2001). Während die Deletion von *rrm4* auf das hefeartige Wachstum keinen Einfluss hat, führt sie zu morphologisch veränderten Filamenten. Die Filamente bilden sich vermehrt bipolar aus und auch bei unipolaren Filamenten bleibt die Bildung leerer Abschnitte am basalen Pol aus (Becht *et al.*, 2006).

Als Beispiele für vermutlich relativ affine mRNA-Bindungspartner von Rrm4 sind insbesondere die, durch die *in vivo* CLIP-Technologie (CLIP, 'ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation') identifizierten, *rho3*- und *ubi1*-mRNAs zu nennen (König *et al.*, 2009, Koepke *et al.*, 2011). Rho3 ist ein kleines G-Protein, das in Filamenten an den Septen der leeren Abschnitte akkumuliert und Ubi1 ist ein natürliches Fusionsprotein aus Ubiquitin und einem ribosomalen Protein Rpl40. Durch 'RNA live imaging' Experimente, bei denen ein Fusionsprotein aus mRNA-Bindeprotein und Gfp als *in vivo* Reporter für mRNAs mit der entsprechenden Erkennungssequenz genutzt werden kann, konnte gezeigt werden, dass sowohl *ubi1*- als auch

rho3-mRNA in Filamenten bidirektional in Rrm4-abhängigen Partikeln fährt. Für *ubi1*-mRNA konnte dabei auch die Kolokalisierung mit dem Rrm4 Protein gezeigt werden (König *et al.*, 2009).

Der Funktionsverlust von molekularen Motoren wie Dynein und Kinesin sowie die Anwendung des Mikrotubuli Inhibitors Benomyl führen in Filamenten zu einem vergleichbaren Phänotyp, wie er in *rrm4Δ*-Filamenten auftritt (Fuchs *et al.*, 2005, Schuchardt *et al.*, 2005). Der von diesen Motorproteinen abhängige Transport von frühen Endosomen entlang von Mikrotubuli wurde in der Vergangenheit bereits ausführlich untersucht (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Wedlich-Söldner *et al.*, 2002, Lenz *et al.*, 2006). Ein Zusammenhang von mikrotubuliabhängigem Endosomen- und mRNP-Transport konnte jedoch erst kürzlich bestätigt werden (Baumann *et al.*, 2012). Dabei wurde gezeigt, dass der mRNP-Transport von den funktionellen Motorproteinen Dyn1/2, Kin3 und Kin1 abhängig ist. Der zum Minusende gerichtete Motor Dyn1/2 kolokalisierte mit Rrm4 hauptsächlich in retrograden Partikeln, während das zum Plusende gerichtete Kin3 mit Rrm4 sowohl in retrograden als auch in anterograden, zur Filamentspitze gerichteten Partikeln kolokalisierte. Die generelle Verknüpfung von mRNP- und Endosomentransport konnte durch die Kolokalisierung von Kin3 und Rrm4 mit dem lipophilen Styrylfarbstoff FM4-64 bestätigt werden. Weiterhin waren pendelnde Rrm4-Partikel, unabhängig von Kin3, fast ausschließlich auf Yup1-enthaltenden Endosomen zu finden. Die Funktionalität dieses t-SNARE Proteins Yup1, das neben dem kleinen G-Protein Rab5a eines der charakteristischen Proteine von mikrotubulieabhängig transportierten, frühen Endosomen ist (Wedlich-Söldner *et al.*, 2000, Fuchs *et al.*, 2006), ist für Rrm4-Transport unerlässlich. Yup1-enthaltende Endosomen fahren hingegen auch in *rrm4Δ*-Filamenten weiterhin entlang von Mikrotubuli (Baumann *et al.*, 2012).

Insgesamt führten die Untersuchungen von Endosomen- und mRNP-Transport zu dem in Abbildung 1.4 dargestellten und in Göhre *et al.* (2012) näher erläuterten Modell zum mikrotubuliabhängigen Ko-Transport von Rab5a-positiven Endosomen und mRNPs.

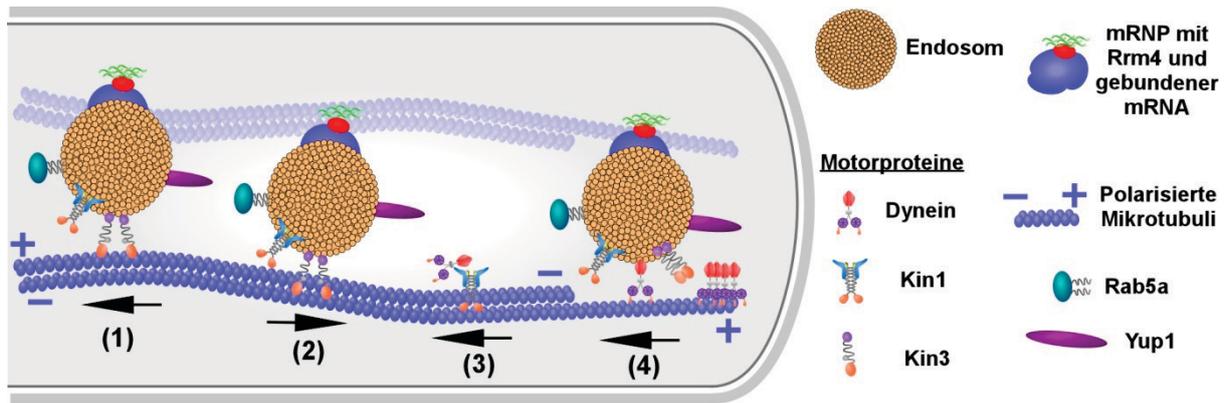


Abbildung 1.4: Modellvorstellung des mikrotubuliabhängigen Ko-Transports von Rab5a-positiven Endosomen und mRNPs

Das zum Plusende gerichtete Kin3-Motorprotein transportiert Rab5a und Yup1 enthaltende Endosomen auf Mikrotubulibündeln mit antiparallel orientierten Mikrotubuli sowohl in Richtung der Spitze des Filaments als auch in entgegengesetzter Richtung (1+2). In der Nähe der Pole des Filaments sind ausschließlich unidirektionale, mit dem Plusende zum Pol gerichtete Mikrotubuli vorhanden, die einen retrograden Transport der Endosomen über das zum Minusende gerichtete Motorprotein Dynein notwendig machen (4). Der Rücktransport der Motorproteine wird im Fall von Dynein über konventionelles Kinesin (Kin1) ermöglicht (3) während den Kinesinen Kin1 und Kin3 der Rücktransport über retrograd transportierte Endosomen möglich ist. Endosomen und Rrm4-enthaltende mRNPs werden kotransportiert, die für deren Interaktion verantwortlichen Proteine sind jedoch noch nicht bekannt. Abbildung modifiziert nach Göhre *et al.*, (2012).

Die Endochitinase Cts1 wurde in Koepke *et al.* (2011) zum ersten Mal näher untersucht und beschrieben. Gefunden wurde das Enzym dabei in einer vergleichenden Proteomanalyse von membranassoziierten Proteinen aus Filamenten des AB33 und des AB33rrm4 Δ Stammes. In dieser 2D-DIGE-Proteom-Analyse (DIGE, 'difference gel electrophoresis') gehörte Cts1 zu den Proteinen, die in höheren Konzentrationen im rrm4-Deletions-Stamm als im AB33 Vorläuferstamm zu finden waren. Weiterhin wurde beschrieben, dass das Genom von *U. maydis* neben Cts1 nur noch für zwei weitere Endochitinasen der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 und eine Exochitinase der Glykosyl-Hydrolase-Familie 20 kodiert. Eine phylogenetische Analyse von 80 Chitinasesequenzen der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien zeigte, dass sich die Gruppe in vier monophyletische Zweige für bakterielle, pflanzliche, Basidiomyceten-spezifische Chitinasen und Chitinasen mit ungewöhnlich hohem Molekulargewicht aufteilt. Cts1 gehörte hier zu den Chitinasen des bakteriellen Typs und die beiden anderen Endochitinasen (*um02758* und *um06190*) in die Zweige der pflanzlichen bzw. der Basidiomyceten-spezifischen Chitinasen. Die Deletion von *cts1* im AB33 Stammhintergrund hatte keinen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie, sowohl von Sporidien als auch von Filamenten. Die *cts1* Δ -Filamente neigten jedoch im Vergleich zu AB33 Filamenten deutlich stärker dazu mit ihren leeren Abschnitten aneinander zu aggregieren. Es kam außerdem zur Flokkulierung der Filamente auf der Oberfläche des Flüssigmediums und zu einer stärkeren Haftung der Filamente an den Glaswänden von Kolben oder Reagenzgläsern. Die Ausübung von Zellwand-, Salz oder osmotischem Stress auf AB33cts1 Δ hatte im Vergleich zum AB33 Stamm keine Auswirkung auf das hefeartige oder filamentöse Wachstum was gegen einen, in der *cts1*-Deletion begründeten Zellwanddefekt

spricht. Weiterhin wies auch ein solopathogener SG200cts1 Δ Stamm eine vergleichbare Pflanzenpathogenität zum Vorläuferstamm auf. Durch die, vom endogenen Promotor kontrollierte, Expression einer Cts1-Gfp-Fusion (Cts1G) in den Stammhintergründen AB33 und AB33rrm4 Δ konnte biochemisch bestätigt werden, dass Cts1G in der membranassoziierten Fraktion von rrm4 Δ -Filamenten akkumuliert. Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen beider Stämme (AB33cts1G und AB33cts1G/rrm4 Δ) zeigten, dass Cts1G in hefeartig knospenden Zellen relativ gleichmäßig im Cytoplasma verteilt ist und zusätzlich schwach an der Membran lokalisiert (Abb. 1.5 A und B). Beim filamentösen Wachstum des AB33cts1G Stammes war Cts1G hingegen subapikal in der Membran der Wachstumszone lokalisiert (Abb. 1.5 C). Im AB33cts1G/rrm4 Δ Stamm befand sich Cts1G in bipolar ausgewachsenen Filamenten subapikal an beiden Wachstumszonen (Abb. 1.5 D) (Koepke *et al.*, 2011). Fluoreszenzmikroskopische Analysen von Stämmen die C-terminal mit mCherry fusioniertes Cts1 produzieren deuten darauf hin, dass Cts1 in Filamenten auch an den Septen und der Zellwand von leeren Abschnitten lokalisieren (S. Jankowski, Masterarbeit 2013). Weiterhin konnten Koepke *et al.*

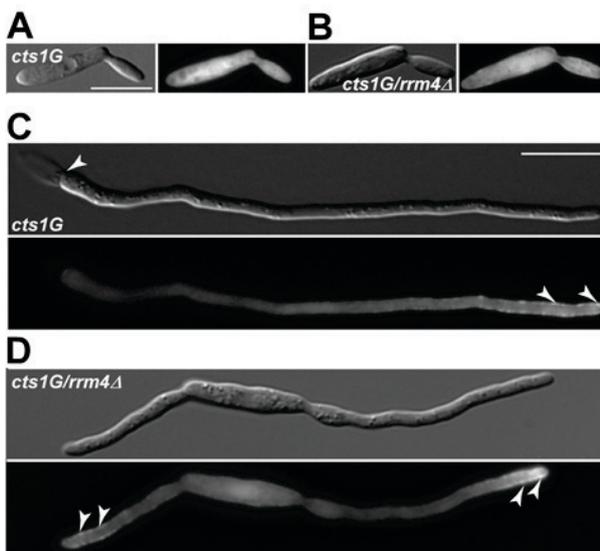


Abbildung 1.5: Subapikale Lokalisation von Cts1G in Filamenten

Mikroskopische DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von hefeartig wachsenden Zellen (A+B) und acht Stunden induzierten Filamenten (C+D) der Stämme AB33cts1G und AB33cts1G/rrm4 Δ . Weiße Pfeile markieren in DIC-Aufnahmen eingezogene Septen und in Fluoreszenzaufnahmen die subapikale Lokalisation von Cts1G. Der Größenmaßstab entspricht 10 μ m. Abbildung modifiziert nach Koepke *et al.*, 2011.

ten zu der in Abbildung 1.6 dargestellten Modellvorstellung (Koepke *et al.*, 2011, Koepke, 2010).

(2011) zeigen, dass eine auf der Zelloberfläche nachweisbare chitinolytische Aktivität fast ausschließlich durch die Endochitinase Cts1 vermittelt wird. Analysen von AB33 und AB33rrm4 Δ zeigten auf der Oberfläche der Sporidien eine vergleichbare chitinolytische Aktivität. Beim Vergleich von Filamenten zeigte sich hingegen, dass die chitinolytische Aktivität des AB33rrm4 Δ Stammes deutlich reduziert war. Ebenso war die chitinolytische Aktivität in einem AB33kin1 Δ Stamm oder im AB33 Stamm nach der Anwendung von Benomyl reduziert. Insgesamt deuteten die Ergebnisse schließlich darauf hin, dass die Cts1-Sekretion in Filamenten vom Rrm4-vermitteltem mRNA-Langstreckentransport entlang der Mikrotubuli abhängig ist und führ-

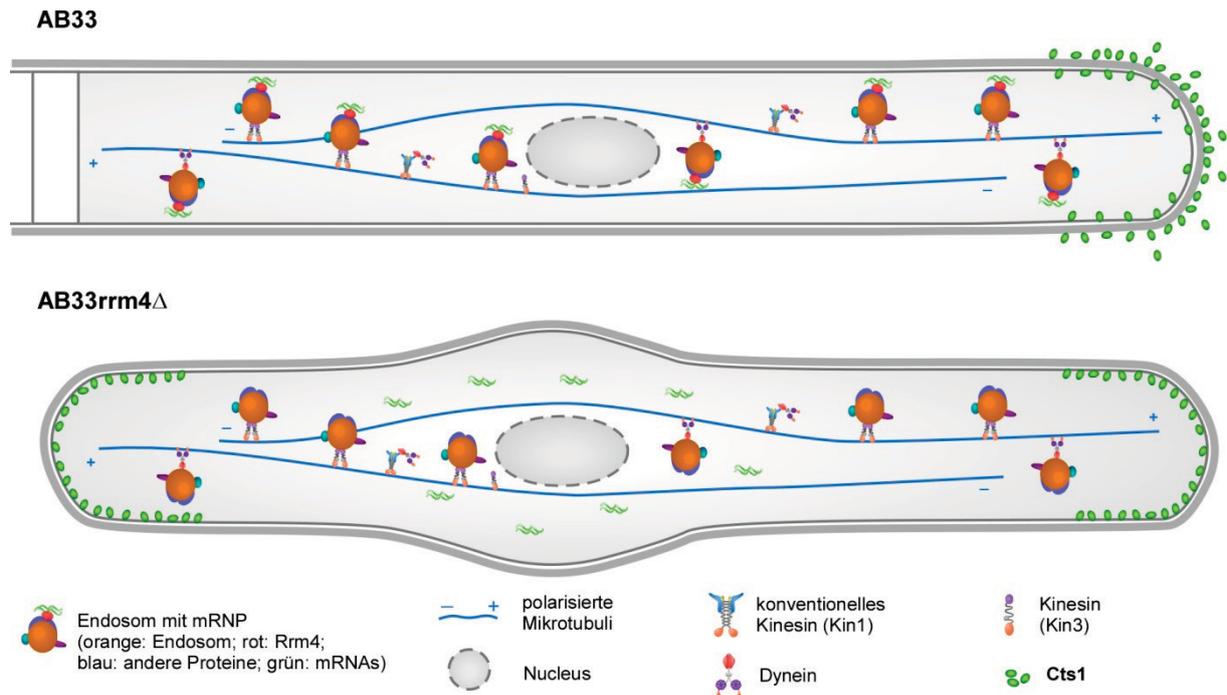


Abbildung 1.6: Modellvorstellung der Cts1-Lokalisation in Filamenten des AB33 und AB33rrm4 Δ Stammes
 In unipolaren AB33-Filamenten sind spezifische mRNAs an Rrm4 gebunden, welches in mRNPs und mit Endosomen entlang von Mikrotubuli transportiert wird. Cts1 lokalisiert an der Spitze des Filaments, kann dort sekretiert werden und ist anschließend hauptsächlich mit der Zellwand assoziiert. In bipolaren *rrm4 Δ* -Filamenten findet kein Mikrotubuli abhängiger mRNA-Transport statt. Cts1 lokalisiert hier an beiden Enden der Filamente und akkumuliert vermehrt in Membranen, wird jedoch nicht effizient sekretiert. Abbildung modifiziert nach Vollmeister *et al.*, 2012, Göhre *et al.*, 2012 und Koepke, 2010.

CLIP- und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungs (FISH) -Daten (Koepke *et al.*, 2011) sprechen dafür, dass die *cts1*-mRNA eine von Rrm4 transportierte mRNA ist. Die Transportfrequenz für diese mRNA scheint jedoch, im Vergleich zu anderen transportierten mRNAs eher gering zu sein. Es ist demnach derzeit noch offen, ob die ausbleibende Cts1-Sekretion in *rrm4 Δ* -Filamenten direkt auf einen fehlenden *cts1*-mRNA-Transport oder auf indirekte Prozesse zurückzuführen ist. So könnten bisher unbekannt mRNAs, die für Komponenten kodieren, welche für die Cts1-Sekretion notwendig sind, von dem ausbleibenden mRNA-Transport betroffen sein. Die vom mRNA-Transport abhängige und aufgrund des fehlenden Signalpeptids vermutlich unkonventionell ablaufende Cts1-Sekretion (Koepke *et al.*, 2011) könnte den Aufbau eines neuen Expressionssystems ermöglichen. Dabei könnten vollkommen neuartige Ansätze angewendet werden, wie die Sekretionssteigerung über die Optimierung des mRNA-Transports.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Für die Produktion heterologer Proteine kann es Sinn machen neue Expressionssysteme in bisher nicht genutzten Wirten zu entwickeln, um bisher nicht oder nur mit geringer Ausbeute produzierbare Produkte herzustellen. Bisher wurde der pflanzenpathogene Pilz *U. maydis* nicht im Hinblick auf die Eignung als Protein-Expressionssystem untersucht, obwohl viele Argumente für eine solche Anwendung sprechen würden. In diese Arbeit sollte daher initial überprüft werden, ob sich der Pilz als Expressionsplattform eignet. Hierbei sollte die sekretierte Endochitinase Cts1 genutzt werden, um fusionierte Produkte in den Überstand zu translozieren. Da Cts1 vermutlich unkonventionell sekretiert wird, würden fusionierte heterologe Proteine unglykosyliert produziert werden, was insbesondere für einige medizinisch genutzte Produkte von Vorteil sein kann.

Für den Aufbau einer Expressionsplattform ist es essentiell, den Sekretionsmechanismus von Cts1 genauer zu kennen. Daher sollte zunächst die Sekretion von Cts1 näher charakterisiert und quantifiziert werden. Mit dem Aufbau eines Reportersystems für unkonventionelle Sekretion sollte hierbei zum einen der Export in den Kulturüberstand bestätigt werden und zum anderen die Möglichkeit geschaffen werden, die durch Cts1 vermittelte Sekretion eines heterologen Proteins qualitativ und quantitativ bewerten zu können. In einem nächsten Schritt sollten Sequenzregionen in Cts1 identifiziert werden, die für die Sekretion benötigt werden. Hierzu sollen auf einem Sequenzvergleich mit nah verwandten Chitinasen basierende, verkürzte Cts1-Varianten getestet werden. Um die Eignung und Anwendung des Systems für den Proteinexport zu testen, sollte, basierend auf den zuvor gewonnenen Einblicken in die Sekretionseigenschaften von Cts1, ein neues, möglichst variables Expressionsvektorsystem entwickelt werden, was es ermöglichen sollte, Genkassetten durch einfachste Klonierungen auszutauschen, Produktionsstämme in kürzester Zeit herzustellen und das Produkt schließlich über geeignete Affinitätstags aufzureinigen. Die Menge an sekretiertem heterologem Protein sollte schließlich quantitativ ermittelt werden. Als ein erstes heterologes Testprotein sollte die CalB Lipase aus *Pseudozyma aphidis* exprimiert werden, die in der Biotechnologie eine wichtige Rolle spielt und bereits in unterschiedlichsten Expressionssystemen produziert wurde. Da *U. maydis* eine zu CalB sehr nah verwandte Lipase besitzt, sollte diese in den Expressionsstämmen deletiert werden, um interferierende lipolytische Hintergrundaktivitäten zu minimieren. Im Zuge der Charakterisierung dieses Deletionsstamms sollte auch ein geeigneter Assay etabliert werden, mit dem die CalB-vermittelte lipolytische Aktivität analysiert werden kann. Schließlich sollten Lipasen wie CalB, Uml2 oder relevante aber bisher schlecht produzierbare Lipasen heterolog exprimiert und deren Sekretion analysiert werden.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung der Cts1 Sekretion in *U. maydis*

2.1.1 Etablierung eines β -Glucuronidase-Reportersystems zum Nachweis der unkonventionellen Sekretion von Cts1

Die Sekretion der Endochitinase Cts1 ist in *U. maydis* Filamenten von dem mRNA-Bindeprotein Rrm4 abhängig (Koepke *et al.*, 2011). Rrm4 ist essentiell für den Endosomen-assoziierten mRNA-Transport entlang von Mikrotubuli und spielt somit eine wichtige Rolle in der Regulation des filamentösen Wachstums und der pathogenen Entwicklung (Becht *et al.*, 2005; Becht *et al.*, 2006, Baumann *et al.*, 2012). Bioinformatische Analysen von Cts1 zeigten, dass Cts1 kein N-terminales Sekretionssignal besitzt, was auf einen unkonventionellen Sekretionsweg hindeutete (Koepke *et al.*, 2011). Dieser neuartige Sekretionsmechanismus wurde im folgenden Teil näher charakterisiert.

Ein wichtiger posttranslationaler Schritt während der konventionellen Sekretion ist die *N*-Glykosylierung von Proteinen im ER. Da bei den meisten bekannten unkonventionellen Sekretionsmechanismen das ER umgangen wird (Rabouille *et al.*, 2012), bleibt diese Modifikation in den entsprechenden Proteinen aus. Dieses kann man sich zu Nutze machen, um die unkonventionelle Sekretion von Proteinen nachzuweisen. Die *N*-Glykosylierung kann sehr unterschiedliche Auswirkungen auf Faltung, Stabilität oder Aktivität von Proteinen haben (Helenius & Aebi, 2001, Helenius & Aebi, 2004, Brocca *et al.*, 2000). In dem hier angewendeten Reportersystem wurde letzteres in Bezug auf die β -Glucuronidase (Gus) aus *E. coli* (*uidA*, *EG1105*) ausgenutzt (Jefferson *et al.*, 1986, Iturriaga *et al.*, 1989). Dieses natürlicherweise cytoplasmatisch exprimierte Reporterenzym wurde in vielen transgenen Organismen wie Pflanzen, Hefen und filamentösen Pilzen verwendet. Das Enzym hat eine unvergleichliche Sensitivität, ist in einem weiten pH-Bereich stabil und aktiv, kann in zellfreien Extrakten leicht quantifiziert werden und kann histochemisch in Zellen oder Geweben lokalisiert werden (Liu *et al.*, 2008). In einer Vielzahl von Geweben und Organismen sind keine Hintergrundaktivitäten zu erwarten, was auch schon für *U. maydis* bestätigt wurde (Roberts *et al.*, 1989, Urban *et al.*, 1996). Obwohl es sich bei Gus um ein bakterielles Enzym handelt, das natürlicherweise nicht glykosyliert wird, besitzt es zufällig eine *N*-Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 354. Wird dieser Asparaginrest in Eukaryonten glykosyliert, ist die Aktivität des Enzyms stark reduziert (Iturriaga *et al.*, 1989). Exprimierte man Gus fusioniert mit einem sekretierten Protein in einem eukaryotischen System, wären entsprechende Aktivitäten in Kulturüberständen folglich nur bei unkonventioneller Sekretion unter Umgehung des ERs zu erwarten.

2.1.1.1 Herstellung von β -Glucuronidase-Reporterstämmen

Um Gus zur Analyse des Sekretionsmechanismus von Cts1 in *U. maydis* zu nutzen, wurden vier Reporterstämme hergestellt, die jeweils die in Abbildung 2.1 A dargestellten Gus-Fusionsproteine exprimieren. Dabei handelt es sich um eine N-terminale und eine C-terminale Fusion von Gus an Cts1, die auf unkonventionelle Sekretion getestet werden sollten. Weiterhin wurden Gus ohne jegliche Zielsequenzen und Gus fusioniert mit einem Signalpeptid (aus der konventionell sekretierten Invertase Suc2) hergestellt. Alle Fusionsproteine besaßen einen GTH-Tag, der sich aus Gfp, Tap-Tag und einem Decahistidin-Tag zusammensetzte und über den die Lokalisierung, Detektion und Reinigung der Proteine ermöglicht werden sollte. Sofern Cts1 die unkonventionelle Sekretion der Gus-Fusionsproteine vermitteln würde, wären bei Stämmen mit *gus-cts1* bzw. *cts1-gus* Insertionen Gus-Aktivitäten an der Zelloberfläche bzw. in Kulturüberständen zu erwarten. Für den *gus* exprimierenden Stamm würde man keine zellexterne Aktivität erwarten, da Gus hier nur im Cytoplasma vorhanden sein sollte und der Stamm somit als Zellyse-Kontrolle dienen kann. Das konventionell sekretierte Gus mit Signalpeptid sollte zwar sekretiert werden, im Überstand aber aufgrund der N-Glykosylierung nicht aktiv sein.

Alle Konstrukte wurden an einem spezifischen genomischen Locus eingebracht, was die Vergleichbarkeit der Expressionslevel ermöglicht. In dem für die Stamsherstellung verwendeten Insertionsplasmid wird die Expression der Gene, welche die Fusionsproteine codieren, über den konstitutiven P_{otef} Promotor und den T_{nos} Terminator (Spellig *et al.*, 1996) kontrolliert. Die im Plasmid enthaltene Carboxin-Resistenz (*cbx^R*, Abb. 2.1 A) ermöglicht über das Resistenz-vermittelnde *ip^r*-Gen die homologe Rekombination mit dem sensitiven *ip*-Locus (*ip^s*) des AB33 Stammes (Abb. 2.1 B). Der *ip*-Locus kodiert für eine Eisen-Schwefel-Untereinheit (iron-sulfur protein, Ip) der Succinat-Dehydrogenase (Sdh2). Dieses in der Atmungskette eingebundene Enzym kann als endogen exprimierte Variante (*ip^s*) durch Carboxin inhibiert werden. Im Carboxin-Resistenz vermittelnden *ip^r*-Allel führt eine Punktmutation zum Austausch eines Histidins an Aminosäureposition 253 zu einem Leucin des entsprechenden Proteins, wodurch die Inhibierung unterbunden wird. Entsprechende Transformanten werden so resistent gegen das Antibiotikum Carboxin (Broomfield & Hargreaves, 1992). Abbildung 2.1 B zeigt schematisch, wie sich der *ip*-Locus vor bzw. nach erfolgreicher Insertion des *gus-gth* Plasmids darstellt. Zur Transformation wurden die Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *AgeI* im *ip^r* Locus linearisiert. Aufgrund der Homologie der *ip*-Sequenzen kann das Plasmid über homologe Rekombination vollständig und gezielt inseriert werden. Es kann dabei sowohl zu Einzelinsertionen als auch zu Doppel- oder Mehrfachinsertionen kommen (Abb. 2.1 B).

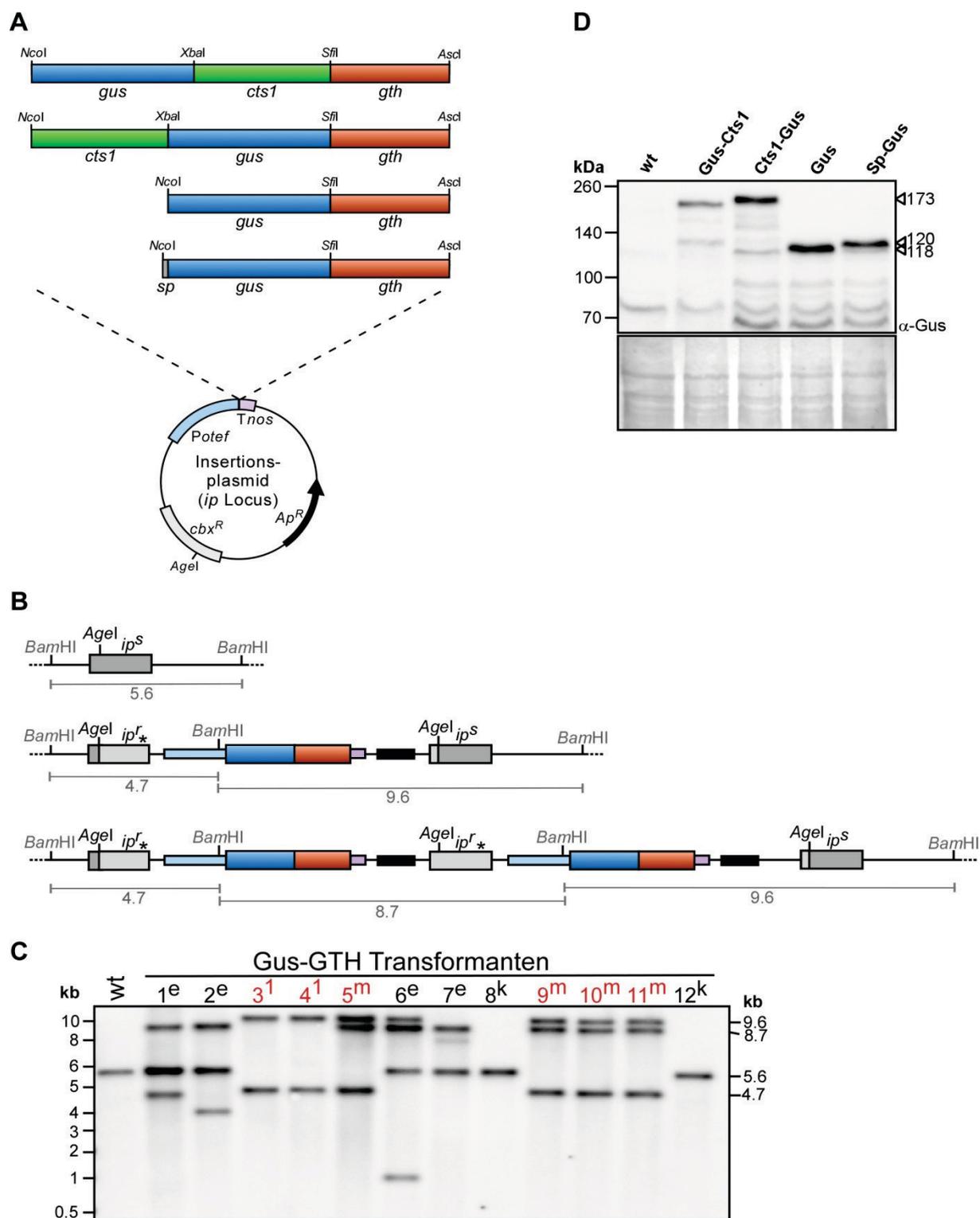


Abbildung 2.1: Herstellung von β -Glucuronidase-Reporterstämmen

(A) Schematische Darstellung der Insertionsplasmide zur Expression der Reporterkonstrukte. Die vier verschiedenen Konstrukte wurden jeweils in ein Insertionsplasmid mit einer Ampicillin- (Ap^R) und Carboxin-Resistenz (cbx^R) für die Selektion in *E. coli* bzw. *U. maydis* kloniert. Die Carboxin-Resistenz wird über den ip^r -Locus vermittelt und ermöglicht durch die Sequenzhomologie zum sensitiven Allel (ip^s , siehe B) die gezielte Insertion des Plasmids über homologe Rekombination (Broomsfield und Hargreaves, 1992). Die Expression der Reportergene wird über den konstitutiven Promotor P_{otef} und den Transkriptions-Terminator T_{nos} kontrolliert (Spellig *et al.*, 1996). Hergestellt wurden zwei Stämme, die Gus über carboxy- bzw. aminoterminal fusioniertes Cts1 sekretieren, ein Stamm der cytoplasmatisches Gus produziert, und ein Stamm, der Gus konventionell über ein Signal-Peptid (sp) der Invertase Suc2 sekretiert. Alle Fusionsproteine besitzen außerdem einen GTH-Tag (gth), bestehend aus eGfp, Tap-Tag und Deca-His-Tag. (B) Beispielhafte schematische Darstellung des ip -Locus im *U. maydis* Genom vor und nach der Insertion des $gus-gth$ Plasmids. Oben ist der endogene ip Locus mit dem sensitiven ip^s Allel

gezeigt, der keine Carboxin-Resistenz vermittelt, aber die homologe Rekombination der *AgeI* restringierten Plasmide über das *ip^f* Allel ermöglicht. Mittig ist der *ip*-Locus nach erfolgter Einzelinsertion des *gus-gth* Plasmids gezeigt und unten wird eine zweifache Insertion des Plasmids dargestellt. Das endogene *ip^s*-Gen ist in dunklem Grau und neu eingebrachte *ip^f* Sequenzen in hellem Grau eingefärbt. Die Position Punktmutation im *ip^f* Locus ist durch einen Stern markiert. Zur Bestätigung der Stämme durch Southern Blot-Analyse wurde die gDNA mit *Bam*-*HI* restringiert. Die in der Southern Blot-Analyse erwarteten Fragmentgrößen sind unter den jeweiligen Genomregionen in kb angezeigt. **(C)** Southern Blot-Analyse von AB33 Gus-GTH Transformanten. gDNA wurde dazu mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI geschnitten, aufgetrennt und geblottet. Zum Nachweis der Fragmente wurde eine 2,1 kb DNA-Sonde verwendet, die Homologie zum *ip*-Locus besitzt. Die erwarteten Fragmentgrößen sind: 5,6 kb für den AB33 Ausgangsstamm (wt), 4,7 und 9,6 kb für die Einzelinsertion des Plasmids und 4,7, 8,7 und 9,6 kb für multiple Insertionen. Transformanten, bei denen das Plasmid im *ip*-Locus integriert wurde sind rot beschriftet. Die Klonnummern sind jeweils ergänzt durch die Zeichen: ¹ für eine Einzelinsertion, ^m für multiple Insertionen, ^e für ektopische Insertionen und ^k für Genkonversionen. **(D)** Expressionsnachweis der Gus-Fusionsproteine mittels Immunblot. Es wurden jeweils 10 µg Zellextrakt auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Nachweis erfolgte mit einem Anti-Gus-Antikörper. Die Coomassie gefärbte Membran bestätigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. Die theoretischen Massen von 173 kDa für Gus-Cts1-GTH und Cts1-Gus-GTH, von 118 kDa für Gus-GTH und 120 kDa für Sp-Gus-GTH sind rechts neben der Abbildung angegeben.

Um Transformanten mit einer korrekten Insertion des jeweiligen Plasmids zu identifizieren, wurde genomische DNA (gDNA) mit *Bam*HI hydrolysiert und mittels Southern Blot-Analyse untersucht. Der in Abbildung 2.1 C gezeigte Southern Blot zeigt beispielhaft für AB33 Gus-GTH Transformanten, welche Insertionsarten auftreten können und welche DNA-Fragmente dabei durch eine zum *ip*-Locus homologe DNA-Sonde detektiert werden. Für die Einzelinsertion erhält man zwei DNA-Fragmente mit 4,7 und 9,6 kb. Bei einer Doppel- oder Mehrfachinsertion tritt zusätzlich ein 8,7 kb Fragment auf, die der Plasmidgröße entspricht. Doppel- und Mehrfachinsertionen lassen sich dadurch unterscheiden, dass die 8,7 kb Bande bei Mehrfachinsertionen stärker als die beiden anderen Banden ist, wohingegen bei doppelter Insertion alle Banden gleiche Intensitäten aufweisen. Bei Mehrfachinsertionen hätte man durch serielle Verdünnungen die Möglichkeit, die Anzahl der inserierten Genkassetten genauer zu ermitteln (Gellissen *et al.*, 1992). Im gezeigten Fall ist das Plasmid bei zwei der zwölf Transformanten (3 und 4) einmal und bei vier Transformanten (5, 9, 10 und 11) doppelt inseriert worden. Um eine vergleichbare Expression der Gus-Fusionsproteine zu gewährleisten, wurden nur die Stämme verwendet, die eine Einzelinsertion trugen. Für eine biotechnologische Anwendung des Systems können multiple Insertionen hingegen interessant sein, da die Expression der entsprechenden Zielgene erhöht wird. Wie Abbildung 2.1 C zeigt, treten neben den gewünschten Insertionen auch ektopische Insertionen auf, die man dadurch identifizieren kann, dass neben der für den nativen Locus erwarteten Bande von 5,6 kb weitere, unerwartete Banden auftreten. Carboxin-resistente Transformanten, bei denen in der Southern Blot-Analyse aber nur diese Bande von 5,6 kb auftritt, lassen sich durch Genkonversion im *ip*-Locus erklären.

Um die Expression der einfach inserierten Gus-Reporterkonstrukte nachzuweisen, wurden Zellextrakte mittels Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 2.1 D). Nach Ermittlung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Bestimmung wurden identische Proteinmengen von 10 µg auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Bestätigt wurde dies im Anschluss an die immunologische Detektion durch Färbung der Membran mit Coomassie Blau. Der in Abbil-

dung 2.1 D dargestellte Blot zeigt, dass alle Fusionsproteine in voller Länge produziert werden. Die Proteinbanden laufen dabei für alle Proteine etwas höher als erwartet. Die beiden Gus-Fusionsproteine mit N- und C-terminalem Cts1 (Spur 2 und 3) sollten theoretisch ein Molekulargewicht von 173 kDa aufweisen. Die Proteinvariante Cts1-Gus-GTH scheint auf dem Western Blot höher zu laufen als Gus-Cts1-GTH. Dieses ist jedoch vermutlich auf die unterschiedliche Proteinmenge zurückzuführen, da die Gus-Cts1-GTH Bande deutlich schwächer ist. Im Einklang mit dieser Vermutung konnte in weiteren Western Blot-Analysen mit verschiedenen Cts1-Gus-GTH Zellextrakt-Verdünnungen gezeigt werden, dass die Banden bei gleicher Stärke (1:8 Verdünnung von Cts1-Gus Zellextrakten) auf einem Niveau liegen (Ergebnisse nicht gezeigt). Gus-GTH und Sp-Gus-GTH haben rechnerisch Molekulargewichte von 118 und 120 kDa. Berücksichtigt man die Abspaltung des Signalpeptids so sollten diese beiden Proteine identische Molekulargewichte von 118 kDa besitzen. In der Western Blot-Analyse scheint jedoch, zumindest ein Teil der Sp-Gus-GTH Proteinvariante höher zu laufen als Gus-GTH. Dieses könnte man auf die erwartete *N*-Glykosylierung der, über den konventionellen Sekretionsweg sekretierten SP-Gus-GTH Variante zurückführen. Andererseits konnten durch enzymatische Deglykosylierung der vier Gus-Fusionsproteine durch die Behandlung entsprechender Zellextrakte mit PNGase F und anschließender Western Blot-Analyse keine *N*-Glykosylierungen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es sich bei der höher laufenden Bande um teilweise cytoplasmatisch translatiertes SP-Gus-GTH handelt, bei dem das Signalpeptid nicht abgespalten wurde. Bis auf die schwächere Gus-Cts1-GTH Bande sind die Stärken der anderen Banden vergleichbar, was zeigt, dass nur Gus-Cts1-GTH in geringerer Konzentration in Zellextrakten vorhanden zu sein scheint. Bei den Zellextrakten vom AB33 Ausgangsstamm (Abb. 2.1 D, Spur 1) konnte nur eine schwache, unspezifische Bande durch den Gus-Antikörper detektiert werden. Dieses zeigt, dass dieser polyklonale Antikörper zur Detektion von Gus in *U. maydis* genutzt werden kann. Insgesamt bestätigen die Ergebnisse, dass die erstellten Reporterstämme zur Analyse der unkonventionellen Sekretion von Cts1 geeignet sind.

2.1.1.2 Analyse der Gus-Aktivitäten der Reporterstämme

Um die Gus-Aktivitäten der verschiedenen Reporterstämme zu untersuchen, wurde sowohl das chromogene Substrat X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure) als auch das sensitivere, fluorogene Substrat MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Hydrat) verwendet. Zunächst wurden Plattentests mit Sporidien unter Verwendung beider Substrate durchgeführt. In dem MUG-Plattentest (Abb. 2.2 A, links) zeigte sich, dass nur die beiden Stämme Fluoreszenz aufwiesen, die Gus mit N- bzw. C-terminal fusioniertem Cts1 exprimierten. AB33 und dessen Derivate mit cytoplasmatischem sowie konventionell sekretiertem Gus zeigten hingegen keine Aktivität. Bei diesem Test war es allerdings nicht möglich zu unter-

scheiden, ob die zugrunde liegende Aktivität durch die Zellen selber oder durch sekretiertes Gus zu erklären war. Bei dem Plattentest mit dem chromogenen Substrat (Abb. 2.2 A, Mitte links) waren Gus-Aktivitäten dagegen im Festmedium außerhalb der Zellen nachzuweisen. Dies deutete darauf hin, dass die entsprechenden Fusionsproteine sekretiert werden. Die Kolonien selber färbten sich nicht blau. Es zeigte sich, dass der Gus-Cts1 Stamm das umgebende Medium deutlich stärker blau färbte als der Cts1-Gus Stamm. Dieses war bereits ein Hinweis darauf, dass Gus-Cts1 möglicherweise besser ins Medium sekretiert wird als Cts1-Gus. Weiter bestätigt wurde diese Vermutung durch einen Membran-Assay (Abb. 2.2 A, rechts). Hierzu wurden auf einer Complete-Medium (CM)-Platte gewachsene Zellen mittels einer aufgelegten Membran vom Medium abgezogen, wodurch die Aktivität auf der Zelloberfläche nach Zugabe des X-Gluc-Substrats und einstündiger Inkubation bei 37 °C analysiert werden konnte. Wie der Membran-Assay zeigte (Abb. 2.2 A, Mitte rechts) war das Ergebnis genau gegensätzlich zum X-Gluc-Platten-Assay. Hier war folglich nur für den Stamm Aktivität festzustellen, der Cts1-Gus exprimiert. Der zweite Teil des Membran-Assays (Abb. 2.2 A, rechts) diente dazu, die generelle Aktivität aller Gus-Fusionsproteine nachzuweisen. Hierzu wurden die Zellen durch Behandlung der Membran mit flüssigem Stickstoff lysiert. Nach weiterer Inkubation bei 37 °C wiesen alle Gus-Fusionsproteine exprimierenden Stämme eine blaue Färbung auf, was die Funktionalität von Gus in allen vier Reporterstämmen bestätigt. Insgesamt deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass N-terminale Gus-Fusionen an Cts1 dazu führen, dass ein entsprechendes Protein ins Medium abgegeben wird, wohingegen eine C-terminale Fusion von Gus an Cts1 hauptsächlich auf der Zelloberfläche verbleibt. Die Zellwandassoziation scheint bei der N-terminalen Gus-Cts1 Fusion abgeschwächt oder vermindert zu werden. Beide Versionen werden jedoch sekretiert und sind aktiv, was auf einen unkonventionellen Sekretionsmechanismus hindeutet. Die zwei Kontrollstämmen verhalten sich wie erwartet und zeigen keine Sekretion von aktivem Gus, obwohl das Enzym in beiden Fällen intrazellulär funktional ist.

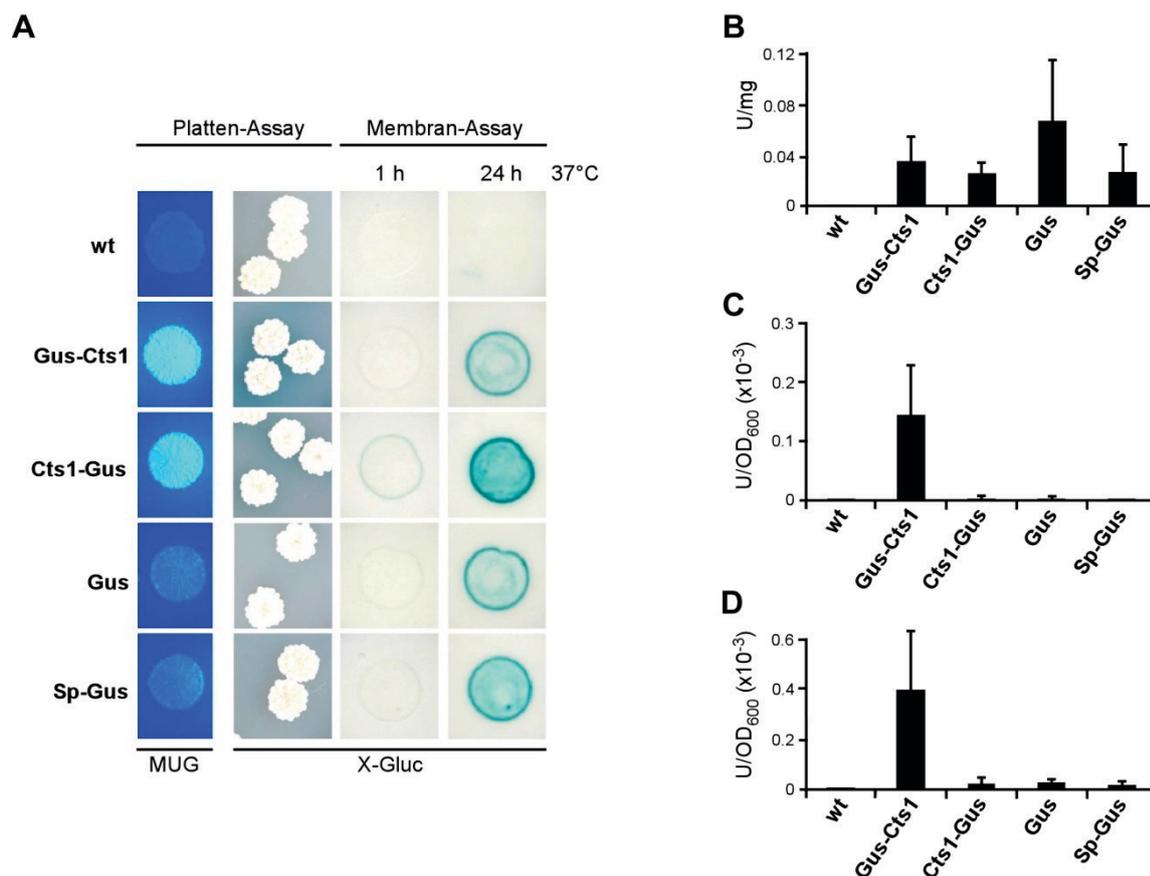


Abbildung 2.2: Untersuchung der Sekretion von Cts1 mittels Gus-Reporterstämmen

(A) Analyse von Gus-Aktivitäten der Reporterstämmen durch Platten- und Membran-Assays. Verwendet wurden das fluorogene Substrat MUG und das chromogene Substrat X-Gluc. Links sind Platten-Assays mit den jeweiligen Substraten gezeigt. Für den Platten-Assay mit dem Substrat MUG wurden jeweils 10 μ l Kultur (OD_{600} 1) aufgetropft und die Platten für zwei Tage bei 28 $^{\circ}$ C inkubiert. Die Umsetzung des Substrats wurde durch Fluoreszenz unter UV-Licht sichtbar. Bei dem Platten-Assay mit dem X-Gluc-Substrat sind die Aktivitäten von Einzelkolonien nach drei Tagen Inkubation bei 28 $^{\circ}$ C zu sehen. Hier wird die Gus-Aktivität durch Blaufärbung des umgebenden CM-Festmediums sichtbar. Für den Membran-Assay (rechts) wurden 10 μ l von CM-Kulturen (OD_{600} 1) auf CM-Platten getropft, getrocknet und eine Nitrozellulosemembran aufgelegt. Nach 12-stündiger Inkubation bei 28 $^{\circ}$ C wurde die Membran mit den Zellen abgezogen und mit dem Substrat versetzt. Blaufärbung der Zellen zeigt die Gus-Aktivitäten an. Dargestellt sind die Aktivität nach einstündiger Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C und die Aktivität nach Zellaufschluss durch flüssigen Stickstoff mit anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37 $^{\circ}$ C. Die Tests wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. **(B)** Analyse der Gus-Aktivität in Zellextrakten von Sporidien der Reporterstämmen. MUG diente als Substrat. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen. **(C)** Analyse der Gus-Aktivität in zellfreien Überständen von Sporidien der Reporterstämmen. MUG diente als Substrat. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von sieben unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen. **(D)** Analyse der Gus-Aktivität in zellfreien Überständen von Filamenten der Reporterstämmen. MUG diente als Substrat. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von sechs unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen.

Um eine quantitative Analyse der unkonventionellen Sekretion von Cts1 in Flüssigkulturen durchführen zu können und die Ergebnisse der Platten- und Membran-Assays zu bestätigen, wurde ein fluorimetrischer Test mit dem Substrat MUG angewendet. Zusätzlich sollte durch die folgende Analyse die Sekretion nicht nur während des hefeartigen sondern auch während des filamentösen Wachstums untersucht werden. Das filamentöse Wachstum wurde in Koepke *et al.*, (2011) als das relevante Stadium für die Cts1 Sekretion beschrieben. Es wurden die zuvor beschriebenen Stämme verwendet, in denen die unterschiedlichen Gus-Fusionsproteine konstitutiv exprimiert werden. Für die Messungen wurden zu verschiedenen

Zeitpunkten Proben von den Reaktionsansätzen entnommen und die Umsetzung des Substrates MUG zum fluoreszenten Produkt 4-Methylumbelliferyl (MU) bestimmt. Über die Erstellung einer Standardgeraden mit definierten Konzentrationen des Produktes MU konnten schließlich Enzymaktivitäten in Units ($\mu\text{mol MU}/\text{min}$) ermittelt werden. Die Enzymaktivitäten wurden auf gemessene Proteinkonzentrationen (mg) oder auf die Zelldichten (OD_{600}) bezogen.

Zunächst wurden Zellextrakte von Sporidien der entsprechenden Stämme analysiert, um die intrazellulären Gus-Aktivitäten der nachweislich produzierten (Abb. 2.1 D) und aktiven (Abb. 2.2 A, rechts) Gus-Fusionsproteine vergleichen zu können (Abb. 2.3 B). Es zeigte sich, dass alle Varianten Aktivitäten aufweisen, was das Ergebnis des Membranassays mit lysierten Zellen bestätigt (Abb. 2.2 A). Allerdings unterscheiden sich die Gus-Aktivitäten der jeweiligen Fusionsproteine in der quantifizierenden Messung geringfügig. Diese Unterschiede scheinen größtenteils nicht durch Proteinkonzentrations-Unterschiede erklärbar zu sein, denn wie die Western Blot-Analyse (Abb. 2.1 D) verdeutlicht, war nur das Gus-Cts1-GTH Fusionsprotein in geringeren Konzentrationen in Zellextrakten vorhanden als die anderen Fusionsproteine. Für dieses Fusionsprotein kann man also im Vergleich eine höhere intrinsische Gus-Aktivität annehmen als im Gus-Assay mit Zellextrakten (Abb. 2.3 B) ermittelt wurde. Die Aktivitätsunterschiede der anderen Gus-Fusionsproteine sind womöglich eher auf die unterschiedliche Architektur der Proteine zurückzuführen. So ist es nachvollziehbar, dass Gus-GTH eine höhere intrinsische Aktivität besitzt als Cts1-Gus-GTH. Da beim letzteren Protein Gus sowohl N- als auch C-terminal fusioniert wurde, könnte die Aktivität deutlich beeinträchtigt werden. In Zellextrakten mit konventionell sekretiertem Gus-GTH (Sp-Gus-GTH) hätte man dagegen eine deutlich geringere Aktivität erwartet. Einerseits sollte sich die Proteinstruktur hier zwar nicht von der Struktur des cytoplasmatischen Gus-GTH unterscheiden und somit eine hohe Aktivität aufweisen. Andererseits müsste die während der konventionellen Sekretion angehängte *N*-Glykosylierung die Gus-Aktivität weitestgehend unterbinden. Eine mögliche Erklärung für die dennoch beobachtete Aktivität könnte sein, dass z. B. aufgrund der stark konstitutiven Promotoraktivität ein Teil der entsprechenden mRNA nicht, wie zu erwarten, am rauen ER sondern im Cytoplasma translatiert wird. Dies wird durch das Ergebnis des Western Blots (Abb. 2.1 C) unterstützt, in dem ein Teil des Proteins unprozessiert vorzuliegen scheint. Die fehlende Gus-Aktivität in Zellextrakten des AB33-Ausgangstammes bestätigt, dass es keinerlei Hintergrundaktivität aufgrund von endogenen Glucuronidasen gibt.

Zur Analyse von Gus-Aktivitäten in zellfreien Kulturüberständen wurden gleiche Zellmengen von in CM-Medium angezogenen Sporidien über sechs Stunden in CM-Vollmedium bzw. NM-Minimalmedium kultiviert. Während sich die in CM-Vollmedium kultivierten Sporidien weiter durch Knospung teilen, geht mit der Induktion des filamentösen Wachstums ein Zellzyklusarrest einher. Induziert wird das filamentösen Wachstums durch den Wechsel von CM-

Vollmedium zu NM-Medium, da dies einen Austausch der Stickstoffquelle mit sich bringt. Nach der sechsstündigen Kultivierung in NM-Minimalmedium erhält man so Filamente (vgl. Abb. 1.2). Sowohl in den Überständen von hefeartig wachsenden Kulturen (Abb. 2.2 C) als auch in Überständen von filamentös wachsenden Kulturen (Abb. 2.2 B) konnten nur für den Gus-Cts1-GTH exprimierenden Stamm Gus-Aktivitäten gemessen werden. Die Stämme, welche das Cts1-Gus-GTH Fusionsprotein bzw. das cytoplasmatische Gus-GTH produzierten, wiesen in CM- und NM-Überständen nur Hintergrundaktivitäten auf, welche sich vermutlich durch einen geringen Anteil an lysierten Zellen erklären lassen. Bei dem Stamm, der das konventionell sekretierte Sp-Gus-GTH produzierte, war wie zu erwarten auch keine Aktivität in den Überständen zu messen, da das sekretierte Gus hier aufgrund der erfolgten N-Glykosylierung inaktiv sein sollte. Die Flüssigtests bestätigen somit die Ergebnisse der Platten- und Membrantests (Abb. 2.2 A). So unterstützte diese Studie nochmals die Hypothese, dass bei einem Fusionsprotein aus Gus und Cts1 nur eine N-terminale Fusion von Gus an Cts1 zur Sekretion ins Medium führt.

Bei C-terminaler Fusion von Gus an Cts1 scheint das Protein hingegen mit der Zelloberfläche, möglicherweise der Zellwand, assoziiert zu bleiben. Im direkten Vergleich der in CM- und NM-Überständen gemessenen Werte des AB33Gus-Cts1-GTH Stammes liegt der Wert bei filamentösem Wachstum mit $0,4 \text{ U/OD}_{600}$ mehr als 2,5-mal höher als der Wert bei Überständen von Sporidien ($0,15 \text{ U/OD}_{600}$). Aus diesem Vergleich kann man jedoch nicht die Schlussfolgerung ziehen, dass während des filamentösen Wachstums mehr Protein sekretiert wird. Die beiden Messwerte sind nicht direkt miteinander vergleichbar, da die Zellen beim filamentösen Wachstum in einen Zellzyklusarrest gehen und nur in ihrer Länge wachsen. Die Sporidien haben sich jedoch während der Kultivierung weiterhin geteilt, wodurch auch die Zelldichten anstiegen. Um zu überprüfen, ob die veränderte Zellmorphologie der Filamente einen Einfluss auf die optische Dichte der Kultur hat oder ob man über die optische Dichte direkt auf die Zellmasse schließen kann, wurde von hefeartig und filamentös wachsenden Kulturen, die mit gleicher Zellzahl gestartet wurden, die Entwicklung der optischen Dichte und der Trockenzellmasse bestimmt (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde deutlich, dass Anstieg von Trockenzellmasse und der optischen Dichte weitestgehend proportional sind. Folglich kann man die optische Dichte auch im Vergleich von Sporidien und Filamenten als Maß für die Trockenzellmasse interpretieren. Durch den Bezug der Gus-Enzymaktivitäten auf die optische Dichte der Kulturen (U/OD_{600}) werden die gemessenen Werte zwar angeglichen, sie sind aber dennoch nicht direkt miteinander zu vergleichen, da der Anstieg der OD_{600} während des hefeartigen Wachstums nicht einberechnet wird. Berücksichtigt man dieses lässt sich vermuten, dass die Sekretionseffizienz während des filamentösen Wachstums nicht wesentlich besser ist, als während des hefeartigen Wachstums.

2.1.2 Identifizierung von Signalen für die unkonventionelle Sekretion von Cts1

Konventionell und unkonventionell sekretierte Proteine lassen sich in der Regel relativ einfach dadurch unterscheiden, dass konventionell sekretierte Proteine ein N-terminales Signalpeptid besitzen, das sich leicht durch bioinformatische Analysen (z.B. SignalP) der Aminosäuresequenz identifizieren lässt. Wie bereits erwähnt konnte für die Endochitinase Cts1 in bioinformatischen Sequenzanalysen kein N-terminales Signalpeptid identifiziert werden (SignalP). Weiterhin zeigte das in dieser Arbeit angewendete Gus-Reportersystem, dass ein Gus-Cts1 Fusionsprotein im Gegensatz zu konventionell sekretiertem Gus nicht N-glykosyliert und somit nicht über den konventionellen ER-Golgi-Sekretionsweg exportiert wird. Im Folgenden wurde Cts1 in Bezug auf eventuell vorhandene untypische Sekretionssignale genauer untersucht.

2.1.2.1 Bioinformatische Analyse von Cts1

Um nach wichtigen funktionellen Domänen in Proteinen zu suchen, kann es von Vorteil sein, die entsprechende Aminosäuresequenz mit Sequenzen nahverwandter Proteine zu vergleichen (Doehlemann *et al.*, 2009, Feldbrügge *et al.*, 2013). Für Cts1 aus *U. maydis* wurden hier die orthologen Chitinasen aus den nahen Verwandten *Sporisorium relianum* (Sr15153, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/sporisorium>) und *Ustilago hordei* (UHOR_06394, <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/MUHDB/>) herangezogen. Diese Sequenzanalyse ist in Abbildung 2.3 A dargestellt. Chitinasen der relativ heterogenen Glykosid-Hydrolase-Familie 18, zu denen auch die Endochitinase Cts1 gehört, können strukturell häufig in Signalpeptid, katalytische Domänen (Glyco_18-Domänen), Chitin-Bindedomänen und in Serin/Threonin-reiche Verbindungssequenzen unterteilt werden, die nicht selten auch mehrfach und/oder in Kombination auftreten (Huang *et al.*, 2012b). Im Einklang mit der in dieser Arbeit nachgewiesenen unkonventionellen Sekretionsweise kann für Cts1 bioinformatisch kein N-terminales Signalpeptid für die konventionelle Sekretion ermittelt werden. Dagegen wird die Verwendung eines unkonventionellen Sekretionsmechanismus aber durch Vorhersagen des Programms 'SecretomeP 2.0' unterstützt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>). In den bioinformatischen Analysen wurden außerdem keine Chitin-Binde-Domäne und nur eine Glyco_18-Domäne gefunden (Koepeke *et al.*, 2011). Die katalytischen Glyco_18-Domänen weisen über unterschiedliche Reiche (von *S. cerevisiae* bis *Homo sapiens*) eine hohe Konservierung auf (Huang *et al.*, 2012). Innerhalb dieser Domäne befindet sich das aktive Zentrum, welches die Aminosäureabfolge DxDxE mit dem katalytisch wichtigen Glutamat-Rest aufweist (Abb. 2.3 A, rot umrandet) (Fusetti *et al.*, 2002). Außerhalb der Glyco_18-Domäne gibt es einen 47 Aminosäuren langen C-terminalen Teil, der ebenfalls hoch konserviert ist. Diesem konservierten C-Terminus konnte jedoch bioinformatisch keine potentielle Funktion zugewiesen werden. Weiterhin existiert ein 113 Aminosäuren langer N-terminaler Teil. Dieser N-Terminus ist bis zur 42-ten Aminosäure konser-

viert, wonach jedoch ein relativ variabler Teil (AS 42-103) folgt. Dieser variable Bereich besitzt viele Serine und Threonine, die phosphoryliert werden können (Yaffe & Elia, 2001). Innerhalb der variablen Serin/Threonin-reichen Region konnte außerdem ein PEST-Motiv für die Aminosäuren 34 bis 104 vorhergesagt werden (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>). Diese Prolin- (P), Glutamat- (E), Serin- (S) und Threonin- (T) reichen Sequenzen wurden auch in anderen Chitinasen gefunden und könnten als ein proteolytisches Signal fungieren oder zur Ubiquitinierung benötigt werden (Rechsteiner & Rogers, 1996, Pan *et al.*, 2012, Roth & Davis, 2000). Die ersten 40 Aminosäuren der verglichenen Chitinasen erscheinen bei der Suche nach einem Signal oder einer Domäne für die unkonventionelle Sekretion besonders interessant. Bioinformatisch lässt sich für diese ersten 40 Aminosäuren ein Twin-Arginin-Translokationspeptid vorhersagen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>) welches in Bakterien den Export von gefalteten Proteinen über die Membran ermöglicht (Müller, 2005). Einerseits ist diese durch die variable S/T-reiche Region von der Glyco_18-Domäne isolierte Sequenz in dem hier gezeigten Sequenzvergleich hoch konserviert (Abb. 2.3 A). Andererseits zeigt eine Suche nach weiteren homologen Chitinasen (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), dass diese Konservierung nur noch für zwei weitere Brandpilze (*Pseudozyma hubeiensis* und *P. antarctica*) zu finden ist. Dieses deutet bereits darauf hin, dass diese Domäne möglicherweise für die Sekretion benötigt, für die chitinolytische Aktivität jedoch entbehrlich sein könnte.

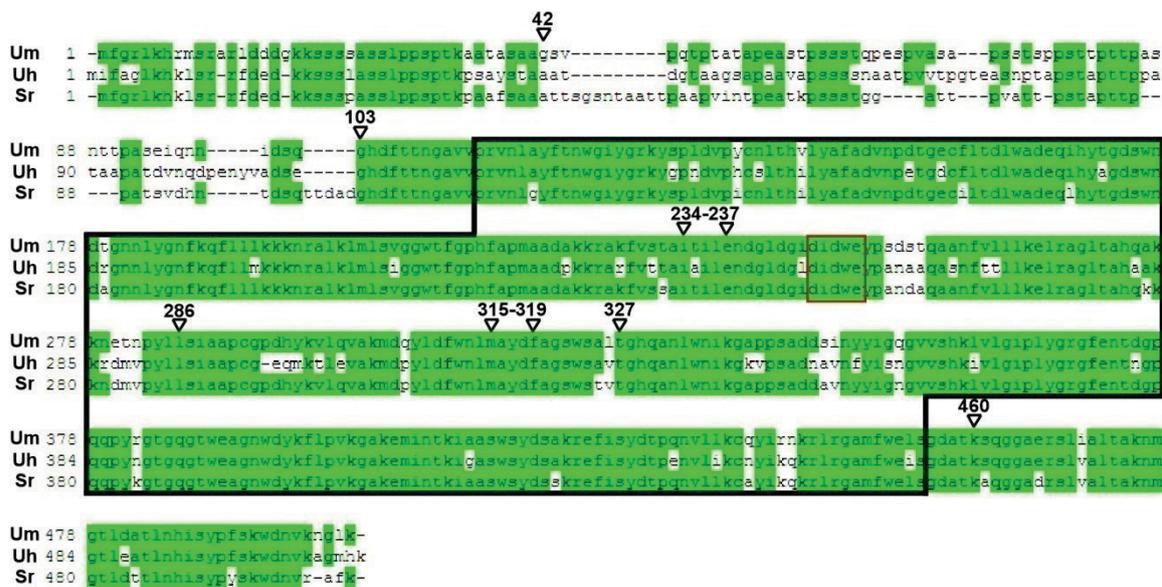
2.1.2.2 Untersuchung verkürzter Cts1-Varianten im Gus-Reportersystem

Um die Funktionen der verschiedenen Sequenzabschnitte in Cts1 in Bezug auf die Sekretion näher untersuchen zu können, wurden Stämme generiert und analysiert, die Gus-Cts1-Fusionsproteine mit verkürzten Cts1-Varianten produzierten. Die Anwendung des etablierten Gus-Reportersystems hat dabei den Vorteil, dass die Sekretionseffizienz leicht über die Messung der Gus-Aktivität in Zellextrakten und Überständen ermittelt werden kann. Die verschiedenen Gus-Cts1-Fusionskonstrukte mit verkürzten Cts1-Varianten sind schematisch in Abbildung 2.3 B dargestellt.

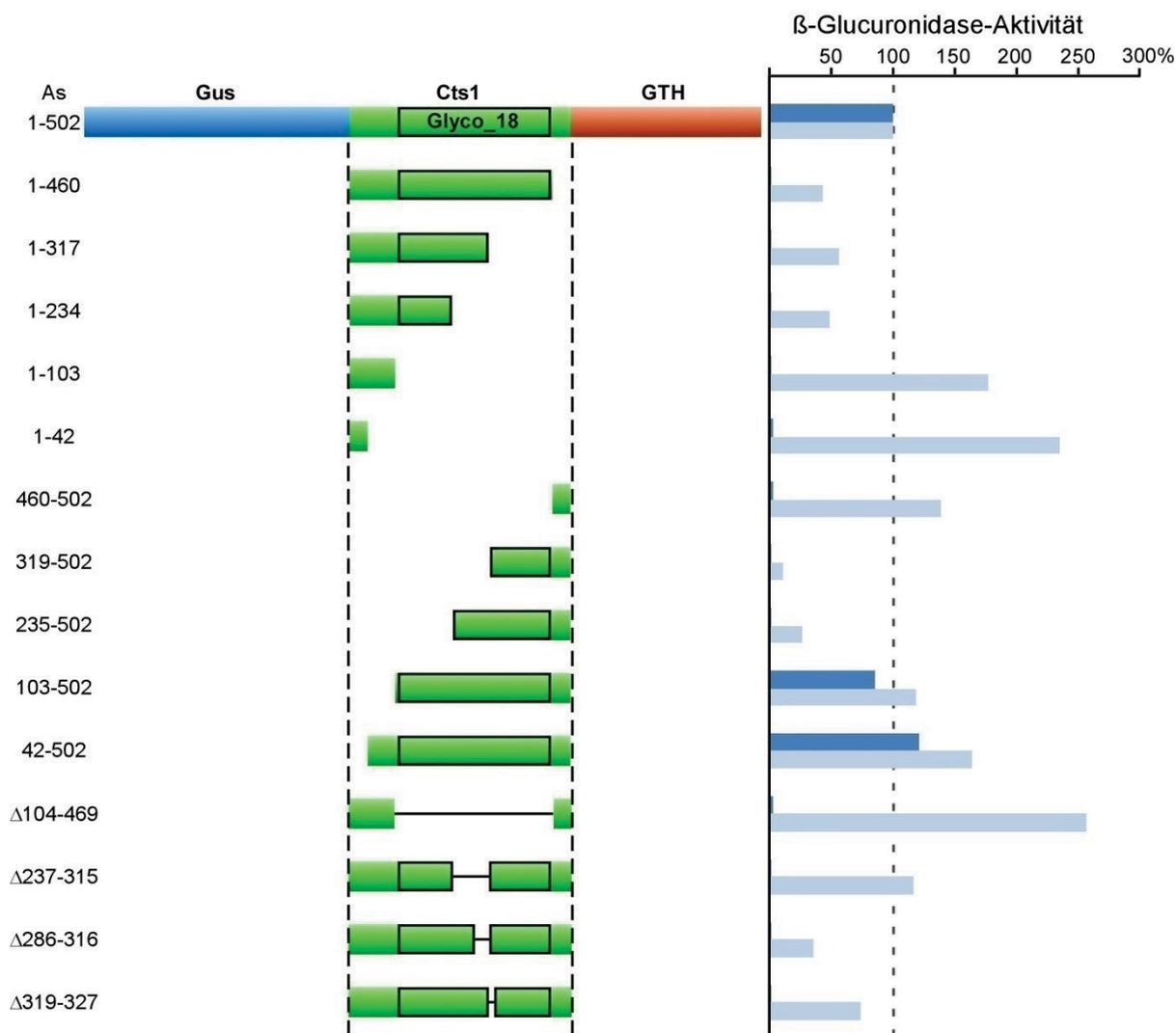
Bei den Cts1-Varianten handelte es sich zunächst einmal um fünf N-terminale und die dazu entsprechend gegensätzlichen fünf C-terminalen Verkürzungen von Cts1, die an der Sequenzhomologie der drei orthologen Chitinasen orientiert waren. Weiter wurde eine Variante mit vollständig entfernter Glyco_18-Domäne erstellt. Zusätzlich wurden drei Varianten mit 79, 31 bzw. 9 deletierten konservierten Aminosäuren innerhalb der Glyco_18-Domäne hergestellt. Die letzteren Varianten wurden nicht sequenzspezifisch erstellt, sondern aufgrund der dort befindlichen Restriktionsschnittstellen und dem damit geringen Klonierungsaufwand und sollten zur Aufklärung der Rolle der Glyco_18-Domäne bei der Sekretion von Cts1 beitragen. Zunächst wurde die Produktion der verschiedenen Fusionsproteine durch eine Western Blot-Analyse von entsprechenden Zellextrakten bestätigt (Abb. 2.3 C). Um zu analysieren, ob und

wie effizient die verschiedenen Gus-Cts1-Fusionsproteine sekretiert werden, wurden die Gus-Aktivitäten in Zellextrakten und Überständen von Sporidien gemessen. In dem gezeigten Balkendiagramm (Abb. 2.3 B, rechts) sind die Aktivitäten jeweils in Relation zu den Aktivitäten des Vollängenproteins dargestellt. Die zentrale Erkenntnis aus diesen Analysen war, dass der N-Terminus von Cts1 (AS 1-102) nicht für die Sekretion von Cts1 benötigt wird. Sowohl die Variante mit Cts1⁴²⁻⁵⁰² als auch Cts1¹⁰³⁻⁵⁰² wiesen in Kulturüberständen vergleichbare Aktivitäten zu denen des Vollängenproteins auf. Im Gegensatz dazu scheinen alle anderen Cts1-Varianten die Sekretion nicht zu ermöglichen. Die Gus-Aktivitätsmessungen in Zellextrakten zeigten, dass zwar alle Fusionsproteine Aktivität aufwiesen, sich diese jedoch teilweise stark unterschieden. Auffällig war dabei, dass gerade die Aktivitäten der Fusionsproteine mit sehr kurzen Cts1-Sequenzen besonders hoch waren. Dieses passt dazu, dass auch cytoplasmatisches Gus deutlich aktiver war als die Fusionen mit Cts1 (Abb. 2.2 B). Somit scheint die Gus-Aktivität bei diesen Proteinen nicht so stark durch die Struktur des Gesamtproteins gestört zu sein, wie es möglicherweise bei Fusionen mit längeren Cts1-Sequenzen der Fall ist. Wie die Western Blot-Analyse zeigt, könnten auch erhöhte Proteinkonzentrationen eine Erklärung für die hohen Aktivitäten der kürzeren Fusionsproteine sein.

A



B



C

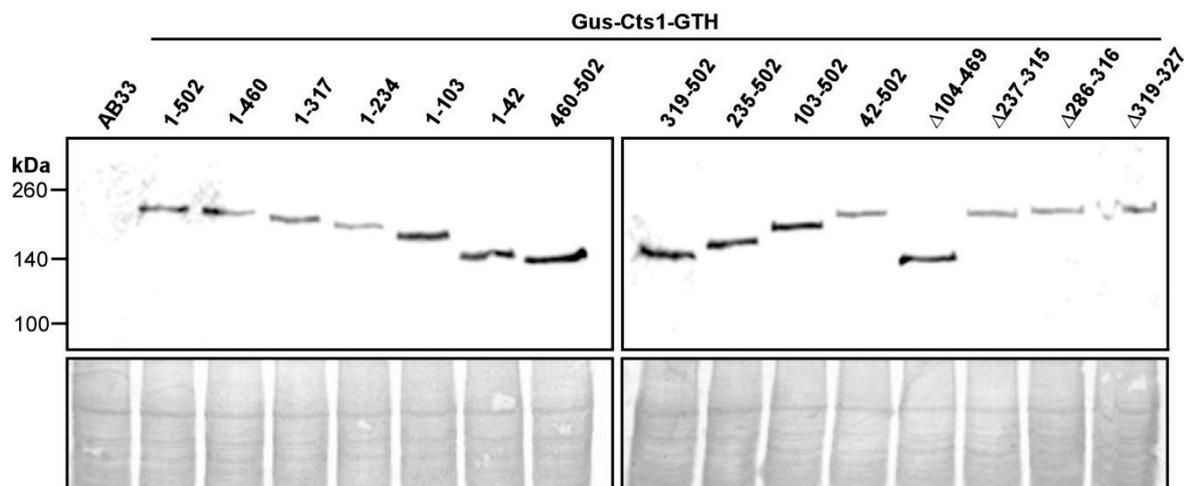


Abbildung 2.3 : Analyse der Sekretion von verkürzten Cts1-Varianten mit Hilfe des Gus-Reportersystems

(A) Aminosäuresequenzvergleich der Endochitinase Cts1 aus *Ustilago maydis* (Um) mit orthologen Chitinasen aus *Ustilago hordei* (Uh) und *Sporosorium relianum* (Sr). Homologe Aminosäuren sind grün hinterlegt. Die für Chitinasen der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 typische Glyco_18-Domäne ist durch eine schwarze Umrandung markiert. Die essentiellen Aminosäuren der katalytische Domäne (DxDxE) sind von einem roten Kasten umrandet. Pfeile und dazugehörige Aminosäurepositionen dienen der Verdeutlichung der in Abbildungsteil B dargestellten Cts1-Verkürzungen. (B) Gus-Cts1-GTH Fusionsproteine mit verkürzten Cts1-Varianten und die Gus-Aktivitäten der entsprechenden Stämme. Auf der linken Seite sind die Gus-Cts1-GTH-Varianten mit den unterschiedlichen Cts1-Verkürzungen schematisch dargestellt. Zusätzlich sind die in den Konstrukten vorhandenen bzw. deletierten Aminosäuren (As) angegeben. Auf der rechten Seite sind Gus-Aktivitäten in Zellextrakten (hellblau) und in Überständen (dunkelblau) von hefeartig wachsenden Kulturen vergleichend dargestellt. Für die Darstellung wurden die ermittelten Aktivitäten des Stammes mit Volllängenfusionsprotein (As 1-502) auf 100% gesetzt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. (C) Western Blot-Analyse von denaturierten Zellextrakten der Stämme, welche die Gus-Cts1-GTH-Proteine mit verkürzten Cts1-Varianten produzieren. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein auf ein 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Gfp-Antikörper verwendet (oben). Um gleiche Mengen an Gesamtprotein zu bestätigen, wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (unten).

Eine Besonderheit scheinen die beiden N-terminal verkürzten Fusionsproteine Gus-Cts1³¹⁹⁻⁵⁰²-GTH und Gus-Cts1²³⁵⁻⁵⁰²-GTH auszumachen. Beide Proteine wiesen lediglich sehr geringe intrazelluläre Gus-Aktivitäten auf. Auch wenn die Western Blot-Analyse (Abb. 2.3 C) eine normale Produktion der entsprechenden Proteine bestätigte, könnte trotzdem eine verringerte Proteinstabilität die reduzierten Aktivitäten zur Folge gehabt haben. So gelang der Nachweis der zwei Varianten nur in denaturierenden Proteinextrakten wohingegen in Western Blot-Analysen von nativen Zellextrakten ausschließlich diese beiden Fusionsproteine nicht detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Da auch die Gus-Aktivität in nativen Zellextrakten bestimmt wurde, könnte somit vermutet werden, dass die beiden besagten Proteine deutlich instabiler sind als die anderen Fusionsproteine.

Zusätzlich zu der Untersuchung der Gus-Aktivitäten in Zellextrakten und Überständen von hefeartig wachsenden Zelle wurden auch Überstände von filamentös wachsenden Kulturen analysiert (Daten nicht gezeigt). Mit Ausnahme eines Stammes, nämlich des Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH produzierenden Stammes, waren die Gus-Aktivitäten mit den Aktivitäten während des hefeartigen Wachstums vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Der Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH Stamm

wurde als Träger der kürzesten noch sekretierten Version sowie aufgrund dieser abweichenden Aktivitäten in Überständen von Sporidien und Filamenten näher charakterisiert.

Wie Abbildung 2.4 A nochmals aufzeigt, war die Gus-Aktivität des Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH Stammes in Überständen von hefeartig wachsenden Kulturen mit der Aktivität des Stammes, welcher das Volllängenprotein produziert, vergleichbar. In Überständen von filamentös wachsenden Kulturen war dies jedoch nicht der Fall (Abb. 2.4 B). Hier war die Aktivität im Überstand des Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH produzierenden Stammes um etwa 75% deutlich reduziert.

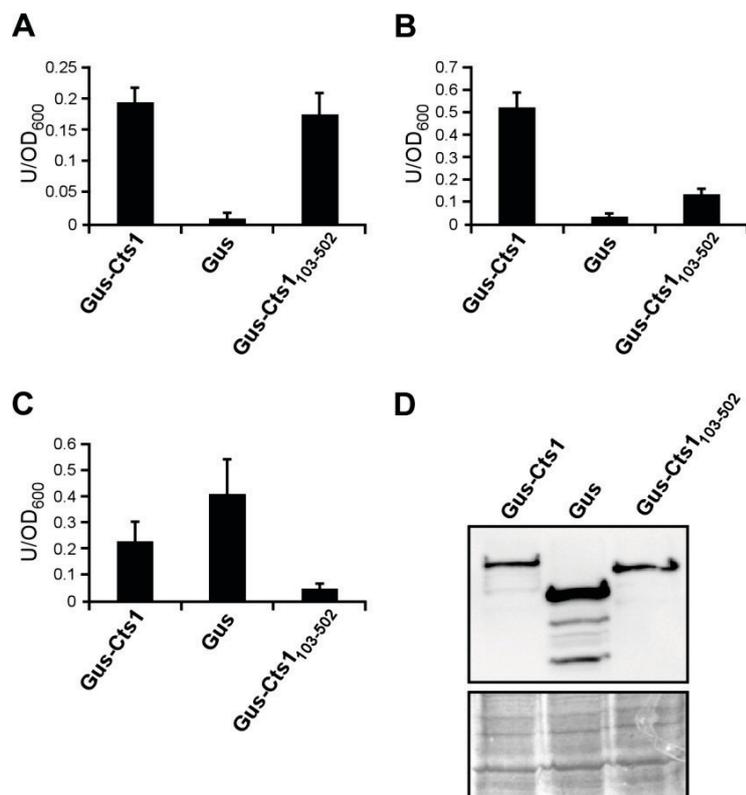


Abbildung 2.4: Bestimmung der Gus-Aktivität in Stämmen mit N-terminal verkürztem Cts1

(A-C) Gus-Aktivitätsassays in Überständen von: hefeartig wachsenden Kulturen (A), filamentös wachsenden Kulturen (B) und filamentös wachsenden Kulturen nach permeabilisierung der Zellmembran durch Digitonin. (C). MUG diente jeweils als Substrat. Die Diagramme zeigen Mittelwerte von jeweils drei unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen.

(D) Western Blot-Analyse von denaturierten Zellextrakten. Es wurden jeweils 10 µg Gesamtprotein auf ein 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Gfp-Antikörper verwendet (oben). Um gleiche Mengen an Gesamtprotein zu bestätigen, wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (unten).

Wie weiterführende Untersuchungen zeigten, war diese reduzierte Aktivität nicht auf eine verringerte Sekretion des Fusionsproteins zurückzuführen. So zeigten Analysen von filamentös wachsenden Kulturen nach Membranpermeabilisierung mit Digitonin (Abb. 2.4 C), dass auch die zugehörige cytoplasmatische Aktivität deutlich reduziert war. Die Western Blot-Analyse von Zellextrakten der Filamente in Abbildung 2.4 D belegt, dass die Proteinkonzentrationen von Volllängenprotein (Spur 1) und dem Gus-Cts1-Fusionsprotein mit deletiertem N-Terminus (Spur 2) vergleichbar waren. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die intrinsische Aktivität des Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH Fusionsproteins in Filamenten im Vergleich zu Sporidien reduziert ist. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Aktivität nicht doch auf eine geringere Proteinkonzentration zurückzuführen ist. Die in der Western Blot-Analyse untersuchten Zellextrakte der Filamente, waren nach einem Protokoll durchgeführt worden, bei dem die Proteine sofort denaturiert werden, um proteolytische Degradierung auszuschließen. Bei der Analyse der Gus-Aktivität bleiben die Fusionsproteine nach der

Membranpermeabilisierung durch Digitonin nativ im Überstand der Kultur, die dann mit dem Gus-Substratpuffer versetzt wird. Da die Aktivität hier jedoch über einen Zeitraum von 4,5 Stunden ermittelt wird, ist eine proteolytische Degradierung des Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH Fusionsproteins nicht auszuschließen. Um zu untersuchen ob der N-Terminus von Cts1 möglicherweise für die Assoziation mit Zellwandstrukturen verantwortlich ist, wurde auch ein Stamm hergestellt, der eine Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-Gus-GTH Variante produziert. X-Gluc-Platten- bzw. -Membranassays sowie Gus-Aktivitätsanalysen in Überständen deuteten darauf hin, dass diese Variante ebenso wie die entsprechende Vollängenvariante (Cts1-Gus-GTH) nach der Sekretion an der Zellwand assoziiert bleibt (Ergebnisse nicht gezeigt). Folglich scheint der N-Terminus nicht für die Assoziation mit der Zellwand benötigt zu werden. Zusammengefasst weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Cts1-Sekretion vermutlich nicht über eine klar definierte, kurze Signalsequenz in der Primärstruktur oder über ein Sekundärstruktur-Motiv vermittelt wird. Der N-Terminus von Cts1 wird für eine effiziente Sekretion und eine Assoziation mit der Zellwand nicht benötigt, könnte für Cts1 jedoch eine Funktion während des filamentösen Wachstums haben. Hierdurch könnte die Gus-Aktivität oder die Stabilität des Fusionsproteins verändert sein.

2.2 Entwicklung eines Expressionssystems in *U. maydis*

Die bisher erlangten Erkenntnisse über die Endochitinase Cts1 in *U. maydis* machen deutlich, dass der neu entdeckte unkonventionelle Sekretionsmechanismus ein großes Potential für biotechnologische Anwendungen haben könnte. Die Ergebnisse zeigen, dass heterologe Proteine über N-terminale Fusionen mit Cts1 in den Überstand sekretiert werden. Das wohl wichtigste Argument für ein solches Expressionssystem ist die Tatsache, dass die sekretierten Proteine unglykosyliert ausgeschleust werden. Gerade für pharmazeutisch genutzte Produkte können unpassende Glykosylierungen unerwünschte Effekte haben (Ballew & Gerngross, 2004, Al-Ghouleh, 2011), so dass sich ein derartiges System für die Herstellung dieser Proteine als preiswerte Alternative zur teuren Produktion Säugerzellen anbieten könnte.

2.2.1 Aufbau des Expressionssystems

Die Analysen der Cts1-Sekretion mit dem Gus-Reportersystem haben bewiesen, dass ein heterologes Protein wie Gus über den Cts1-Sekretionsmechanismus in den Überstand abgegeben werden kann. Eine Detektion oder Reinigung des Gus-Cts1-GTH Fusionsproteins aus dem Überstand blieb jedoch erfolglos. Bei der in Koepke *et al.* (2011) durchgeführte Proteomanalyse von Membranproteinen wurden keine dem N-Terminus von Cts1 zugehörigen Peptide in der massenspektroskopischen Analyse gefunden. Dies lässt die Vermutung zu, dass sekretiertes Cts1 während oder nach der Translokation aus der Zelle proteolytisch, am N-Terminus, gespalten werden könnte. Eine Detektion oder Affinitätsreinigung des Vollän-

genproteins wäre damit über den C-terminalen GTH-Tag nicht mehr möglich. Um dieses bei der Anwendung von Cts1 als Expressionssystem zu umgehen, wurde ein modifiziertes Insertionsplasmid entwickelt, bei dem ein neuer SHH-Tag bestehend aus einem STReP-Tag (IBA, Göttingen), drei HA-Tags (Hemagglutinin-Tag) und einem Decahistidin-Tag zwischen dem jeweiligen Produkt und Cts1 positioniert ist (Abb. 2.5 A). Dieser SHH-Tag sollte eine Affinitätsreinigung und Detektion des Produktes auch nach einer potentiellen proteolytischen Spaltung von Cts1 am N-Terminus ermöglichen. Die Strategie mit dem STReP- und dem His-Tag zwei verschiedene Affinitätstags einzubauen, kann dabei von Vorteil sein, da ein solcher Tag eine zweistufige Affinitätschromatographie des Proteins ermöglicht, so dass eine besonders hohe Reinheit erzielt werden kann ('tandemaffinitypurification'; Rigaut *et al.*, 1999). Um dieses neue Vektorsystem auch auf Funktionalität testen zu können, wurde als Zielprotein erneut das Reporterenzym Gus verwendet.

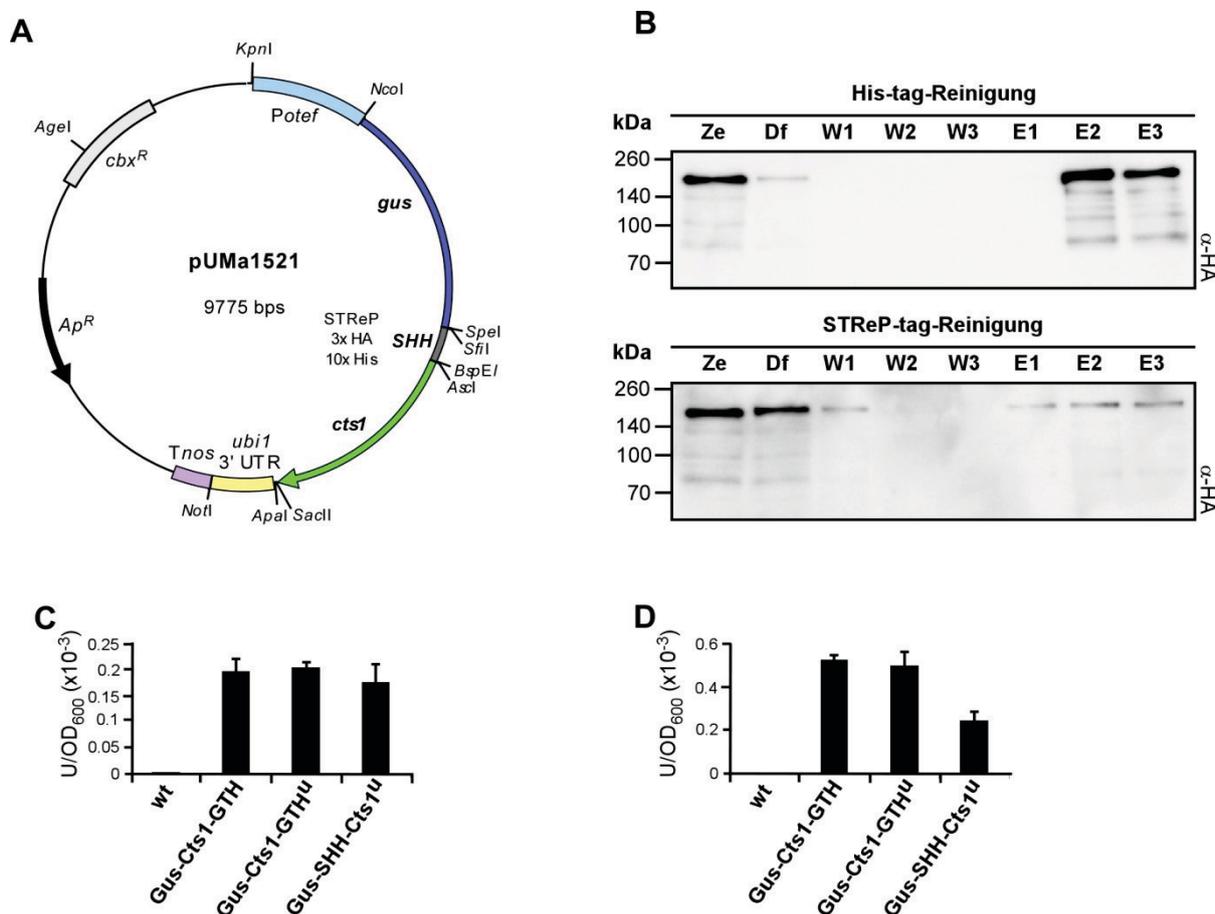


Abbildung 2.5: Aufbau und Funktionsanalyse eines modifizierten Insertionsvektor-Systems zur Sekretion heterologer Proteine

(A) Schematische Darstellung des modifizierten Insertionsvektors. Der Vektor besitzt neben einer Ampicillin- (Ap^R) und Carboxin-Resistenz (cbx^R) für die Selektion in *E. coli* bzw. die Insertion und Selektion in *U. maydis*, eine Expressionskassette für die Produktion des heterologen Cts1-Fusionsproteins. Die Expressionskassette besteht aus dem konstitutiven Promotor P_{otef} , der für das Fusionsprotein (hier: Gus-SHH-Cts1) kodierenden Sequenz, der 3' UTR der *ubi1*-mRNA und dem Transkriptions-Terminator T_{nos} . Das zu exprimierende Fusionsprotein ist aus der Sequenz des Produktes (hier zu Analyseziwecken *gus*), der Sequenz für einen SHH-Tag (bestehend aus einem STReP-Tag, drei HA-Tags und einem Deca-His-Tag) und der *cts1* Sequenz (vermittelt die Sekretion) zusammengesetzt. Die jeweils einmalig vorkommenden Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen dienen dem einfachen Austausch der jeweiligen Genkassetten. Zur Insertion in den *ip*-Locus wurde das Plasmid

über die *Agel*-Restriktionsschnittstelle linearisiert und in *U. maydis* transformiert. **(B)** Western Blot-Analysen von Reinigung des Gus-SHH-Cts1 Fusionsproteins aus Zellextrakten des entsprechenden Stammes. Das Protein wurde sowohl über den His-Tag als auch über den STReP-Tag aus Zellextrakten gereinigt, die aus einem Zellpellet einer 50 ml YL-Kultur (OD₆₀₀ 0,5) hergestellt wurde. Für die Western Blot-Analyse wurden jeweils 5 µl des Zellextrakts (Ze), des Durchflusses (Df), der Waschfraktionen (W1-3) und der Eluate (E1-3) auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Detektion erfolgte über den Anti-HA-Antikörper. **(C)** Gus-Aktivität im Überstand von hefeartig wachsenden AB33Gus-SHH-Cts1 Zellen. Als Kontrollen wurden auch Überstände des Vorläuferstamms AB33 (wt) und von Gus-Cts1-GTH exprimierenden Stämmen analysiert. Konstrukte mit angehängter *ubi1* 3'UTR wurden in der Beschriftung durch ein ^u gekennzeichnet. MUG diente als Substrat. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen. **(D)** Gus-Aktivität im Überstand von filamentös wachsenden Zellen der unter (C) beschriebenen Stämme. MUG diente als Substrat. Das Diagramm zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen.

Das neue Vektorsystems wurde so aufgebaut, dass die einzelnen Plasmidelemente möglichst einfach über einmalig vorhandene Restriktionsschnittstellen ausgetauscht oder neue Elemente, wie Proteaseschnittstellen oder weitere Affinitätstags, eingebracht werden können. Dabei wurden für den SHH-Tag die Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen *Sfill* und *Ascl* verwendet, um auch mit dem für *U. maydis* häufig genutzten *Sfil*-Klonierungssystem (Brachmann *et al.*, 2004) kompatibel zu sein. Um zu untersuchen, ob die Sekretion durch die Verstärkung eines möglichen *gus-shh-cts1* mRNA-Transport gesteigert werden kann, wurde dem *gus-shh-cts1* Transkript außerdem die 3'UTR von *ubi1* angehängt. Die *ubi1* mRNA gehört zu den durch Rrm4 am häufigsten transportierten mRNAs (Koepeke *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass die Transporteffizienz einer fremden mRNA durch die Fusion mit der CA-reichen 3'UTR von *ubi1*-mRNA erhöht werden kann (König *et al.*, 2009). Auch bei diesem Vektorsystem wurde die bereits beschriebene, über die Carboxin-Resistenz (*cbx^R*) vermittelte Insertionsmethode verwendet (siehe 2.1.1). Hierüber können die entsprechenden Plasmide gezielt in den ektopischen *ip*-Locus inseriert werden.

2.2.2 Funktionelle Analyse des Expressionssystems

Um die Funktionalität und die Effizienz des Expressionssystems testen zu können, wurde über die Transformation des in Abbildung 2.5 A dargestellten Insertionsplasmids ein AB33Gus-SHH-Cts1 Teststamm erstellt. Dieser exprimiert das Gus-SHH-Cts1 Fusionsprotein unter Kontrolle des konstitutiven Promotors P_{ofef}. Da die interne Position des SHH-Tags zwischen Gus und Cts1 seine Funktionalität beeinträchtigen könnte, wurde zunächst untersucht, ob eine Affinitätsreinigung des Fusionsproteins aus Zellextrakten möglich ist. Dazu wurde das Gus-SHH-Cts1 Fusionsprotein sowohl über den His-Tag als auch über den STReP-Tag aus Zellextrakten von Sporidien aufgereinigt. Die in Abbildung 2.5 B dargestellten Western Blot-Analysen der gewonnenen Fraktionen zeigten, dass die Affinitätsreinigung des Proteins generell über beide Affinitätstags möglich ist. Bei der Reinigung über den His-Tag scheint hier zwar deutlich mehr Protein angereichert worden zu sein, andererseits darf hier nicht übersehen werden, dass für die His-Reinigung eine Kombination aus Batch- und Säulen-Verfahren angewendet wurde, wohingegen die STReP-Reinigung über eine Säule

durchgeführt wurde. Bei einer Affinitätsreinigung aus größeren Volumen, wie beispielsweise aus Überständen, könnte das Ergebnis somit anders ausfallen.

Zur Untersuchung der Sekretion von Gus-SHH-Cts1 wurden zellfreie Überstände des entsprechenden Stammes auf Gus-Aktivität getestet. Um dabei Vergleiche zum vorher verwendeten Gus-Cts1-GTH Fusionsprotein anstellen und parallel die Auswirkung der an das Transkript angehängten 3'UTR von *ubi1* bewerten zu können, wurden auch Überstände von Stämmen analysiert, die das Gus-Cts1-GTH Fusionsprotein sowohl mit (Gus-Cts1-GTH), als auch ohne *ubi1* 3'UTR (Gus-Cts1-GTH^u) exprimieren. Die Abbildung 2.5 zeigt Gus-Aktivitäten in Überständen von hefeartig wachsenden Kulturen (C) und von filamentös wachsenden Kulturen (D). Für die beiden Stämme konnten sowohl in Überständen von Sporidien als auch in Überständen von Filamenten keine Aktivitätsunterschiede festgestellt werden. Dieses zeigt, dass ein Anhängen der *ubi1* 3'UTR an entsprechende mRNAs keinen Vorteil für die Sekretion der Fusionsproteine zu bringen scheint. Da jedoch nicht auszuschließen war, dass ein positiver Effekt der *ubi1* 3'UTR durch andere limitierende Faktoren des Sekretionsapparates, häufig als 'bottlenecks' bezeichnet, verdeckt wurden und dieses Element auch keine negativen Auswirkungen hatte, wurde die *ubi1* 3'UTR auch in den folgenden weiterentwickelten Expressionsplasmiden beibehalten. Vergleicht man die Gus-Aktivitäten in Überständen von Gus-Cts1-GTH und Gus-SHH-Cts1 Stämmen, so sind diese während des hefeartigen Wachstums auf dem gleichen Niveau. In Überständen von Filamenten war die Aktivität beim Gus-SHH-Cts1 Stamm dagegen um 50% reduziert. Analysen der cytoplasmatischen Gus-Aktivitäten (Daten nicht gezeigt) deckten jedoch auf, dass auch hier die intrinsische Gus-Aktivität des Fusionsproteins reduziert war, und die geringere Aktivität somit vermutlich nicht auf eine schlechtere Sekretion zurückzuführen war. Da für die Proteinproduktion aufgrund der einfacheren Handhabung zunächst hefeartig wachsende Zellen von größerem Interesse waren, bestätigen die Ergebnisse daher, dass das modifizierte Expressionssystem zu Produktion, Sekretion und Affinitätsreinigung von heterologen Proteinen geeignet ist.

2.2.3 Quantifizierung von sekretiertem Gus-Cts1-Fusionsprotein

Für die Weiterentwicklung des Expressionssystems war eine Abschätzung der Ausbeute des sekretierten Proteins nach Cts1-vermittelter Sekretion nötig. Eine Quantifizierung des Gus-Cts1-Fusionsproteins gestaltete sich jedoch zunächst als schwierig, da das Protein weder durch Präzipitation noch durch Affinitätsreinigung mit anschließender Western Blot-Analyse im Überstand detektiert werden konnte. Da in Zellextrakten bereits gezeigt worden war, dass eine Affinitätsreinigung und Detektion des Fusionsproteins generell möglich sein müsste (Abb. 2.5), war zu vermuten, dass nur sehr wenig intaktes Vollängen-Fusionsprotein in Überständen vorhanden war. Da das Reporterenzym Gus aber in Kombination mit dem sehr

sensitiven Substrat MUG die Detektion der Gus-Aktivität in Überständen ermöglicht, wurde hierüber eine Quantifizierung der entsprechenden Gus-Proteine vorgenommen.

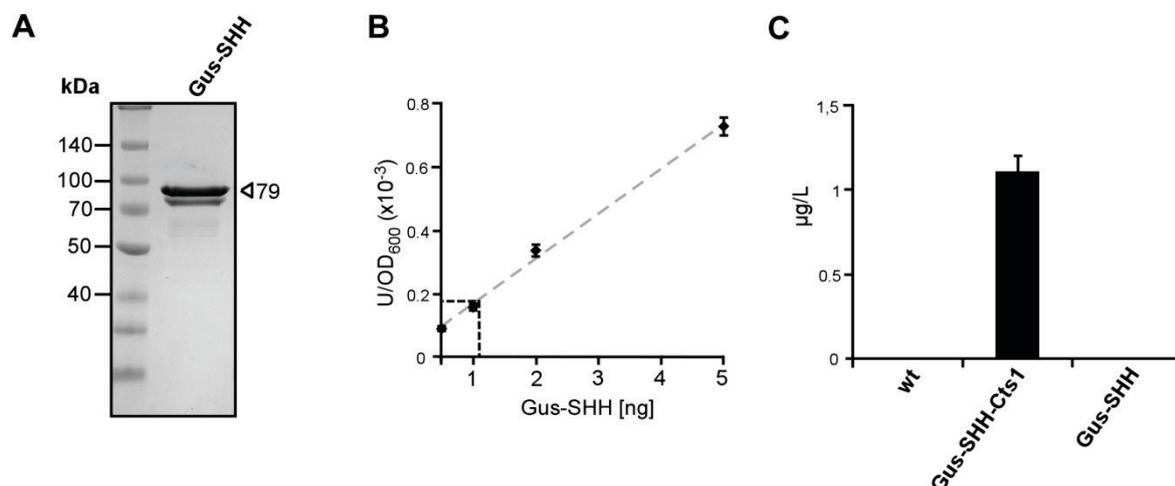


Abbildung 2.6: Quantifizierung des Gus-SHH-Cts1 Fusionsproteins in Überständen von Sporidien

(A) Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit, in *E. coli* exprimiertem und affinitätsgereinigtem Gus-SHH Fusionsprotein. Es wurden 110 µg Gesamtprotein auf ein 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gus-SHH Fusionsprotein besitzt rechnerisch eine molekulare Masse von 79 kDa. (B) Kalibrierungskurve für den Gus-Aktivitätsassay. Die Kurve wurde durch Messen der Gus-Aktivitäten von definierten Mengen (0,5; 1; 2 und 5 ng) des affinitätsgereinigten Gus-SHH Fusionsproteins erstellt. Der Gus-Assay wurde dabei auf die gleiche Weise, wie bei Gus-Assays von Überständen durchgeführt, wobei die CM-Überstände durch CM-Medium mit gereinigtem Gus-SHH aus *E. coli* ersetzt wurden. Das Diagramm entstand aus Mittelwerte von drei unabhängigen Messungen, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichungen darstellen. Parallel wurde auch die Gus-Aktivität in hefeartig wachsenden *U. maydis* Kulturüberständen des AB33 Ausgangsstammes, des Gus-SHH-Cts1 Stammes und eines Gus-SHH Kontrollstammes gemessen (siehe C). Die schwarzen, unterbrochenen Linien spiegeln die gemessene Aktivität und daraus resultierende Proteinmenge in 1 ml Überstand des Gus-SHH-Cts1 Stammes wieder. (C) Über die Gus-Kalibrierungskurve und die Gus-Aktivitätsmessungen ermittelte Gus-Mengen in einen Liter Überstand von Sporidien. Es handelt sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, wobei Standardabweichungen als Fehlerbalken dargestellt sind.

Um dieses umzusetzen, wurde zunächst ein Gus-SHH Fusionsprotein in *E. coli* produziert und mittels Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gereinigt. In Abbildung 2.6 A ist ein coomassiegefärbtes SDS-Polyacrylamidgel gezeigt, auf dem das entsprechende Eluat aufgetragen wurde. Da das Coomassie-Gel eine starke Anreicherung des Gus-SHH Fusionsproteins im Eluat belegte, konnte die Konzentration des Fusionsproteins, mittels Bradford-Analyse, abgeschätzt werden. Nun konnten die Gus-Aktivitäten definierter Mengen (0,5; 1; 2; und 5 ng) des Gus-SHH Proteins aus *E. coli* in dem Gus-Aktivitätsassay bestimmt werden und somit eine linear verlaufende Gus-Eichgerade erstellt werden (Abb. 2.6 B). Die Gus-Messungen wurden dabei so durchgeführt, dass die Werte mit der parallel gemessenen Gus-Aktivität im Überstand des hefeartig wachsenden *U. maydis* Stammes AB33Gus-SHH-Cts1 vergleichbar waren. Somit konnte man über die Eichgerade und die ermittelte Gus-Aktivität im AB33Gus-SHH-Cts1 Überstand grob bestimmen, wieviel aktives Gus sekretiert worden war (Abb. 2.6 B, schwarze gestrichelte Linie). Wie Abbildung 2.6 C zeigt, ergab sich daraus eine Konzentration von nur 1,1 µg in einem Liter Überstand bezogen auf eine OD₆₀₀ von 1.

2.3 Cts1-vermittelter Export von Lipasen

Um die Produktion von heterologen Proteinen im neu entwickelten Expressionssystem in *U. maydis* an einem Beispiel anzuwenden, sollten in diesem Teil der Arbeit Lipasen über den Cts1-vermittelten Weg exportiert werden. Lipasen stellen hierbei gute Testproteine dar, da sie einerseits zu den wichtigsten biotechnologisch genutzten Enzymen gehören, andererseits aufgrund ihrer Hydrophobizität für viele Expressionssysteme eine Herausforderung darstellen (Jung & Park, 2008, Larsen *et al.*, 2008). Exprimiert werden sollten die sehr bekannte Lipase CalB (Genbank: *ACI06118*) aus *Pseudozyma aphidis* sowie eine thermostabile Lipase LipT (Genbank: *JQ028671*) aus der Metagenombank einer Heizungsanlage. CalB dient hier gerade deshalb als sinnvolle Testlipase, da sie bereits in vielen Expressionssystemen erfolgreich produziert wurde und man somit eine Vergleichsmöglichkeit zu Systemen in anderen Organismen hat (Høegh *et al.*, 1995, Tamalampudi *et al.*, 2007, Larsen *et al.*, 2008, Kunigo *et al.*, 2013). Bei LipT handelt es sich um eine neu entdeckte Lipase, die in *E. coli* nur in relativ geringen Mengen produziert werden konnte (Chow *et al.*, 2012; persönliche Mitteilung J. Chow). Die zugehörige Aminosäuresequenz wurde im Zuge einer Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Hamburg von Jennifer Chow und Wolfgang Streit bereitgestellt. Ein bekanntes Problem bei der Expression von heterologen Proteinen ist der vom Expressionsorganismus abweichende Codongebrauch ('codon usage') in den entsprechenden DNA-Sequenzen. Hierdurch kann es einerseits zu ineffizienter Translation aufgrund zu niedriger Konzentrationen der entsprechenden tRNAs und andererseits auch zum Abbruch der Transkription durch vorzeitige Polyadenylierung innerhalb der kodierenden Region kommen (Zarnack *et al.*, 2006, Tokuoka *et al.*, 2008). Um diesem Problem vorzubeugen, wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen der Lipasen für den Codongebrauch von *U. maydis* optimiert (Abb. 2.7).

A

```

ATGGCGCTGCCCTCGGGTCGGATCCCGCCTTTTCGCAGCCCAAGTCG
GTGCTGATGCGGGCTCACCTGTCAAGGCGCTCGCCCTCTCGGGTC
AGCAAGCCCATTTCTGCTGGTTCCCGGTACCGGCACCACCGGCCCCAG
TCGTTGCACTCGAACTGGATCCCTCTCTCGACCCAGTTCGGGTACACC
CCCTGTGGATCTCCCGCCCTTATGCTCAACGATACCCAGGTC
AACACCGAGTACATGGTCAACGCCATCACGGCGCTCTACCGGGTTCG
GGTAACAACAAGCTCCCGTGTCTACCTGGTCCCAAGTGGCTCTGTC
GCCAGTGGGGTCTGACCTTCTTCCCGTCCGATCCGATCCAAGGTGAT
CGACTATGGCTTTGCTCCCGACTACAAGGGAACCGTCTCGCCGGT
CCCTCGAGCGCTCGGCTCTCGGCTCCCTCGGTTTGGCAGCAAACC
ACCGGTTCCGGCTCACCACCGCCCTCGCAATGCCGGTGGTCTGACC
CAGATCGTTCCACGACCAACCTCTACTCGGCCACCGACGAGATGTG
CAGCCCAAGTGTGCAACTCGCCGCTCGAATCGAGCTACCTCTTCAAC
GGTAAGAACGTCACGGCCAGGCCGTGTGGGTCCGCTTTCGTCTATC
GACCAGCTGGCTCGCTCACTTCGCAGTTTTCGTATGTCGTGGCCGT
TCGGCTCTGCGCTCACCACCGGTACGGCCCGCAGCCCGAATACGGC
ATACCGACTGCAACCCCTCTCCCGCCAAAGACTTGACGCCCGAGCAG
AAAGTGCTGCGCGGCTCTGCTCCGCGCTGCGCCCATCGTG
CGGGTCCCAAGCAGAAGCTGCGAGCCGATCTCATGCCCTATGCTCGC
CCCTTGCCGTGGCAAGCGCACTGTCTGGTATCGTCACGCC

```

B

```

ATGGCGCTCGAGGCCGTGGAAAGGCCGTGAGGTGCCCGGTGGTGTG
TGCTCGGACGGTCCCTTACCGTTCTACGTCTCGCCGGTGACCCC
AAGAAGGTGTCATCGACTCCAGGGCGGTGGTGGTGGTGGAACGCC
GCCACTGCGGGCTCAGTCCGACACTACCGCAAGCGGTGACAGT
CAGGAGCTCTCTCGCCAGGGCATCTACAACCGTCTCTCGGTGGC
AACCCGTTCTACGGCTGGACCCAGTCTTTGTGCCCTACTGCACCGGT
GACCTCCAGTGGCCGTGCCACCGTCACTACGGGGTTCAAGGTG
CACCACCGGGTCTCGCAATGGCTCGCTGCGCTGGAGTACGTCTTC
CGCAACACACGGACCCGAGAAGGTCTTTGTACCGGTTGCTCGGCC
GGTGCCTACGGCGCGTCTTCTGGGGCAGCAAGGTGCTCTCGACCTAC
AAGAAATGCGCGCTCGCCGTCGCGGTGACGCCGGTGTGGGCTCCGC
ACGCCGACTTCCCGGTTTGGTGTGGAAACCCGCGTCTGCCGAG
CTGCCCGTCTGTGCCCAACCCGAGGTGCGCCGAGATCTACCTCGCT
CTCGCCAAGGCCCTTCCCAAGGCCAATCGCCAGTACACCACGCTG
CTGACGGCACCAGATCTTCTTACCGTCTGATGAAGGGGAGCGG
ACGCCCTCGGAAGCCACGGCCGAGAGTGGGGCAGGGGCCATGCGT
GCCGTCCTGGCTCCCGCCAGGCCGAGAACTACACCTTCTACCTGGCT
CCGGTGGTCAGCACTGCATCCTGCCCGTCCCGAGCTCTACACGCTC
AAGTGGGAGGTGCTGTTCTGAGTGGTCCGGGTGGCGTCCC

```

Abbildung 2.7: Codonoptimierung der Lipasen CalB und LipT

(A-B) Die original DNA-Sequenz zweier Lipasen wurde jeweils an den Codongebrauch von *U. maydis* angepasst. Veränderte Basen sind grau hinterlegt und betreffen meist nur die dritte Base der Codons. Nach dem Start-codon (ATG) wurde jeweils ein GCG, kodierend für Alanin, eingefügt, um eine Erkennungssequenz für die Restriktionseendonuklease *NcoI* zu schaffen. Die gezeigten DNA-Sequenzen kodieren jeweils für die reifen Proteine. (A) Codon-optimierte DNA-Sequenz von CalB. (B) Codon-optimierte DNA-Sequenz von LipT.

Die Optimierung erfolgte nach einer in Zarnack *et al.* (2006) näher beschriebenen Methode. Dabei wurde für jeweils zwei benachbarte Aminosäuren möglichst das höchstfrequentierte Dicodon verwendet, was schließlich in einer Reihe von überlappenden Dicodons resultierte. Sekretierte Enzyme wie Proteasen oder Lipasen besitzen zusätzlich zu dem N-terminalen Signalpeptid häufig ein Propeptid. Auch das Propeptid wird im Verlauf der Proteinreifung abgespalten. Unter anderem kann eine solche Prozessierung für die Ausbildung des nativen, aktiven Proteins benötigt werden. Die CalB Lipase besitzt zwar ein sieben Aminosäure langes Propeptid (siehe Abb. 2.8), dessen Funktion noch nicht genau bekannt ist, dieses wurde jedoch für die Produktion einer aktiven CalB Lipase in *P. pastoris* oder *E. coli* nicht benötigt (Larsen *et al.*, 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde entschieden, die Lipasen auch in *U. maydis* ohne Signal- und Propeptid zu exprimieren. Die in Abbildung 2.7 dargestellten optimierten Sequenzen kodieren daher jeweils für die reifen Lipasen. Synthetisiert wurden die DNA-Sequenzen von der Firma GeneArt (Invitrogen).

2.3.1 Reduktion der lipolytischen Hintergrundaktivität

Die bisherigen Ergebnisse zur Sekretion von heterologen Proteinen wie Gus über den Cts1-Sekretionsweg suggerierten, dass nur relativ geringe Mengen an aktivem Produkt in den Überständen vorhanden sind. Um eine erfolgreiche Sekretion von Lipase-Cts1-Fusionsproteinen detektieren zu können, sollte die von *U. maydis* Lipasen vermittelte lipolytische Hintergrundaktivität möglichst gering sein. Dazu sollten zunächst von *U. maydis* sekretierte Lipasen bioinformatisch identifiziert und analysiert werden, mit dem Ziel einen entsprechenden Deletionsstamm mit reduzierter Hintergrundaktivität herzustellen.

2.3.1.1 Bioinformatische Analyse möglicher sekretierter *U. maydis* Lipasen

Die *U. maydis* Genom-Datenbank (MUMDB; <http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago/>) enthält mindestens 25 Gene, die für mögliche Lipasen codieren (Mewes *et al.*, 2002, Kämper *et al.*, 2006). Bioinformatische Analysen (SignalP 4.1, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) zeigen, dass davon wahrscheinlich mindestens sieben sekretiert werden. Bei einem überlappenden Aktivitätsprofil der entsprechenden Lipasen mit CalB oder LipT könnte dies die Detektion der zu exprimierenden Lipasen CalB und LipT in Überständen unmöglich machen. Bei Sequenzvergleichen zwischen CalB und den sieben voraussichtlich sekretierten Lipasen zeigte sich, dass die Lipase Uml2 (*Um01422*) mit 66% Sequenzidentität (siehe Abb. 2.8 A) die höchste Identität zu CalB im Vergleich zu den anderen Lipasen (14% bis 19% Sequenzidentität) besitzt. Sucht man mittels BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nach verwandten Proteinen zur CalB Lipase aus *P. aphidis*, gehört Uml2 aus *U. maydis* (67% Identität) nach drei Lipasen aus den sehr nah verwandten Organismen *Ustilago hordei* (75% Identität), *Sporisorium relianum* (74% Identität) und *Pseudozyma hubeiensis* (71% Identität) zu den Lipasen mit der höchsten Sequenzidentität. Aufgrund dieser hohen Identität von Uml2 und CalB ist zu vermuten, dass diese Lipasen auch eine überlappende Aktivität aufweisen könnten und somit eine Deletion der Uml2 Lipase im Expressionsstamm zur Reduktion der spezifischen Hintergrundaktivität führen könnte. Zu der thermostabilen Lipase LipT besitzen die sieben sekretierten Lipasen hingegen lediglich Sequenzidentitäten von 11% bis 17%. Damit ist eine überlagernde Aktivität dieser Lipasen mit LipT eher unwahrscheinlich, was Deletionen weitere Lipasen unnötig machen sollte.

2.3.1.2 Charakterisierung eines *uml2* Deletionsstammes

Aufgrund der bioinformatischen Ergebnisse sollte Uml2 im AB33 Stammhintergrund mit dem Ziel deletiert werden, die CalB spezifische, lipolytische Hintergrundaktivität des Stammes zu reduzieren. Damit sollten Bedingungen geschaffen werden, bei denen die Aktivitäten der heterolog exprimierten Lipasen nachgewiesen werden können. Im Rahmen einer Bachelorarbeit wurden entsprechende Deletionsstämme in den Stammhintergründen SG200 und AB33 hergestellt und phänotypisch näher untersucht (M. Terfrüchte, Bachelorarbeit 2011). Bei der ersten Analyse des *uml2Δ*-Stammes waren zunächst keine besonderen Veränderungen auszumachen: Die Zellmorphologie des AB33uml2Δ Stammes war sowohl während des hefeartigen als auch während des filamentösen Wachstums unverändert zum Ausgangsstamm. Eine erste vergleichende Mais-Infektionsstudie zeigte für einen solopathogenen SG200uml2Δ Stamm keine signifikant veränderten Symptome im Vergleich zur Infektion mit dem Ausgangsstamm SG200 (M. Terfrüchte, Bachelorarbeit 2011). Auch Analysen zur lipolytischen Aktivität des Deletionsstammes auf CM-Glukoseplatten mit Tributyrin wiesen kaum Unterschiede zum Ausgangsstamm auf. In weiteren Versuchen zeigte sich jedoch, dass ein starker lipolytischer Phänotyp erst nach längerer Kultivierung bzw. Inkubation der entspre-

chenden Stämme auftrat (diese Arbeit). In den folgenden Abschnitten sollten die Bedingungen, unter denen Uml2 die starke lipolytische Aktivität vermittelt, näher untersucht werden.

Analyse der lipolytischen Aktivität im *uml2*-Deletionsstamm

Zur Untersuchung der lipolytischen Aktivität wurden zunächst AB33 und AB33uml2 Δ Kulturen auf Indikatorplatten aufgetropft. Als Indikatoren für die lipolytische Aktivität wurden den Festmediumplatten die Substrate Tributyrin, Tween20 und Tween80 zugesetzt. Die milchige Trübung der Tributyrin-Festmediumplatten wird durch die Hydrolyse des Tributyrins zu Glycerin und Buttersäure geklärt. Bei der Hydrolyse von Polysorbat 20 (Tween20) und Polysorbat 80 (Tween80) werden die freien Fettsäuren mit den vorhandenen Ca²⁺-Ionen zu einem weißlichen Calciumsalz präzipitiert. Eine veränderte lipolytische Aktivität des AB33uml2 Δ im Vergleich zum Ausgangsstamm konnte schließlich eindeutig nach einer Inkubation über drei Tage bei 28 °C auf Indikatorplatten ohne Glukose gezeigt werden (Abb. 2.8 B). So war um die Zellen des Ausgangsstammes AB33 bei allen Plattentests ein deutlich größerer Hof zu sehen als um den *uml2*-Deletionsstamm AB33uml2 Δ . Der gebildete Hof auf der Tributyrin-Platte war deutlich kleiner als die auf den Tween20- und Tween80-Platten. Die ringförmig gebildeten Calciumsalzpräzipitate auf den Tween-Platten unterschieden sich dadurch, dass sie auf Tween20 Platten zwar größer waren und hier bereits früher gebildet wurden (zwei Tage Inkubation), andererseits waren die Präzipitate auf den Tween80-Platten deutlich dichter. Diese Unterschiede könnten jedoch auf die unterschiedliche Viskosität von Tween20 und Tween80 und eine damit verbundene unterschiedliche Festigkeit der Festmediumplatten zurückzuführen sein. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Uml2 vermittelte lipolytische Aktivität auf Indikatorplatten nur ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle und nach einer längeren Inkubation auszumachen ist. Weiterhin visualisieren sie die deutliche Reduktion der lipolytischen Aktivität im Deletionsstamm.

A

```

Pa 1 mKlllgtgvaqlatcvaatplvkrllpsgsdpafsqpksvldagltcggaspssvskpillvpqgtgttggqsfdenwiplstqlgytppcwispppfmInd
Um 1 mKttvisalvtlasiiraapl-----assdpafstpkatldaglecgtgspssqtKpillvpqgtgaggtqtfdswwiplsaklgfscpwispppfmInd

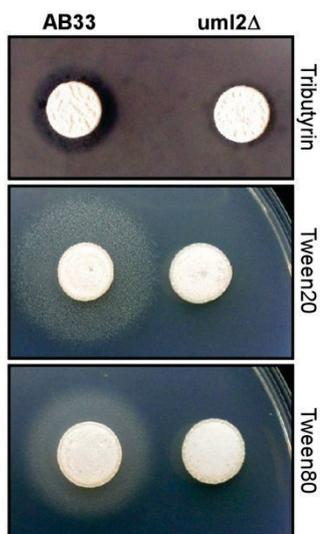
Pa 101 tqvnteymvnaitalyagsqnnklpvlwtwsggglvaqwgltffpsirskvdrllmafapdykgtvlagpldalavsapvwwqgttgsalttlalnagglTq
Um 96 sqvnyeyivnavqtlYagsqskkvvlwtwsgglatqwaltffpsirnkvdrlmafapdykgtieagllstfglasqsvwwqqagsafvtalknagglTs

Pa 201 ivpttnlysatdeivqpqvnspldssylfngknvqagavcgpplfvidhagsltsqfsyvvralsalrsttqgaroadygitdchplpandltpeqkvaaa
Um 196 fvpttnlysfdeivqpqvfnssdadessylgnskniqaqtvagffvidhagsltsqfsyvvrksaltsesgvanoadysskdkkaspaddlsakqkadas

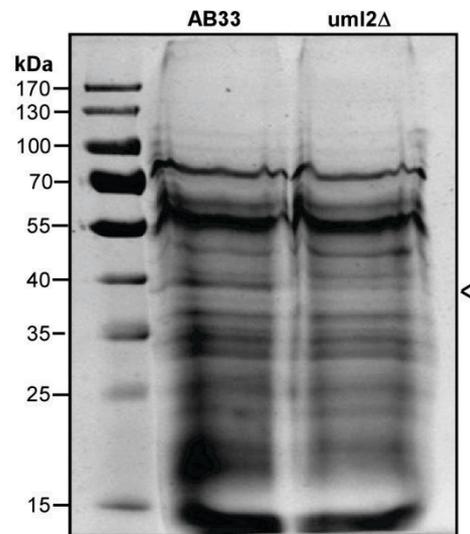
Pa 301 allapaaaaivagpkqncpdlmpyarpfavgkrtcsgivtp
Um 296 allfvaaqnltagpkqncpdlkpyarqfavgkktcsgtin-

```

B



C



D

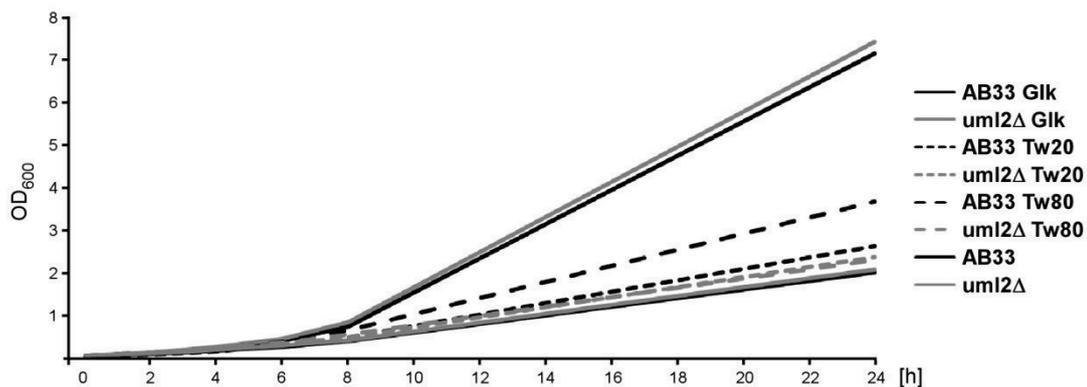


Abbildung 2.8: Charakterisierung eines *uml2*-Deletionsstammes

(A) Sequenzvergleich zwischen den Lipasen CalB aus *P. aphidis* (Pa) und Uml2 aus *U. maydis* (Um). Identische Aminosäuren sind blau hinterlegt. Die Sequenzidentität liegt bei 66%. In beiden Lipasen verbinden drei Disulfidbrücken (SS1, SS2 und SS3) die durch Kästchen markierten Aminosäuren. Glykosylierte Aminosäuren sind durch Sterne markiert. Vorhergesagte Signalpeptide enden an den mit offenen Pfeilen markierten Positionen. Der Beginn des durch die Prozessierung des Propeptids entstehenden, reifen CalB Proteins ist durch einen ausgefüllten Pfeil markiert. Abbildung ertellt nach Buerth *et al.* (2014) (B) Analyse der lipolytischen Aktivität des AB33-Ausgangsstammes und des *uml2*Δ-Stammes auf Indikatorplatten. Verwendet wurden CM-Festmedium-Platten mit 1% Tributyrin oder 0,2% Tween20 bzw. Tween80 und 0,6 mM CaCl₂. Aufgetropft wurden jeweils 4 μl Kultur mit einer OD₆₀₀ von 1. Die Platten wurden für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Lipolytische Aktivität zeigte sich bei Tributyrin-Platten durch Klärung des getrübbten Mediums um die gewachsenen Zellen. Bei Tween20 und Tween80 Platten wird das Festmedium durch lipolytische Aktivität aufgrund der Fällung der entstehenden Fettsäuren durch

die Calciumionen eingetrübt. **(C)** Silbergefärbtes SDS-Polyacrylamidgel zum Sekretvergleich des AB33-Ausgangstammes und des *uml2Δ*-Stammes. Auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel wurden präzipitierte Proteine aus 10 ml zellfreiem Kulturüberstand aufgetragen. Die Kulturen wurden mit einer anfänglichen OD₆₀₀ von 0,5 für 24 h kultiviert. Bei der mit dem Pfeil markierten Bande handelt es sich höchstwahrscheinlich um Uml2. **(D)** Diagramm zur Wachstums-Analyse des AB33- und des *Δuml2*-Stammes in CM-Medium mit unterschiedlichen Substratzusätzen. Verglichen wurde das Wachstum in CM-Medium ohne Glukose, unter Zugabe von 1% Glukose (Glc) und unter Zugabe von 0,2% Tween20 bzw. Tween80. Die Kulturen wurden mit einer anfänglichen OD₆₀₀ von ungefähr 0,05 über 24 h kultiviert. Die OD₆₀₀ wurde die ersten acht Stunden jede zweite Stunde und nach 24 h bestimmt. Die gezeigten Experimente wurden in mindestens drei unabhängigen Experimenten wiederholt, wobei die in (D) gezeigten Werte aus den Mittelwerten von drei Experimenten resultieren.

Vergleichende Sekretomanalyse des *uml2*-Deletionsstammes

Da die Indikatorplatten gezeigt hatten, dass Uml2 vermittelte lipolytische Aktivität zwar erst bei länger andauerndem Wachstum festzustellen war, dann jedoch eine relativ starke Aktivität vermittelt, sollte in diesem Teil geprüft werden, ob sich das Uml2 Protein im Sekretom einer dichtgewachsenen AB33-Kultur nachweisen lässt. Dazu wurde eine vergleichende Sekretomanalyse zwischen AB33 und AB33*uml2Δ* durchgeführt, für die Proteine aus den zellfreien Kulturüberständen dichter Kulturen präzipitiert wurden (Abb. 2.8 B). Diese Vollmedium-Kulturen (YEPS_L) waren zuvor mit einer anfänglichen OD₆₀₀ von 1 über 24 Stunden kultiviert worden. Nach Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese und nachvollgender Silberfärbung ist in der Spur mit den präzipitierten Proteinen des AB33 Überstands eine Bande im Vergleich zur Spur mit präzipitierten Proteinen aus AB33*uml2Δ* Überständen deutlich verstärkt. Die mit einem Pfeil markierte Bande passt mit einer Größe von etwas unter 40 kDa zu der erwarteten Größe von Uml2. Rechnerisch sollte Uml2 ein Molekulargewicht von 35 kDa besitzen, da Uml2 jedoch an mindestens einer Aminosäureposition *N*-glykosyliert wird (siehe Abb. 2.8 A, Buerth *et al.*, 2014) und man für eine *N*-Glykosylierung etwa 2,5 kDa annehmen kann (Ansari *et al.*, 2006), scheint die entsprechende Bande auf der richtigen Höhe zu liegen. Das Ergebnis bestätigt, dass Uml2 unter diesen Bedingungen sekretiert wird und somit in relativ hohen Konzentrationen im Überstand vorhanden ist.

Charakterisierung des Wachstumsverhaltens des *uml2*-Deletionsstammes auf Polysorbaten

Um zu analysieren, ob die Fähigkeit Tween20 bzw. Tween80 zu hydrolysieren Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *U. maydis* hat, wurde das Wachstum von AB33- und AB33*uml2Δ* in CM-Flüssigmedium mit 0,2% Tween20 bzw. Tween80 untersucht (Abb. 2.8 D). Zur Kontrolle wurden die Stämme auch in CM-Medium ohne weitere Kohlenstoffquelle oder mit 1% Glukose kultiviert. Wie zu erwarten wuchsen die Kulturen ohne weitere Kohlenstoffquelle deutlich schlechter als mit Glukose. Hier gab es keine Wachstumsunterschiede zwischen AB33- und AB33*uml2Δ*-Kulturen. Durch die Zugabe von Tween20 oder Tween80 wurde das Wachstum der Kulturen im Vergleich zum Wachstum in CM-Medium ohne Zusätze nur sehr leicht gesteigert. Hierbei zeigte sich jedoch, dass AB33 ein etwas besseres Wachstum aufwies als der *uml2Δ*-Stamm. Dies galt insbesondere für das Wachstum auf Tween80. Hier war die OD₆₀₀ nach 24 Stunden beim Ausgangstamm AB33 im Vergleich zu

AB33uml2Δ um etwa 60% erhöht. Auffällig war, dass die Wachstumsunterschiede zwischen beiden Stämmen beim Wachstum auf Tween20 oder Tween80 erst nach sechs Stunden auftraten. Versuche, das Wachstum auf für *U. maydis* natürlicheren Substraten wie Maiskeimöl zu analysieren, gestalteten sich als schwierig, da sich das Medium hier, vermutlich durch freigesetzte Fettsäuren, eintrübte (Daten nicht gezeigt). Bei Analysen der Lebendzellzahl in solchen Kulturen zeigten sich hier jedoch keine Unterschiede zwischen beiden Stämmen, während sich die Wachstumsunterschiede bei Wachstum auf Tween20 und Tween80 bestätigten (Daten nicht gezeigt). Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass *U. maydis* Tween20 und Tween80 unter diesen Bedingungen zwar nur schlecht verwerten kann, die Verstoffwechslung dieser Substrate jedoch durch Uml2 begünstigt wird.

2.3.2 Etablierung eines Polysorbat-Assays zur Analyse lipolytischer Aktivität

Um die von Uml2 vermittelte Hydrolyse von Tween20 und Tween80 näher zu untersuchen und gleichzeitig zu ermitteln, ob diese Substrate möglicherweise auch zur Analyse der lipolytischen Aktivität von heterolog in *U. maydis* exprimierten Lipasen CalB und LipT eingesetzt werden können, sollte im folgenden Teil ein entsprechender Tween-Flüssigassay entwickelt werden. Polysorbate werden schon seit langer Zeit zur Analyse von lipolytischen Aktivitäten über titrimetrische Lipase-Assays eingesetzt (Bier, 1955). Die Methodik, des in dieser Arbeit für *U. maydis* etablierten Tween-Assays nach von Tigerstrom und Stelmaschuk (1989) ist jedoch 36-mal sensitiver als ein entsprechender titrimetrischer Assay und auch viermal sensitiver als spektroskopische Methoden mit Substraten wie p-Nitrophenylpalmitat (von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1989). Sie basiert darauf, dass die bei der Hydrolyse von Polysorbaten freiwerdenden Fettsäuren durch Ca^{2+} -Ionen zu einem feinen Calciumsalz gefällt werden. Der Substratumsatz kann somit durch den Anstieg der optischen Dichte bei 500 nm bestimmt werden.

2.3.2.1 Analyse der lipolytischen Aktivität mittels Polysorbat-Assay

Zur Analyse der lipolytischen Aktivität von Überständen wurden diese im Verhältnis 1:1 mit einer Substratlösung aus dem entsprechenden Polysorbat (Tween20 oder Tween80) und CaCl_2 versetzt und bei 37 °C inkubiert. Während des Assays wurde über zwei Stunden jede Minute die OD_{500} gemessen. Das in Abbildung 2.9 A dargestellte Diagramm zeigt den Vergleich des Substratumsatzes über die Messzeit in Überständen von Kulturen von AB33- und dem *uml2Δ*-Stamm.

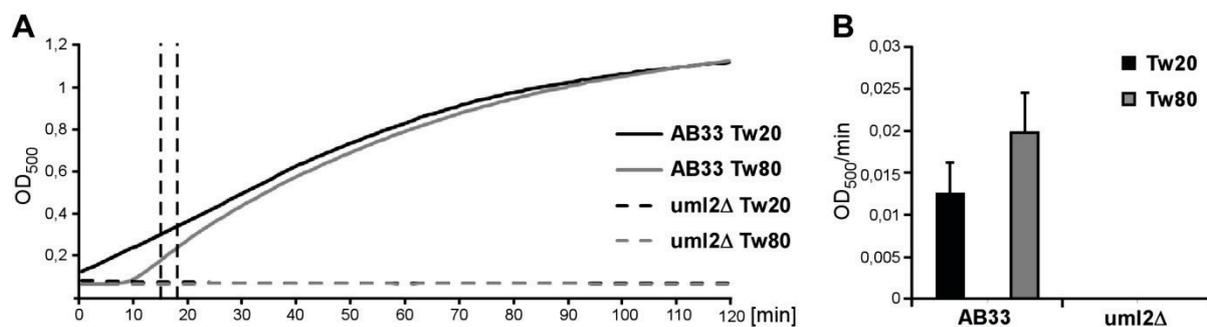


Abbildung 2.9: Tween20/80-Flüssigkeitest zur Analyse der lipolytischen Aktivität des AB33-Ausgangsstammes und des *uml2Δ*-Stammes

(A) Diagramm mit dem zeitlichen Verlauf der Hydrolyse von Tween20 (Tw20) und Tween80 (Tw80) durch die Zugabe von zellfreien Überständen der Stämme AB33 und *uml2Δ* als Enzymquelle. Die bei der Hydrolyse von Tween20 und Tween80 entstehenden Fettsäuren werden durch $CaCl_2$ gefällt, wodurch sich die Proben milchig eintrüben. Die Trübung wurde über die Messung der OD_{500} ermittelt. Die spektralphotometrische Messung fand bei 37 °C statt und die OD_{500} wurde über einen Zeitraum von zwei Stunden jede Minute gemessen. (B) Diagramm zur Darstellung der lipolytischen Aktivitäten in Überständen des AB33- und des *uml2Δ*-Stammes in OD_{500}/min . Bei den dargestellten Werten handelt es sich um die Steigung aus drei Messpunkten (Zeitpunkte: 15, 16, 17 min) der Abbildung (A) zum Zeitpunkt der höchsten Steigung (siehe senkrechte, unterbrochene Linien in Abb. (A)). Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. In Abbildung (B) sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerbalken angegeben.

Das Diagramm macht zunächst einmal deutlich, dass Tween20 und Tween80 nicht durch Überstände von Kulturen des *uml2Δ*-Stammes hydrolysiert werden können, da hier kein Substratumsatz festzustellen ist. Bei den Überständen von AB33 sind die Kurvenverläufe für den Substratumsatz von Tween20 und Tween80 sehr unterschiedlich. Betrachtet man den Kurvenverlauf des Ansatzes mit Überstand aus AB33 und Tween20 als Substrat, scheint der Substratumsatz bis zu einer OD_{500} von 0,7 stetig anzusteigen und sich anschließend eine Sättigung einzustellen. Wird der gleiche Überstand jedoch mit Tween80 als Substrat ange-setzt, beginnt die Kurve erst nach 10 Minuten zu steigen. Hierbei handelt es sich um eine sigmoide Kurve, bei der in Relation zu der Kurve von Tween20 nur kurzzeitig ein stetiger Anstieg festzustellen ist. Die Kurve fällt dann bereits bei einer OD_{500} von 0,3 wieder ab. An-nähernd gesättigt sind beide Kurven erst bei einem Wert von 1,1. Die Abbildung zeigt, dass es zum Beschreiben der Substratumsatzrate nicht zulässig ist, den Wert einer Endpunkt-messung heranzuziehen. So liegen die Werte für Tween20 während der gesamten Messung über den Werten für Tween80, obwohl die Kurve von Tween80 kurzzeitig (zwischen den senkrechten, gestrichelten Linien) die höchste Steigung besitzt. Die Steigung der Tween20 Kurve ist dagegen zwar stetig aber geringer. Der Vergleich der Substratumsatzraten ist in Abbildung 2.8 B dargestellt. Das Balkendiagramm resultiert aus der Steigung von jeweils drei Messpunkten mit der höchsten Steigung (15.-17. Minute). Sie verdeutlichen noch einmal, dass für den *uml2Δ*-Stamm keinerlei Substratumsatz festzustellen ist, was die Ergebnisse des Plattenassays bestätigt. Die Substratumsatzrate durch Überstände des AB33-Ausgangsstammes liegt für Tween80 mit 0,019 OD_{500}/min fast 1,5-mal so hoch wie für Tween20 (0,013 OD_{500}/min). Dies zeigt, dass Tween80 unter den gegebenen Bedingungen ein besseres Substrat für Uml2 zu sein scheint als Tween20. Insgesamt deuten die Ergeb-

nisse darauf hin, dass die Aktivitäten von CalB-Typ Lipasen sehr selektiv mit Polysorbat-Assays analysiert werden können.

2.3.2.2 Überprüfung der Polysorbathydrolyse durch heterolog exprimierte Lipasen

Um einerseits zu bestätigen, dass die veränderte lipolytische Aktivität im *uml2Δ*-Stamm direkt auf das Fehlen von Uml2 zurückzuführen ist und andererseits nachzuweisen, dass auch die lipolytische Aktivität einer heterolog exprimierten CalB Lipase über den Tween-Assay nachgewiesen werden kann, sollten die Aktivitäten entsprechender affinitätsgereinigte Lipasen im Polysorbat-Assay analysiert werden. Bei den Analysen sollte sowohl Tween20 als auch Tween80 als Substrat verwendet werden, um gleichzeitig zu eruieren, welches der beiden Substrate sich für die Analyse von Uml2 und CalB besser eignet.

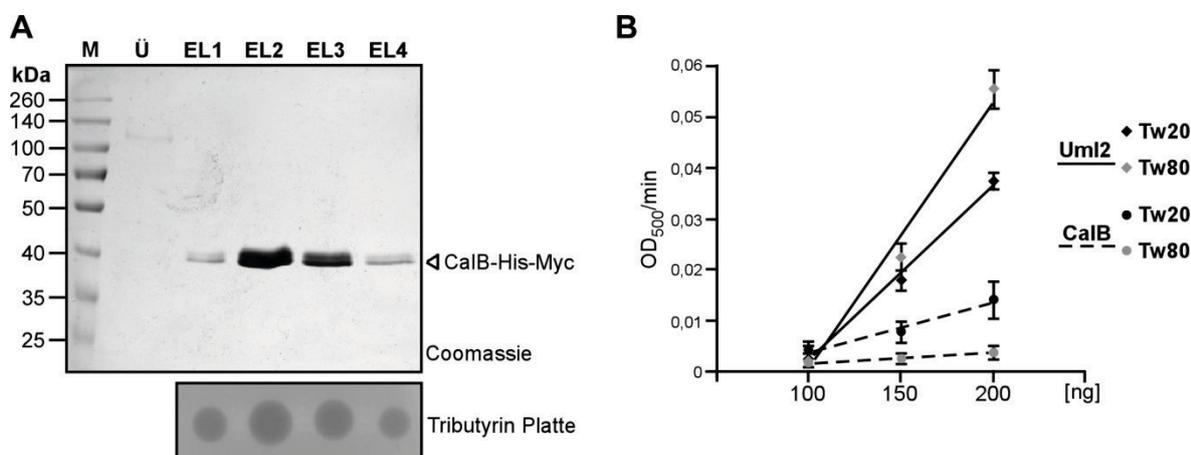


Abbildung 2.10: Analyse der lipolytischen Aktivitäten von gereinigtem Uml2 und CalB im Tween-Assay

(A) Aus *P. pastoris* affinitätsgereinigtes CalB-Myc-His auf einem coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel und auf einer Tributyrin-Indikatorplatte. Auf dem SDS-Polyacrylamidgel wurden jeweils 20 μ l des Überstandes (Ü) und der Eluate (EL1-4) aufgetragen. Zur Bestätigung der lipolytischen Aktivität wurden jeweils 5 μ l der Eluate auf Tributyrin-Indikatorplatten getropft. (B) Analyse der lipolytischen Aktivität von definierten Uml2 und CalB Mengen im Tween-Assay. Um eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der lipolytischen Aktivitätsbestimmungen in Überständen (Abb. 2.9) zu ermöglichen, wurden die Assays identisch durchgeführt. Überstände wurden hier jedoch durch Medium mit entsprechenden Mengen (100, 150 und 200 ng) an affinitätsgereinigtem Uml2-His-Myc bzw. CalB-His-Myc ersetzt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Substratumsatzraten, die aus der Steigung von drei Messpunkten zum Zeitpunkt der höchsten Steigung ermittelt wurden (Erläuterungen siehe Abb. 2.9). Es handelt sich jeweils um Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und die entsprechenden Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Für die Analyse wurden die entsprechenden Lipasen mit dem gut etablierten *P. pastoris* Expressionssystem produziert und mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aus dem Überstand gereinigt. Die für CalB-Myc-His durchgeführte Affinitätsreinigung wurde mit dem in Abbildung 2.10 A dargestellten coomassiegefärbten SDS-Polyacrylamidgel dokumentiert. Das Gel bestätigt eine saubere Elution des CalB-Myc-His Fusionsproteins. Um die lipolytische Aktivität des gereinigten Enzyms zu bestätigen, wurden die Eluate auf einer Tributyrin-Indikatorplatte aufgetropft (Abb. 2.10 A, unten). Es bildeten sich deutliche geklärte Zonen, die auf lipolytische Aktivität hinweisen. Die Affinitätsreinigung des Uml2-Myc-His wurde im Zuge einer Kooperation mit dem Institut für Molekulare Mykologie (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf) von Christoph Buerth durchgeführt und für die Analysen in dieser Arbeit zu Ver-

fügung gestellt. Nachdem die Proteinkonzentrationen der entsprechenden Eluate mittels Bradford-Analyse bestimmt worden waren, konnte die hydrolytische Aktivität definierte Mengen an Enzym in den Polysorbat-Assays analysiert werden (Abb. 2.10 B). Die Analyse erfolgte nach dem Prinzip, wie es bereits für die Messung von lipolytischer Aktivität in zellfreien Überständen verwendet wurde (siehe 2.3.2.1). Zunächst einmal zeigen diese Ergebnisse, dass Uml2 eine höhere hydrolytische Aktivität für die Substrate Tween20 und Tween80 besitzt als CalB. So ist die Substratumsatzrate bei Uml2 durchschnittlich 2,5-mal so hoch wie bei CalB bei Verwendung von Tween20 als Substrat und sogar 13-mal so hoch wie bei CalB bei der Verwendung von Tween80 als Substrat. Weiter scheint für Uml2 Tween80 das etwas bessere Substrat zu sein, da die Substratumsatzrate von Tween80 durchschnittlich 1,4-mal so hoch war wie von Tween20. Bei CalB ist der Substratumsatz hingegen bei Tween20 besser, die Rate war hier im Vergleich zu Tween80 3,6-mal so hoch. Beurteilt man diese Ergebnisse danach, welches der Polysorbate sich für einen einheitlichen Polysorbat-Assay für Uml2 und CalB besser eignet, so stellt sich Tween20 als das geeignetere Substrat heraus. Hier spielt insbesondere die Tatsache eine Rolle, dass die Substratumsatzraten für Tween80 durch CalB deutlich geringer sind als für Tween20. Der Vorteil des Substrats Tween80 gegenüber Tween20 für Uml2 ist hingegen relativ gering. Ein weiterer wichtiger Grund sich für Tween20 als Substrat festzulegen ist der im Teil 2.3.2.1 erläuterte sigmoide Verlauf der Substratumsatzkurve für Tween80. Diese sigmoide Kurve erschwert die Auswertung der Substratumsatzrate im Vergleich zu der stetig steigenden Kurve für das Tween20 Substrat deutlich. Für die folgenden Polysorbat-Assays wurde somit nur noch Tween20 verwendet.

2.3.2.3 Nachweisgrenze des Tween20-Assays für die Lipasen Uml2 und CalB

Um die Sensitivität des Tween20-Assays zu untersuchen, wurden die lipolytischen Aktivitäten von geringen Konzentrationen der aus *P. pastoris* gewonnenen Lipasen Uml2 und CalB im Tween20-Assay analysiert. Zur Bestimmung der Aktivität wurde hier jedoch nicht, wie in den bisher gezeigten Polysorbat-Assays, der Anstieg der Trübung (OD_{500}/min) gemessen, sondern eine Endpunktmessung der OD_{500} nach 24 Stunden durchgeführt.

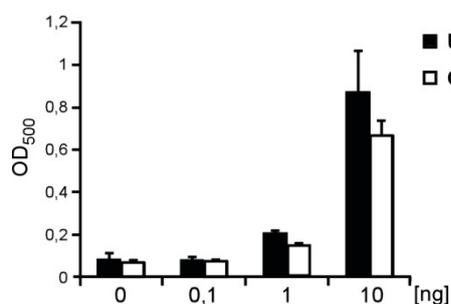


Abbildung 2.11: Ermittlung der Nachweisgrenze des Tween20-Assays für die Lipasen Uml2 und CalB

Dargestellt sind jeweils Endpunktbestimmungen (nach 24 h) der lipolytischen Aktivität von YEPS_L-Medium, das mit definierten Mengen (0; 0,1; 1 und 10 ng) an heterolog produziertem und gereinigtem Uml2 bzw. CalB versetzt wurde. Es handelt sich jeweils um Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen und die entsprechenden Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Die Werte des in Abbildung 2.11 dargestellten Balkendiagramms zeigen, dass eine Analyse der Hydrolyse von Tween20 durch Uml2 und CalB auch nach 24-stündiger Inkubation möglich ist. Auch unter diesen Bedingungen schien es keinerlei Autohydrolyse des Tween20

Substrats zu geben. Eine hydrolytische Aktivität konnte sowohl für Uml2 als auch für CalB noch bis zu einer Enzymmenge von 1 ng im Tween20-Assay nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze sollte damit für beide Lipasen zwischen 0,1 und 1 ng Enzym liegen. Somit zeugen die Ergebnisse von einer hohen Sensitivität dieses Polysorbat-Assays, die lipolytischen Aktivitäten von Uml2 und CalB nachweisen zu können.

2.3.3 Expression heterologer Lipasen im *uml2*-Deletionsstamm

Die bisherigen Ergebnisse zur Charakterisierung des *uml2Δ*-Stammes zeigen, dass für eine Expression von heterologen Lipasen des CalB-Typs die Nutzung des *uml2Δ*-Stammhintergrundes von Vorteil sein könnte. Zum einen scheint die lipolytische Aktivität im Überstand von *U. maydis* durch die Deletion der CalB-Typ Lipase Uml2 deutlich reduziert zu sein, zum anderen wurde mit dem Tween20-Assay eine Analysemethode gefunden, mit der die hydrolytische Aktivität von CalB-Typ Lipasen sehr selektiv in *U. maydis* detektiert werden kann. Diese Kombination sollte es ermöglichen, nun auch heterolog exprimierte und über das Cts1-Sekretionssystem ausgeschleuste Lipasen nachzuweisen.

2.3.3.1 Expression von heterologen Lipase-Fusionsproteinen

Es wurden vier Expressionsstämme im *uml2Δ*-Hintergrund hergestellt. Diese kodierten für Fusionsproteine, bestehend aus den jeweiligen Lipasen Uml2, CalB und LipT, dem SHH-Tag und Cts1. Die dabei verwendeten und in den ektopischen *ip*-Locus integrierten Expressionskassetten sind in Abbildung 2.12 A schematisch dargestellt.

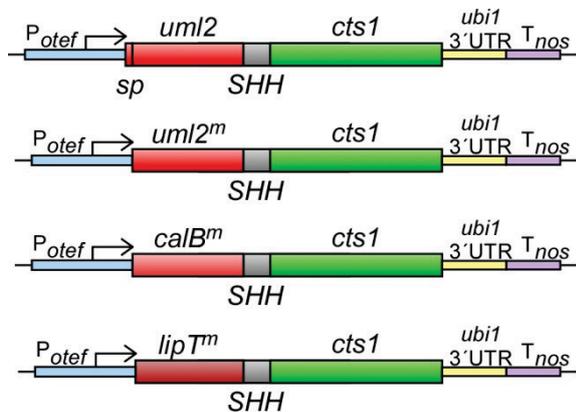


Abbildung 2.12: Schematische Darstellung der im *uml2Δ*-Stammhintergrund inserierten Lipase-Expressionskassetten

Die Konstrukte wurden in den ektopischen *ip*-Locus integriert (Erläuterung unter 2.1.1.1). Die Expressionskassetten bestehen jeweils aus dem konstitutiven Promotor P_{otef} , der für das Fusionsprotein kodierenden Sequenzen, der 3'UTR der *ubi1*-mRNA und dem Transkriptions-Terminator T_{nos} . Die zu exprimierenden Fusionsproteine sind aus der Sequenz der Lipasen, der Sequenz für einen SHH-Tag (bestehend aus einem STReP-Tag, drei HA-Tags und einem Deca-His-Tag) und der *cts1* Sequenz (vermittelt die Sekretion) zusammengesetzt. Im obersten Konstrukt wird das Uml2-Fusionsprotein mit seinem endogenen Signalpeptid für die konventionelle Sekretion

exprimiert. Bei den anderen drei Konstrukten werden jeweils Lipase-Fusionsproteine mit reifem (^m für 'mature') Uml2, CalB und LipT exprimiert.

Die unteren drei Konstrukte kodieren für Cts1-Fusionsproteine mit den reifen Lipasen Uml2, CalB und LipT. Diese Fusionsproteine sollten somit über den unkonventionellen Sekretionsweg aus der Zelle transportiert werden. Bei dem oberen Konstrukt handelt es sich um eine Fusion der vollständigen Uml2 Lipase mit dem zugehörigen endogenen Signalpeptid. Dieser Stamm sollte als eine Kontrolle für konventionelle Sekretion dienen, da hier erwartet wurde, dass trotz der vorhandenen Cts1-Sequenz das Signalpeptid die Sekretion über ER und Golgi-Apparat vermittelt.

Um zunächst die Produktion der Fusionsproteine zu bestätigen, wurden in einer Western Blot-Analyse Zellextrakte der vier Expressionsstämme und der Kontrollstämme AB33 und AB33uml2 Δ untersucht (Abb. 2.12 B). Diese Analyse zeigte, dass alle Fusionsproteine produziert wurden, sich die Mengen der Vollängenproteine jedoch deutlich unterschieden. Von den unkonventionell sekretierten Proteinen war die Bande für das Uml2-SHH-Cts1 Fusionsprotein am stärksten und die Bande für CalB-SHH-Cts1 am schwächsten. Diese Differenzen könnten möglicherweise auf unterschiedliche Stabilitäten der Proteine zurückzuführen sein. Bei der Bande für das konventionell sekretierte Uml2-Fusionsprotein (Spur 3) handelt es sich möglicherweise um eine Doppelbande, die auf die zu erwartende Glykosylierung des Uml2 Proteins zurückzuführen sein könnte.

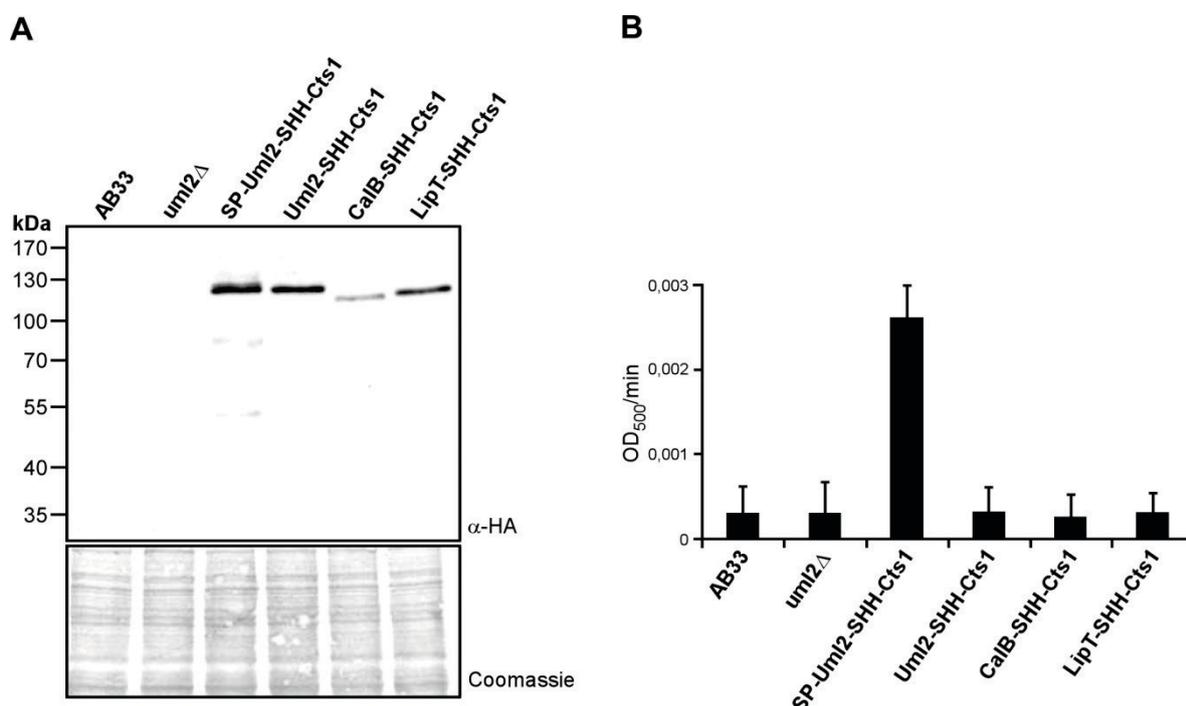


Abbildung 2.13: Expressionsanalyse der heterolog produzierten Lipase-Fusionsproteine in Zellextrakten
(A) Western Blot-Analyse von denaturierten Zellextrakten der beschriebenen *U. maydis* Stämme. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamtprotein auf ein 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Ha Antikörper verwendet (oben). Um gleiche Mengen an Gesamtprotein zu bestätigen, wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (unten). **(B)** Analyse der lipolytischen Aktivitäten in Zellextrakten der Lipase-Expressionsstämme mittels Tween20-Assay. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, wobei die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerbalken angegeben sind.

Zur Messung lipolytischer Aktivitäten der verschiedenen Lipase-Fusionsproteine wurden Zellextrakte mit dem Tween20-Assay analysiert (Abb. 2.12 C). Zur Kontrolle wurden dabei auch Zellextrakte des Vorläuferstammes AB33uml2 Δ , in dem *uml2* deletiert worden war, und des AB33-Stammes, der *uml2* endogen exprimiert, untersucht. Die verwendeten Sporidien stammten aus einer exponentiell wachsenden YEPS_L-Kultur. Die Analyse zeigte, dass nur in den Zellextrakten des SP-Uml2-SHH-Cts1 produzierenden Stammes im Vergleich zum *uml2* Deletionsstamm eine verstärkte Hydrolyse von Tween20 erfolgte. Alle anderen Stämme zeigten Werte auf dem Niveau von AB33uml2 Δ . Die Tatsache, dass selbst für den Aus-

gangsstamm AB33 keine erhöhte Aktivität festzustellen war, deutet auf eine sehr geringe Konzentration der endogen exprimierten Lipase Uml2 unter diesen Bedingungen hin. Bei dieser Analyse darf nicht übersehen werden, dass es sich bei den Werten erneut um Substratumsatzraten handelt. Somit wurde auch durch die Zellextrakte des *uml2Δ*-Stammes Tween20 hydrolysiert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Überstandsanalysen des *uml2Δ*-Stammes (Abb. 2.9). Daraus könnte man spekulieren, dass im Zellextrakt von *U. maydis* auch andere Lipasen vorhanden sind, die Tween20 hydrolysieren können, im Überstand jedoch nicht. Die wichtigste Frage, die sich aus den erlangten Erkenntnissen stellte, war, warum ein konventionell sekretiertes SP-Uml2-SHH-Cts1 Fusionsprotein lipolytische Aktivität in Zellextrakten zeigte, die über Cts1 unkonventionell sekretierten Lipase-Fusionsproteine jedoch nicht. Es könnte sein, dass die unkonventionell sekretierten Fusionsproteine erst im Zuge der Translokation in den Überstand zu aktiven Enzymen gefaltet werden. Diese Möglichkeit, sollte durch Analysen der zellfreien Kulturüberstände untersucht werden.

2.3.3.2 Analyse von heterolog exprimierten Lipase-Fusionsproteinen im Überstand

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Lipase-Fusionsproteine sekretiert werden, wurden die Proteine der Überstände präzipitiert und in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 2.14). Es zeigte sich, dass in den Überständen der vier Expressionsstämme jeweils nur sehr geringe Mengen an Vollängenprotein zu detektieren waren (Spuren 2-5, schwarzer Pfeil). Vergleicht man die Stärken der Banden untereinander, so scheint die Bande für CalB-SHH-Cts1 noch schwächer als die anderen Banden zu sein. Zusätzlich wurde in den Überständen des SP-Uml2-SHH-Cts1 Stammes eine sehr starke Abbaubande identifiziert (Spur 2, offener Pfeil). Aufgrund der Höhe der Bande und der Architektur des Fusionsproteins mit internem Detektionstag kann man vermuten, dass es sich hierbei um abgespaltenes Uml2-SHH handeln könnte. Die Western Blot-Analyse deutet somit darauf hin, dass die Fusionsproteine zwar sowohl über den konventionellen als auch über den Cts1-abhängigen, unkonventionellen Sekretionsweg ins Medium abgegeben werden, ein Großteil der Proteine jedoch im Überstand abgebaut wird.

Um zu untersuchen, ob die Lipase-Fusionsproteine in aktiver Form ins Medium sekretiert werden, wurden Überstände der Expressionsstämme mittels Tween20-Assay analysiert. Zur Kontrolle wurden auch die Überstände des Vorläuferstammes AB33uml2Δ und des AB33-Stammes mit endogen exprimiertem Uml2 gemessen. Für die Analyse wurden YEPS_L-Kulturen, die mit einer anfänglichen OD₆₀₀ von 1 angeimpft worden waren, über 24 Stunden kultiviert. Dabei wurden nach sechs und nach 24 Stunden die Überstände im Tween20-Assay gemessen (Abb. 2.14 B). Sowohl nach sechs als auch nach 24 Stunden lagen die Aktivitätswerte für die Überstände der unkonventionell sekretierenden Stämme auf dem Niveau des *uml2Δ*-Stammes. Nur der konventionell sekretierende SP-Uml2-SHH-Cts1-Stamm

zeigte nach beiden Zeitpunkten eine deutlich höhere Aktivität im Überstand als $\Delta uml2$. Dieses Ergebnis ist ein weiteres Argument dafür, dass es sich bei der Abbaubande der Western Blot-Analyse (Abb. 2.14 A, Spur 2, offener Pfeil) um Uml2-SHH handelt.

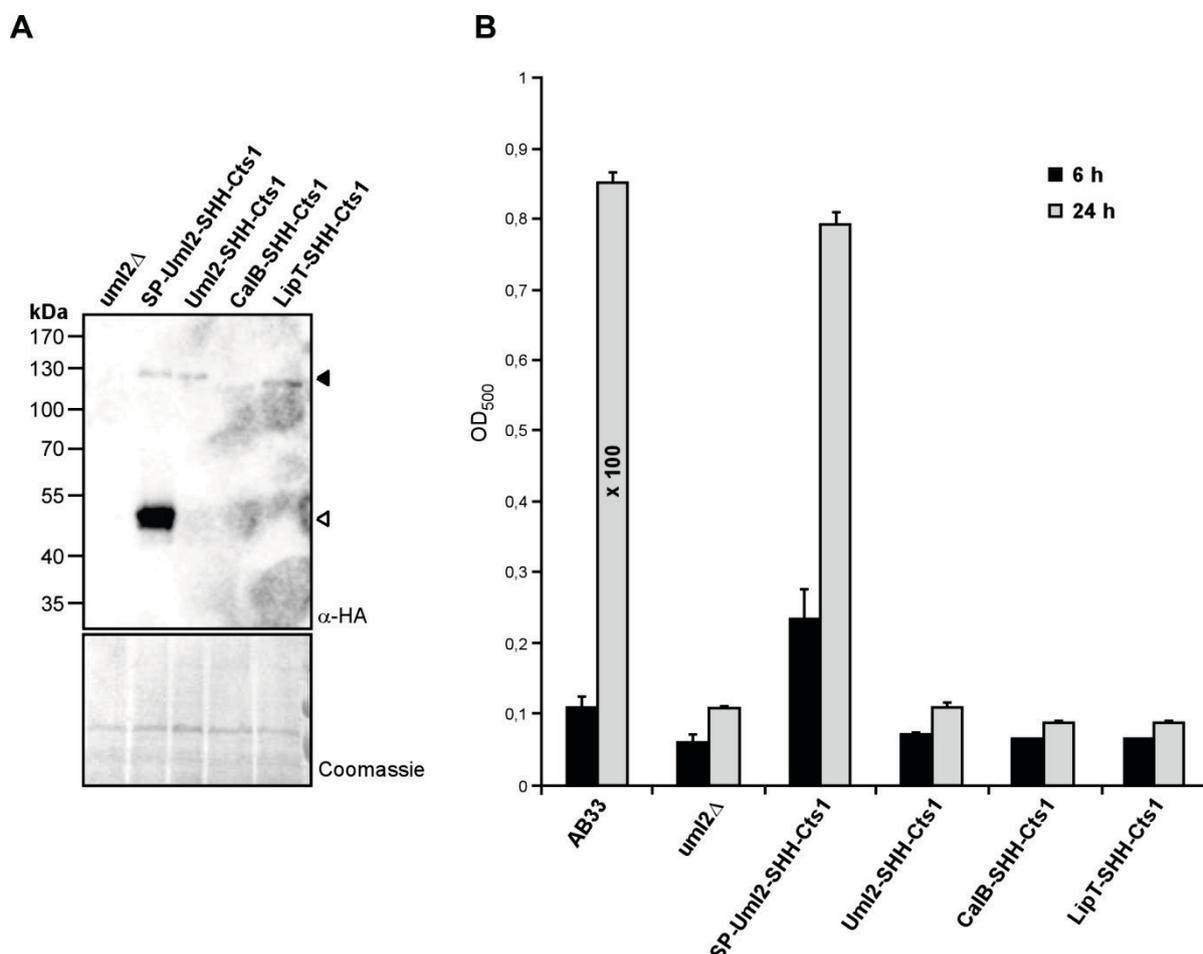


Abbildung 2.14: Sekretionsanalyse der heterolog produzierten Lipase-Fusionsproteine in Kulturüberständen

(A) Western Blot-Analyse von Proteinpräzipitaten aus 10 ml YEPS_L-Kulturüberstand (OD₅₀₀ von 0,5) der beschriebenen Stämme. Es wurde ein 8% SDS-Polyacrylamidgel verwendet. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Ha Antikörper verwendet (oben). Die mit einem schwarzen Pfeil markierten Banden sind vermutlich auf die Vollängenproteine zurückzuführen. Bei der durch einen offenen Pfeil markierten Abbaubande handelt es sich vermutlich um Uml2-SHH. Um gleiche Mengen an Gesamtprotein zu bestätigen, wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (unten). **(B)** Analyse der lipolytischen Aktivitäten in zellfreien Überständen der Lipase-Expressionsstämme mittels Tween20-Assay. Die YEPS_L-Kulturen wurden mit einer anfänglichen OD₆₀₀ von 1 angeimpft und über 24 h kultiviert. Überstände wurden jeweils nach sechs und nach 24 Stunden gemessen. Der Überstand von AB33 wurde nach 24 h vor der Messung 1/100 verdünnt. Der Enzymassay wurde über 24 h inkubiert und die Aktivität über eine Endpunktmessung der OD₅₀₀ bestimmt. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, wobei die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerbalken angegeben sind.

Interessant ist bei der Analyse jedoch auch der Vergleich zwischen dem AB33-Stamm, der *uml2* unter der Kontrolle des endogenen Promotors exprimiert, und dem SP-Uml2-SHH-Cts1 exprimierenden Stamm. Die Aktivität im Überstand des SP-Uml2-SHH-Cts1-Stammes war nach sechs Stunden Kultivierung noch 3-mal so hoch wie im Überstand von AB33. Nach 24 h war jedoch die Aktivität im AB33 Überstand um einen Faktor von 100 höher als die Aktivität

im SP-Uml2-SHH-Cts1 Überstand. Dieses deutet darauf hin, dass die endogene Expression der Uml2 Lipase in AB33 erst in der 'lag'-Phase induziert wird.

Zusammengenommen lässt sich aufgrund der Ergebnisse spekulieren, dass nach der konventionellen Sekretion des SP-Uml2-SHH-Cts1-Fusionsproteins nur Uml2-SHH stabil im Überstand verbleibt, wohingegen die unkonventionell sekretierten Lipase-Fusionsproteine proteolytisch stark degradiert werden.

2.3.4 Untersuchung der N-Glykosylierung von Uml2

Konventionell und mittels Cts1-vermitteltem Export unkonventionell sekretierte Uml2-SHH-Cts1-Fusionsproteine sollten sich nach der Sekretion in erster Linie dadurch unterscheiden, dass Uml2 nach der konventionellen Sekretion glykosyliert vorliegt.

Glykosylierungen können sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Faltung, Aktivität, Sekretion oder Stabilität von Proteinen haben (Helenius & Aebi, 2004, Brocca *et al.*, 2000, Abouakil *et al.*, 1993, Russell *et al.*, 2009). Bioinformatisch werden für Uml2 an den Asparaginresten der Positionen 63 und 94 mögliche N-Glykosylierungsstellen vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Dass Uml2 nach der Produktion und Sekretion durch *P. pastoris* an einer Aminosäure N-glykosyliert wird, konnte bereits in Buerth *et al.* (2014) bestätigt werden. Hier wurde aufgrund der Uml2 Proteinstruktur und massenspektroskopischen Analysen postuliert, dass nur der Asparaginrest an Position 63 glykosyliert wird. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Analysen standen zwei Fragen im Vordergrund: Zum einen, ob Uml2 wie zu erwarten auch in *U. maydis* glykosyliert wird und zum anderen, ob die Glykosylierung einen Einfluss auf die intrinsische Aktivität von Uml2 hat. Letzteres könnte die fehlende Aktivität des unkonventionell sekretierten Uml2 Fusionsproteins erklären.

2.3.4.1 Glykosylierung von Uml2-Fusionsproteinen in *U. maydis*

Um den Glykosylierungsstatus der konventionell und unkonventionell sekretierten Uml2-Fusionsproteine in Zellextrakten von *U. maydis* zu analysieren, wurden die Proteine zunächst mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie aus Zellextrakten gereinigt. Die Uml2-Fusionsproteine wurden dann mit der Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) behandelt, über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und in einer Western Blot-Analyse detektiert (Abb. 2.15). Es zeigte sich, dass für die Vollängenproteine von SP-Uml2-SHH-Cts1 und Uml2-SHH-Cts1 sowohl mit als auch ohne PNGaseF keine veränderten Laufhöhen der Banden festzustellen waren. Auf dem Western Blot wurden jedoch in Spur 1 und 2 noch zwei weitere Abbaubanden detektiert. Da Proteinspaltungen bei Fusionsproteinen häufig zwischen den fusionierten Proteinen auftreten, könnte es sich hierbei um SHH-Cts1 (68 kDa) und Uml2-SHH (44 kDa) handeln. Die Uml2-SHH-Abbaubande wurde durch die Behandlung mit PNGaseF deutlich nach unten verschoben, was auf eine Reduktion der molekularen

Masse um ca. 5 kDa zurückzuführen ist. Dies spricht dafür, dass Uml2 mindestens eine *N*-vernetzte Zuckerkette besitzt.

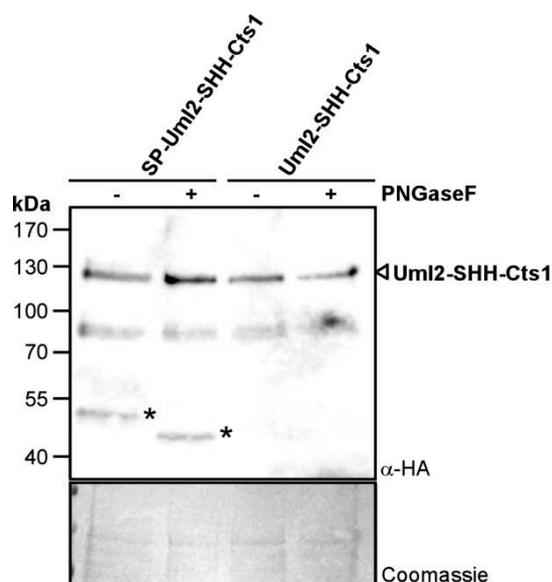


Abbildung 2.15: Deglykosylierung von affinitätsgereinigten Uml2-Fusionsproteinen

Uml2-Fusionsproteine wurden aus Zellextrakten des SP-Uml2SHH-Cts1- und des Uml2-SHH-Cts1-Stammes mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie isoliert (nicht gezeigt). Mit den gereinigten Proteinen wurde eine denaturierende Deglykosylierung mit PNGaseF durchgeführt. Die Enzymsätze wurden anschließend auf einem 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine wurden mittels Western Blot-Analyse analysiert (oben). Zur detektion der Proteine wurde der Anti-HA Antikörper verwendet. Abbaubanden die eine *N*-Glykosylierung von Uml2 bestätigen sind durch Sterne markiert. Um gleiche Mengen an Gesamtprotein zu bestätigen, wurde die Membran mit Coomassie gefärbt (unten).

Dieses bestätigte also, dass Uml2 bei konventioneller Sekretion in *U. maydis* *N*-glykosyliert wird. Da die Uml2-SHH-Abbaubande für die Ansätze mit unkonventionell sekretiertem Uml2-SHH-Fusionsprotein nicht detektiert wurde, kann hier nicht bestätigt werden, dass Uml2 in diesem Fall unglykosyliert vorliegt. Die Tatsache, dass diese Bande jedoch fehlt, spricht wiederum dafür, dass Uml2 hier deutlich instabiler ist, was möglicherweise auf eine fehlende Glykosylierung zurückzuführen sein könnte.

2.3.4.1 Auswirkung der Glykosylierung von Uml2 auf die lipolytische Aktivität

Um die Auswirkungen der Glykosylierung von Uml2 auf die lipolytische Aktivität zu untersuchen, wurde das aus *P. pastoris* affinitätsgereinigte Uml2-Myc-His-Fusionsprotein verwendet. Natives, deglykosyliertes Protein sollte in einer Western Blot-Analyse kontrolliert und im Tween20-Assay analysiert werden. Eine native Deglykosylierung kann aufgrund der Sekundär- oder Tertiärstruktur der behandelten Proteine problematisch sein. Um diese Deglykosylierung dennoch zu ermöglichen, werden den Ansätzen große Mengen an Enzym zugesetzt und die Inkubationszeit kann auf bis zu drei Tage ausgedehnt werden. Hier wurden 350 ng des affinitätsgereinigten Proteins mit 1000 U PNGaseF versetzt. Die Inkubationszeit wurde hier auf 24 Stunden bei 37 °C begrenzt, da bei der Inkubation bei 37 °C auch die Aktivität von Uml2 abnimmt. Somit musste ein Kompromiss zwischen erfolgreicher Deglykosylierung und Erhalt der enzymatischen Aktivität von Uml2 erzielt werden.

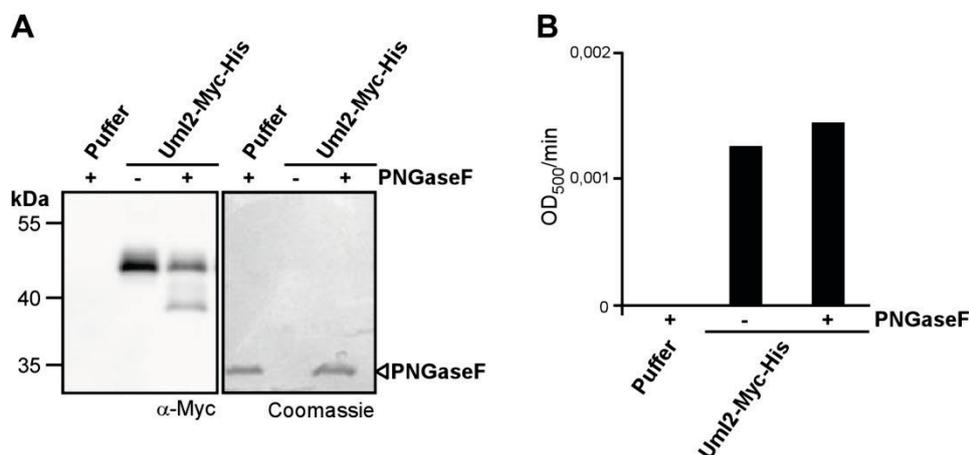


Abbildung 2.16: Analyse der lipolytischen Aktivität von deglykosyliertem Uml2

(A) Western Blot-Analyse von nativ deglykosyliertem Uml2-Myc-His. Als Kontrolle diente die gleiche Menge an glykosyliertem Uml2-Myc-His ohne Zugabe von PNGaseF und Elutionspuffer (Ni²⁺-NTA-Affinitätsreinigung) mit Zugabe von PNGaseF. Zur Detektion der Proteine wurde der Anti-Myc-Antikörper verwendet. Detektion der PNGaseF wurde durch eine Coomassie-Färbung der Membran ermöglicht. **(B)** Lipolytische Aktivitätsmessung von partiell deglykosyliertem Uml2-Myc-His mittels Tween20-Assay. Als Kontrollen wurden glykosyliertes Uml2-Myc-His ohne Zugabe von PNGaseF und Elutionspuffer (Ni-NTA-Affinitätsreinigung) mit PNGaseF eingesetzt. Es ist ein repräsentatives Einzelergebnis eines mehrfach durchgeführten Experiments gezeigt.

Die Western Blot-Analyse in Abbildung 2.16 A zeigt, dass bei der nativen Deglykosylierung von Uml2-Myc-His nur weniger als die Hälfte der Gesamtproteinmenge deglykosyliert wurde. Die Tatsache, dass hierbei neben der ursprüngliche Bande für glykosyliertes Uml2-Myc-His (Spur 3) nur eine weitere Bande auftritt spricht für eine einzelne *N*-Glykosylierungsstelle im Uml2, wie es bereits von Buerth *et al.* (2014) postuliert wurde. Die Analyse der lipolytischen Aktivität von glykosyliertem und deglykosyliertem Uml2 im Tween20-Assay zeigt, dass die Deglykosylierung von Uml2 keinen Aktivitätsverlust zur Folge hat. Partiiell deglykosyliertes Uml2 wies sogar eine leicht höhere Aktivität auf, als das glykosylierte Uml2. Dieses Ergebnis spricht somit insgesamt dafür, dass die fehlende Aktivität von unkonventionell sekretiertem Uml2-SHH-Cts1 nicht direkt auf eine ausgebliebene Glykosylierung zurückzuführen ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Glykosylierung eine erhöhte Stabilität des Proteins mit sich bringt und dieses so z.B. vor Degradierung durch extrazelluläre Proteasen schützt.

3. Diskussion

3.1 Der Sekretionsmechanismus von Cts1

In dieser Arbeit wurde die Endochitinase Cts1 näher untersucht. Vorangehende Arbeiten hatten gezeigt, dass das Enzym ausgeschleust wird und dann im extrazellulären Raum aktiv ist. Die Tatsache, dass für Cts1 jedoch kein Signalpeptid vorhergesagt wird, war ein Hinweis auf eine mögliche unkonventionelle Sekretion des Proteins (Koepke *et al.*, 2011). Dieses konnte in dieser Arbeit tatsächlich bestätigt werden.

Hierzu wurde ein Gus-Reportersystem entwickelt und angewendet, das darauf basierte, dass konventionell sekretiertes Gus durch eine *N*-Glykosylierung inaktiviert wird (Iturriaga *et al.*, 1989). Dabei zeigte sich, dass Gus fusioniert mit einem Signalpeptid für konventionelle Sekretion tatsächlich keine Gus-Aktivität in entsprechenden Überständen vermittelt (Abb. 2.2). Dass die Expression von *sp-gus-gth* intrazellulär zu einer unerwarteten Gus-Aktivität führt, könnte ein Hinweis auf eine zumindest teilweise cytoplasmatische Produktion des Proteins sein. Ein möglicher Grund für die intrazelluläre Aktivität könnte die Überlastung der konventionellen Sekretionsmaschinerie sein, die dann zu einer cytoplasmatischen Translation der *sp-gus-gth*-mRNA führt. Wie die Gus-Platten- und -Membran-Assays zeigten, wird C-terminal an Cts1 fusioniertes Gus zwar sekretiert, bleibt dann jedoch mit der Zelloberfläche assoziiert, wie es auch für endogenes Cts1 in Koepke *et al.* (2011) beschrieben wurde. Da in filamentösen Pilzen Chitin auf der Innenseite der Zellwand, nah zur Plasmamembran lokalisiert ist (Hartl *et al.*, 2012) könnte hier auch die natürliche Lokalisation von Cts1 liegen. Auch ist insbesondere für *S. cerevisiae* bekannt, dass die Sekretion heterologer Proteine häufig in einer ungewollten Ansammlung des Zielproteins im Periplasma führt (Porro *et al.*, 2005). Hiermit zeigt sich, wie wichtig für die Entwicklung des auf Cts1-Export basierenden Expressionssystems die Erkenntnis war, dass N-terminal an Cts1 fusioniertes Gus scheinbar nicht im Periplasma akkumuliert, sondern in den Überstand abgegeben wird. Western Blot-Analysen zeigen (Abb. 2.1), dass intrazellulär etwa achtmal mehr Cts1-Gus-GTH als Gus-Cts1-GTH Protein in den jeweiligen Stämmen nachweisbar war. Dieses macht deutlich, dass die Unterbindung der Akkumulation im Periplasma möglicherweise auch eine gesteigerte Sekretion zur Folge haben könnte.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Analysen der Gus-Reporterstämme die unkonventionelle Sekretion von Cts1 in zweifacher Hinsicht. Zum einen hätte eine konventionelle Sekretion der Cts1-Fusionsproteine zur Inaktivierung des fusionierten Gus-Enzyms geführt, zum anderen wäre bei einer N-terminalen Fusion von Gus an Cts1 die Funktionalität eines konventionellen Signalpeptids gestört gewesen und das Protein wäre vermutlich nicht sekretiert worden.

Für die effiziente Sekretion von Cts1 an der Spitze von *U. maydis* Filamenten ist der Rrm4-vermittelte mRNA-Langstreckentransport entlang von Mikrotubuli unerlässlich (Koepeke *et al.*, 2011). CLIP- und FISH-Datensprechen dafür, dass *cts1*-mRNA assoziiert an Rrm4 entlang von Mikrotubuli transportiert wird, womit vermutet werden könnte, dass lokale Translation der *cts1*-mRNA für die effiziente Sekretion des dafür kodierenden Proteins verantwortlich ist (Koepeke *et al.*, 2011). Die FISH-Daten, die keine *cts1*-mRNA-Lokalisierung an der Wachstumszone der Filamente, sondern nur auf möglichen mRNP-Partikeln zeigen, machen eine Translation der *cts1*-mRNA am Zielort, also z.B. der subapikalen Zone von Hyphen oder dem Septum, eher unwahrscheinlich. Im Einklang damit deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass eine an Rrm4 gebundene mRNA des Septins Cdc3 während des Transports entlang der Mikrotubuli translatiert wird und schließlich das synthetisierte Protein am Zielort abgeliefert wird (Baumann *et al.*, 2013). Ein solcher Prozess könnte also auch für Cts1 möglich sein. Zur Klärung der Frage, ob *cts1*-mRNA an Endosomen translatiert wird, könnten weitere Lokalisierungsstudien von Cts1 einen wichtigen Beitrag leisten. Hilfreich könnte dabei die Verwendung von Fluoreszenztags wie mCherry sein, die im Gegensatz zu Gfp auch bei niedrigerem pH, wie er in den transportierten Endosomen wahrscheinlich vorherrscht, fluoreszieren können (Pankiv *et al.*, 2007). Auch die Untersuchung von N- und C-terminalen Fusionsproteinen spielt dabei eine wichtige Rolle. So zeigten vorläufige Studien, dass die funktionelle N-terminale Fusion von Fluoreszenztags an Cts1 im Gegensatz zur funktionellen C-terminalen Fusionen keine Lokalisierung an der subapikalen Wachstumszone von Filamenten, sondern eine relativ gleichmäßige Verteilung des Proteins im Cytoplasma aufweist (S. Jankowski, Masterarbeit 2013). Genauere mikroskopische sowie Westernblot Analysen sollten diese Diskrepanz adressieren. Sinnvoll könnte auch eine Untersuchung dieser Stämme in 'Bleachingexperimenten' sein (Baumann *et al.*, 2013), bei denen die Spitze eines Filaments durch die Bestrahlung mit einem Laser jegliche Fluoreszenz verliert, und so neu in diesen Bereich transportierte Fluoreszenzproteine sichtbar werden. Könnte man in solchen Experimenten eine Kolo-kalisierung von Cts1 mit Rrm4 oder Endosomenmarkern wie Rab5a zeigen, wäre dies ein deutlicher Hinweis, dass *cts1*-mRNA auf Endosomen translatiert werden kann.

Gegen die lokale Translation von Cts1 an Endosomen spricht jedoch die Tatsache, dass in *rrm4Δ*-Filamenten wie in AB33-Filamenten Cts1 in C-terminaler Fusion mit Gfp subapikal an der Hyphenspitze akkumuliert. Die generierten CLIP-Daten (Koepeke *et al.*, 2011) legen nahe, dass die *cts1*-mRNA (zwei CLIP-tags) im Vergleich zu anderen stark gebundenen Rrm4-Ziel-mRNAs wie *ubi1*- und *rho3*-mRNA (39 und 6 CLIP-tags) eine eher geringe Affinität zu Rrm4 haben könnte. Daher muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass *cts1*-mRNA wie viele weitere mRNAs zwar sporadisch von Rrm4 transportiert wird, die Funktionalität des Proteins bei ausbleibendem mRNA-Transport jedoch nicht maßgeblich gestört ist.

Bei der Erforschung der Oogenese von *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* konnten Hinweise gefunden werden, dass der Mikrotubuli-abhängige Transport der mRNAs kodierend für die Wachstumsfaktoren Gurken und Vg1 zwar für deren korrekte Lokalisation, aber nicht für deren konventionelle Sekretion verantwortlich ist (Neuman-Silberberg & Schüpbach, 1996, Birsoy *et al.*, 2006). Weitergehend könnte somit auch für Cts1 vermutet werden, dass die ausbleibende Sekretion bei fehlendem mRNA-Transport auf weitere, indirekte Faktoren zurückzuführen sind, die an der Cts1-Sekretionsmaschinerie beteiligt sind und deren Funktionalität bzw. Lokalisierung vom Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport abhängt. Unterstützt wurde diese Theorie in dieser Arbeit durch die Analyse von Überständen der Gus-Cts1-GTH produzierenden Stämme, die entsprechende mRNA einmal mit und einmal ohne die 3'UTR der *ubi1*-mRNA exprimierten. Für diese 3'UTR konnte bereits gezeigt werden, dass sie die Transporteffizienz von mRNAs verbessern kann (König *et al.*, 2009). Während eine erhöhte Expression in Stämmen mit multiplen Insertionen des *gus-cts1-gth*-Konstruktes allgemein auch gesteigerte Gus-Aktivität im Überstand vermittelt, führte das Anhängen des *cis*-aktiven Elements *ubi1* 3'UTR in dieser Arbeit nicht zu einer verbesserten Sekretion (Abb. 2.5), was ein Hinweis dafür sein könnte, dass der direkte *cts1*-mRNA-Transport für die effiziente Sekretion nicht der entscheidende Faktor ist. Es darf hierbei jedoch nicht übersehen werden, dass eine tatsächliche Steigerung des *cts1*-mRNA-Transports in dieser Arbeit nicht durch weitere Experimente, wie FISH-Analysen, bestätigt wurde. Außerdem ist möglich, dass weitere Faktoren für die Steigerung der Frequenz und der Prozessivität des *cts1*-mRNA-Transports fehlten. Möglicherweise ist der mRNA-Transport auch nicht der limitierende Faktor der unkonventionellen Sekretion von Cts1 und ein gesteigerter mRNA-Transport führt nicht zu verstärkter Sekretion, da der entscheidende 'bottleneck' beispielsweise erst im eigentlichen Sekretionsprozess zu finden ist. Weiter führende Erkenntnisse über den genauen Zusammenhang zwischen dem Rrm4-vermittelten mRNA-Langstreckentransport entlang von Mikrotubuli und der unkonventionellen Sekretion von Cts1 waren jedoch bislang nicht vorhanden.

Durch die Analyse von Stämmen, die Gus-Cts1-GTH Fusionsproteine mit unterschiedlichen verkürzten Cts1 Varianten produzieren, sollten daher weitere Erkenntnisse über den Sekretionsmechanismus von Cts1 erlangt werden. Außerdem sollte in diesen Versuchen ein möglichst kurzes Cts1-Exportsignal identifiziert werden, welches in dem geplanten Expressionssystem (siehe unten) eingesetzt werden sollte. Überraschenderweise stellte sich schließlich durch die Analyse des Gus-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-GTH produzierenden Stammes heraus, dass ausgerechnet der zuvor als mögliches unkonventionelles Signalpeptid diskutierte N-terminale Teil von Aminosäure 1 bis 103 für die Sekretion des Proteins entbehrlich ist (Abb. 2.3). Eine entsprechende N-terminal verkürzte Cts1¹⁰³⁻⁵⁰²-Gus-GTH Proteinvariante vermittelte wie das entsprechende Vollängenprotein Gus-Aktivität auf der Zelloberfläche, was ein Hinweis dar-

auf ist, dass Cts1 auch ohne N-Terminus mit der Zelloberfläche assoziiert bleibt. Diese These wurde zusätzlich durch Ergebnisse von Silke Jankowski (2013) unterstützt, die zeigen konnten, dass in *E. coli* hergestelltes und aufgereinigtes His-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰² ebenso wie das entsprechende Volllängenprotein an Chitin-Kügelchen binden kann. Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus von Cts1 weder für die Sekretion noch für die Lokalisierung an der Zellwand verantwortlich zu sein scheint.

Weiterhin stellt sich die Frage, auf welchem Wege Cts1 unkonventionell sekretiert wird und wie dieser Weg in Zusammenhang mit dem mRNA-Transport steht. Da selbst kürzeste Deletionen in dem C-Terminus von Cts1, wie die von nur 9 Aminosäuren, die Sekretion verhindern, kann vermutet werden, dass für die Sekretion von Cts1 nicht einzelne Primärsequenzen oder Sekundärstrukturen verantwortlich sind, sondern die Gesamtstruktur der Glyco_18-Domäne sowie das darauf folgende C-terminale Proteinende intakt bleiben müssen. Generell ist bekannt, dass am Aufbau von Chitin beteiligte Komponenten wie Chitinsynthasen über sogenannte Chitosomen zur wachsenden Hyphenspitze von filamentösen Pilzen transportiert werden (Bartnicki-Garcia, 2006). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass der Langstreckentransport solcher sekretorischen Vesikel in *U. maydis* auch über Mikrotubuli vermittelt werden könnte (Treitschke *et al.*, 2010). Geht man davon aus, dass Cts1 an der Umstrukturierung der Zellwand an den Wachstumszonen beteiligt ist, würde es Sinn machen, dass auch Cts1 mit diesen Chitosomen assoziiert wird. Für eine Chitinase aus *Candida albicans* wurde zwar auch die Assoziation mit Membranstrukturen in Form von Microsomen gezeigt, eine feste Zuordnung zu spezifischen Membrankomponenten oder Vesikeln wie Chitosomen schien es jedoch nicht zu geben (Dickinson *et al.*, 1991). Man könnte jedoch spekulieren, dass Chitinasen wie Cts1 im Verlauf der Sekretion eine schwache Bindung mit Komponenten an der Außenseite von Chitosomen eingehen und so zu ihrem Zielort gelangen.

Allgemein kann eine vesikelunabhängige Translokation über die Plasmamembran jedoch bislang nicht ausgeschlossen werden. Der konservierte Teil des N-Terminus von Cts1, welcher eine Ähnlichkeit zur Signalsequenz für das bakterielle TAT-Sekretionssystem besitzt, wird für die Sekretion zwar nicht benötigt könnte jedoch ein Hinweis darauf sein, dass solche bakteriellen Chitinasen im Zusammenspiel mit anderen Komponenten generell in der Lage sein könnten, Membranen zu überwinden.

Mit der Etablierung eines 'Screening-Systems' nach dem Vorbild der Gus-Reporterstämme und der Mutagenese entsprechender Stämme hätte man die Möglichkeit, Komponenten zu identifizieren, die an dem Sekretionsprozess beteiligt sind.

Abschließend stellt sich die Frage, warum Cts1 unkonventionell sekretiert wird und ob diese Art des Exports einen bestimmten Vorteil für diese Chitinase mit sich bringt. Geht man davon aus, dass Cts1 zusammen mit Chitinsynthasen an der Umstrukturierung der Zellwand beteiligt ist, könnte dieser Vorteil der unkonventionellen Sekretion darin liegen, dass der Export

der Chitinase und konventionell sekretierter Chitinsynthesen unabhängig voneinander reguliert werden kann und diese Enzyme so erst an ihrem Wirkungsort aufeinander treffen. Es wäre auch möglich, dass Cts1 unkonventionell sekretiert werden muss, um eine Glykosylierung oder das oxidierende Milieu im ER zu umgehen, die eine nicht-native Faltung des Proteins zur Folge haben könnten. Eine künstliche konventionelle Sekretion der Chitinase durch die Fusion des endogenen *cts1*-Gens mit einer entsprechenden Signalpeptidsequenz könnte Aufschluss darüber geben, ob die nichtkonventionelle Sekretion eine bestimmte Funktion für die Chitinase besitzt.

3.2 Die Funktion der Endochitinase Cts1

Chitin ist ein lineares, unlösliches Homopolymer aus β -1-4-verknüpften N-Acetylglucosaminen (GlcNAc). Die GlcNAc-Ketten können antiparallel zu α -Chitin oder parallel zu β -Chitin angeordnet sein. Zu den chitindegradierenden Enzymen gehören Endochitinasen, Exochitinasen und N-Acetylglucosamidasen. Endochitinasen katalysieren die Hydrolyse der β -1,4-Verknüpfungen an einem beliebigen Punkt der Polymerkette, wohingegen Exochitinasen Dimere von nichtreduzierten Polymerenden abspalten. N-Acetylglucosamidasen spalten einzelnes, nichtreduziertes GlcNAc von Polymeren und Dimeren ab. Chitin ist der Hauptbestandteil der Exoskelette von Invertebraten und eine essentielle Komponente der Zellwände von filamentösen Pilzen (Seidl, 2008). Dass lytische Enzyme wie Chitinasen eine wichtige morphologische Rolle bei der lokalen Umstrukturierung der Zellwand während des apikalen Wachstums und der Verzweigung von pilzlichen Hyphen spielen, ist schon seit langer Zeit bekannt (Humphreys & Gooday, 1984). Pilzliche Chitinasen können daneben auch zu Prozessen wie der Nährstoffversorgung oder dem Wettbewerb bzw. der Abwehr gegenüber anderen Pilzen oder Arthropoden beitragen (Seidl, 2008). Fluoreszenzmikroskopisch wurde Cts1 mit C-terminaler Gfp-Fusion in der subapikalen Wachstumszone, an eingezogenen Septen und der Zellwand leerer Abschnitte von Filamenten lokalisiert (Koepke *et al.*, 2011; S. Jankowski, Masterarbeit 2013). Dies spricht, zumindest unter anderem, für eine Funktion bei der Umstrukturierung der Zellwand während des filamentösen Wachstums. Hierzu passt auch, dass die chitinolytische Aktivität von endogenem Cts1 (Koepke *et al.*, 2011) und die Gus-Aktivität von C-terminal mit Gus fusioniertem Cts1 (Abb. 2.2 A) insbesondere auf der Zelloberfläche festzustellen waren. Ebenso deutet auch der Phänotyp von *cts1* Δ -Filamenten, der sich durch aggregieren der leeren Abschnitte und verstärktes haften an Glaswänden von Kolben oder Reagenzgläsern der Filamente auszeichnet, auf eine veränderte Zellwandstruktur hin (Koepke *et al.*, 2011; Koepke, 2010).

Da Chitinoligomere von Pflanzen als PAMPs ('pathogen-associated molecular patterns') wahrgenommen werden können (Wan *et al.*, 2008), ist es auch vorstellbar, dass Cts1 zu der Unterbindung der entsprechenden Immunantwort der Pflanze beiträgt. Während der Infektion der Pflanze können wirtseigene Chitinasen an der Pflanzenimmunantwort beteiligt sein, in-

dem sie Chitinoligomere von pilzlichem Chitin abspalten (Boller, 1995). An dem Tomatenpathogenen *Cladosporium fulvum*, konnte beispielhaft gezeigt werden, dass die Pflanzenpathogene ihrerseits wiederum in der Lage sind, Effektoren zu sekretieren, die eine daraus resultierende Immunantwort der Pflanze verhindern können. Das Lektin Avr4, welches eine hohe Affinität für langkettige Chitinmoleküle besitzt, bindet an pilzliches Chitin und kann dieses damit vor der Hydrolyse durch pflanzliche Endochitinasen schützen (van Esse *et al.*, 2007). Ein weiteres Effektorprotein aus *C. fulvum* ist das LysM-Domänen-enthaltende Lektin Ecp6. LysM-Domänen sind auch in bestimmten PRRs ('pattern recognition receptors') von Pflanzen zu finden, die Chitinstrukturen als PAMPs wahrnehmen. Über diese LysM-Domänen ist Ecp6 in der Lage, mit hoher Affinität an kürzere Chitinoligomere zu binden und verhindert so die Wahrnehmung dieser Strukturen als PAMPs (de Jonge *et al.*, 2010). Man könnte somit Vermutungen anstellen, dass auch Chitinasen über eine Degradierung der als PAMPs wahrnehmbaren Chitinoligomere zu GlcNAc-Monomeren oder durch die Bindung solcher Chitinstrukturen eine Immunabwehr der Pflanze abschwächen oder verhindern könnten. Ergebnisse dieser Arbeit, die vermuten lassen, dass Cts1 im Vergleich zu anderen sekretierten endogenen Proteinen wie Uml2 im Überstand deutlich instabiler sein könnte (Abb. 2.14), sprechen zwar eher gegen eine solche Annahme. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Cts1 während der Pflanzeninfektion extrazellulär stabiler sein könnte. Im Vergleich zu anderen filamentösen Pilzen, bei denen meist zwischen 10 und 25 Chitinasen im Genom kodiert sind (Seidl, 2008), besitzt *U. maydis* laut bioinformatischer Vorhersage nur drei Endochitinasen (*um10419*, *um02578*, *um06190*) und eine Exochitinase (*um00695*) (Koepke *et al.*, 2011). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diesen Chitinasen auch mehrere Funktionen zugeschrieben werden müssen. Da ein *cts1Δ*-Stamm jedoch keine morphologisch veränderten Filamente und keinen Pathogenitätsdefekt aufweist (Koepke *et al.*, 2011), ist es möglich, dass die beiden anderen Endochitinasen redundante Funktionen zu Cts1 haben. Für die Untersuchung dieser Redundanzen ist es von Vorteil, dass *U. maydis* nur diese vier Chitinasen besitzt. So sollten entsprechende Einzel-, Doppel-, Trippel- und Quatrupel-Deletionsstämme erstellt werden, die einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktionen von Chitinasen in pflanzenpathogenen Pilzen leisten könnten.

Weiterhin stellt sich die Frage, welche Rolle der N-Terminus bzw. die anderen Domänen für die biologische Funktion von Cts1 einnehmen. Allgemein haben Chitinasen häufig eine modulare Struktur mit unabhängig fungierenden katalytischen und nichtkatalytischen Domänen, die durch S/T-reiche Sequenzen verbunden sind (Colussi *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2012b). In Cts1 sind die ersten 40 Aminosäuren, die eine Sequenzähnlichkeit zu den TAT-Signalpeptiden von Bakterien aufweisen, durch eine S/T-reiche Sequenz von der katalytischen Glyco_18-Domäne getrennt. Bislang ist nur bekannt, dass Cts1 eine, wahrscheinlich über die Glyco_18-Domäne vermittelte Endochitinaseaktivität sowie Chitinbindefähigkeit be-

sitzt (Koepke *et al.*, 2011; S. Jankowski, Masterarbeit 2013), die anderen Domänen sind jedoch nicht weiter charakterisiert. Diese Arbeit konnte weiterhin zeigen, dass wie oben bereits erwähnt, der N-terminus nicht für die Sekretion von Cts1 benötigt wird und dass im Gegensatz dazu jegliche Modifikation der Glyco_18-Domäne oder des C-Terminus die Fähigkeit zur Sekretion verhindert. Da für TAT-Signalpeptide bekannt ist, dass sie in Bakterien an der Interaktion der entsprechenden Proteine mit Membranstrukturen oder Membranproteinen des TAT-Systems beteiligt sind (Zoufaly *et al.*, 2012), könnte spekuliert werden, dass diese modifizierte Sequenz in Eukaryonten wie *U. maydis* zur Interaktion mit Membranstrukturen oder Membranproteinen beitragen könnte. Für S/T-reiche Sequenzen in Chitinasen von Insekten wurde postuliert, dass sie die Enzyme vor Proteasen schützen und so zur Stabilisierung beitragen könnten (Arakane *et al.*, 2003). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum Gus-Cts1-GTH-Varianten mit verkürzten N-Termini, denen die S/T-reiche Sequenz fehlt, teilweise geringere Stabilität und damit reduzierte Gus-Aktivität aufwiesen (Abb. 2.3 und Abb.2.4). Andererseits ist die in der S/T-reichen Sequenz gefundene PEST-Domäne häufig in Proteinen zu finden, die eine hohe Instabilität aufweisen (Rogers *et al.*, 1986). Neben einer Funktion im Zuge des Abbaus durch das Proteasom wird für PEST-Domänen postuliert, dass sie als konditionelle Degradierungsmotive für die kalziumabhängige Protease Calpain fungieren könnten, die durch Phosphorylierung und Proteinbindung reguliert werden kann (Singh *et al.*, 2006). Für eine solche konditionelle proteolytische Spaltung von Cts1 spricht die Tatsache, dass in der Proteomanalyse der membranassoziierten Fraktion in Koepke *et al.* (2011) drei Proteinvarianten mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten gefunden wurden, von denen zwei Varianten deutlich unterschiedliche Massen aufwiesen. Außerdem wurden in zwei dieser Varianten keine Peptide des N-Terminus identifiziert (Koepke *et al.*, 2011). Für Chitinasen aus Insekten wurde postuliert, dass die konditionelle Spaltung an einer solchen PEST-Sequenz im Zuge der Häutung die Präferenz eines solchen Enzyms so verändern könnte, dass statt unlöslichen Polysacchariden nach der Spaltung eher löslichen Oligosaccharide als Substrat dienen (Pan *et al.*, 2012). Auch wenn in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass aus *E. coli* aufgereinigtes His-Cts1¹⁰³⁻⁵⁰² ohne PEST-Domäne in einem chitinolytischen Assay (Substrat: MUC) die gleiche Aktivität wie das entsprechende Vollängenprotein aufwies (S. Jankowski, Masterarbeit 2013), kann aufgrund des künstlichen Substrats und der möglichen konditionellen Funktion der PEST-Domäne nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Cts1-Funktion durch die PEST-Domäne und den N-Terminus moduliert werden könnte. Die Analyse eines Stamms, bei dem die Sequenz für den N-Terminus von Cts1 im endogenen Locus fehlt, könnte weitere Erkenntnisse über die Funktion dieser Proteinregion mit sich bringen.

3.3 Das Potential von *U. maydis* als Expressionsplattform

Auch wenn jedes Expressionssystem seine spezifischen Vor- und Nachteile hat, sind einige positive Eigenschaften vielen Systemen gemein und sind damit oft die Grundvoraussetzungen für neue Expressionplattformen. Hierzu zählen die für Mensch und Umwelt gefahrlose Nutzung des Systems, eine einfache genetische Manipulierbarkeit sowie eine möglichst kostengünstige und bis zum industriellen Maßstab steigerungsfähige Kultivierung des entsprechenden Organismus. Wie schon in der Einleitung beschrieben, erfüllt *U. maydis* diese Eigenschaften allgemein ausgezeichnet. In Bezug auf die genetische Zugänglichkeit kommt es in anderen Systemen häufig zu Problemen durch Polyploidie des Organismus (Bsp. *Candida utilis*), geringe Transformationseffizienz (Bsp. filamentöse Pilze) oder ungezielte genomische Insertion der Genelemente (Bsp. Säugerzellen) (Kunigo *et al.*, 2013, Ward, 2012, Zahn-Zabal *et al.*, 2001). In dieser Arbeit bestätigte die Anwendung des *cbx*-Insertionssystems (Broomfield & Hargreaves, 1992, Stock *et al.*, 2012) noch einmal die deutlichen Vorteile dieser, über homologe Rekombination vermittelten, stabilen Insertion von Expressionskassetten in den ektopischen *ip*-Locus haploider *U. maydis* Zellen. Dabei spiegelt der in Abbildung 2.1 dargestellte Southern Blot beispielhaft die meist hohe Transformationseffizienz wieder, die mit diesem System erzielt werden kann. Die hierbei ebenfalls auftretenden multiplen Insertionen können von Vorteil, da sie in Expressionssystemen gerne genutzt werden, um das optimale Expressionslevel für die Produktion eines bestimmten heterologen Proteins zu identifizieren (Gellissen *et al.*, 1992).

Ein wichtiges Argument für das in dieser Arbeit etablierte Expressionssystem ist die im Zuge der unkonventionellen Sekretion ausbleibende *N*-Glykosylierung der heterologen Proteine. Auch wenn Glykosylierungen für viele Proteine eine wichtige Funktion in Bezug auf die korrekte Faltung, die Stabilität oder die biologische Aktivität haben können (Mamedov *et al.*, 2012, Helenius & Aebi, 2001, Helenius & Aebi, 2004, Brocca *et al.*, 2000), gibt es auch Proteine bei denen Glykosylierungen ungünstige Auswirkungen haben. Dazu gehören insbesondere verminderte Interaktion mit anderen Proteinen, allergische Reaktionen beim Menschen oder der rasche Abbau solcher Glykoproteine im Blut (Al-Ghouleh, 2011; Ballew & Gerngross, 2004). Um dieses zu verhindern, werden solche Proteine häufig über teure, ineffiziente Expressionsplattformen wie Säugerzellen (Ballew & Gerngross, 2004) produziert, oder die glykosylierten Aminosäuren müssen aufwendig ausgetauscht werden (Crosnier *et al.*, 2011, Bartholdson *et al.*, 2012), wobei wiederum die Funktion des Proteins beeinträchtigt werden könnte. Das in dieser Arbeit entwickelte Expressionssystem würde da eine deutlich elegantere Methode bereitstellen, solche Proteine zu produzieren. Als Beispielproteine, für die eine Produktion mit diesem System sinnvoll sein könnte, sind *Plasmodium falciparum* Antigene zu nennen, mit denen die Herstellung eines gezielten Impfstoffes gegen Malaria möglich wäre. *Plasmodium*-Parasiten gehören zu den wenigen Eukaryonten, die keine *N*-

Glykosylierungsmaschinerie besitzen (Outchkourov *et al.*, 2008). Da entsprechende Proteine jedoch häufig potentielle Glykosylierungsstellen besitzen, könnten diese in eukaryotischen Expressionssystemen glykosyliert werden, wodurch potentielle Interaktionsstellen maskiert werden könnten (Bartholdson *et al.*, 2012). Andererseits ist aufgrund der meist komplexen Tertiärstruktur eine Expression in prokaryotischen Systemen aufgrund fehlender posttranslationaler Modifikationen schwierig (Outchkourov *et al.*, 2008). Hier könnte das vorgestellte Expressionssystem eine Möglichkeit darstellen, solche Proteine wie erwünscht unglykosyliert und mit der entsprechend nativer Faltung zu produzieren.

Gerade bakterielle Systeme haben meist das Problem, dass große cytoplasmatische Proteine nicht sekretiert werden können (Baneyx, 1999). In dieser Arbeit konnte die Gus-Aktivität eines Gus-Cts1-GTH Fusionsproteins mit einer molekularen Masse von 173 kDa in Überständen detektiert werden. Drei verschiedene Lipase-SHH-Cts1 Fusionsproteine mit Molekulargewichten zwischen 99 bis 102 kDa konnten mittels Western Blot-Analyse, wenn auch nur sehr schwach, in voller Länge im Überstand nachgewiesen werden. Dieses zeigt, dass über den unkonventionellen Cts1-Sekretionsmechanismus ein Co-Transport von relativ großen Proteinen möglich ist.

Als derzeit größter Schwachpunkt des hier vorgestellten Systems hat sich die nur sehr geringe Ausbeute an heterologem Protein herausgestellt. Eine erste Quantifizierung des im Überstand befindlichen Gus-Reporterproteins unter für die Expression nicht optimierten Bedingungen, ergab eine Konzentration in der Größenordnung von einem Mikrogramm pro Liter einer Kultur mit einer optischen Dichte von eins. Gerade in filamentösen Pilzen stellen sekretierte Proteasen häufig ein Problem für die extrazelluläre Produktion heterologer Proteine dar (Demain & Vaishnav, 2009). Auch in dieser Arbeit deuten die Ergebnisse allgemein darauf hin, dass die geringen Konzentrationen in Überständen nicht auf eine schwache Sekretion der Fusionsproteine, sondern auf eine starke proteolytische Degradierung der heterologen Proteine im Überstand zurückzuführen ist. Einen Hinweis darauf, dass die über Cts1 vermittelte Sekretion effizient zu sein scheint, gibt die Western Blot-Analyse von gefällten Proteinen aus den Überständen von Lipase-Fusionsprotein produzierenden Stämmen (Abb. 2.14). Hier zeigte sich, dass sowohl von konventionell als auch unkonventionell sekretierten Lipase-Fusionsproteinen die gleichen geringen Mengen an Vollängenprotein nachweisbar waren, was auch auf eine vergleichbare Sekretion der Proteine hindeutet. Die für das konventionell sekretierte Uml2-SHH-Cts1 Fusionsprotein zusätzlich auftretende Abbaubande, bei der es sich vermutlich um stabiles Uml2-SHH handelt, zeigt jedoch wie stark die durch den *otef*-Promotor vermittelte Expression ist und damit auch wie stark die Sekretion zu sein scheint. Dass die Sekretionskapazität bisher kein limitierender Faktor ist, wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass in weiteren Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe durch multiple Insertionen (unveröffentlichte Daten) oder die Verwendung von stärkeren Promotoren (M.

Reindl, Bachelorarbeit 2013) deutlich höhere Gus-Aktivitäten im Überstand erzielt werden konnten. So zeigte die Nutzung des sehr starken *oma*-Promotors (Hartmann *et al.*, 1999, Flor-Parra *et al.*, 2006) in einem entsprechenden Gus-Reporterstamm in ersten Analysen eine 30-fache Erhöhung der Gus-Aktivität im Überstand (M. Reindl, Bachelorarbeit 2013). Dieses zeigt zum einen, welches Potential noch in dem bisher nicht weiter optimierten Expressionssystem steckt, es macht aber auch einen möglichen weiteren Vorteil gegenüber der konventionellen Sekretion über das ER deutlich. In Hefen konnte bei der Analyse von Stämmen mit unterschiedlichen multiplen Insertionen festgestellt werden, dass zusätzliche Expression nur bis zu einem bestimmten Punkt auch zu einer erhöhten Produktion führt, da Proteine sonst aufgrund einer Überlastung der aufwendigen Faltungsmaschinerie im ER zurückbleiben und schließlich abgebaut werden können (Parekh *et al.*, 1995, Damasceno *et al.*, 2012). Da dieser häufig genannte 'bottleneck' bei der durch Cts1 vermittelten Sekretion umgangen wird, könnte es auch bei extrem gesteigerter Expression noch zu entsprechend erhöhter Sekretion des Produktes kommen. Um die sekretierten Proteine zukünftig nichtmehr durch die hohe proteolytische Aktivität im Überstand zu verlieren, ist die Identifizierung und die Deletion der dafür verantwortlichen Proteasen das wohl wichtigste Ziel unserer Arbeitsgruppe (Parveen Sarkari). In vielen Fällen waren solche proteasedefizienten Stämme ein wichtiger Grundstein für erfolgreiche Expressionssysteme (Murashima *et al.*, 2002, Archer *et al.*, 1992, White *et al.*, 1995, Broekhuijsen *et al.*, 1993). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch das hier vorgestellte Expressionssystem das bereits diskutierte große biotechnologische Potential des Basidiomyceten *U. maydis* (Feldbrügge *et al.*, 2013) bekräftigt und künftig durch weitere Optimierung ein nutzbares Expressionssystem entstehen könnte.

3.4 Heterologe Expression von Lipasen

Lipasen (EC 3.1.1.3) sind lipolytische Enzyme, die im Gegensatz zu den Esterasen (EC 3.1.1.1) auch in der Lage sind, langkettige, wasserunlösliche Triglyceride zu hydrolysieren und damit in Glycerin und Fettsäuren zu spalten. Das aktive Zentrum dieser Serin-Hydrolasen bildet in der Regel eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Asparaginsäure (oder Glutaminsäure) und Histidin, wobei das Histidin meist in einem G-x-S-x-G Konsensusmotiv konserviert ist (Ollis *et al.*, 1992, Arpigny & Jaeger, 1999). Bei Lipasen ist das aktive Zentrum häufig durch einen sogenannten 'lid' (Deckel) abgedeckt und wird erst im Zuge der Grenzflächenaktivierung, wenn das Enzym zwischen hydrophober und hydrophiler Phase liegt, zugänglich (Brzozowski *et al.*, 1991). Während sie in wässrigen Lösungen eher die Hydrolyse von Estern vermitteln, wird in organischen Lösungsmitteln auch die gegensätzliche Reaktion katalysiert (Blank *et al.*, 2006). Zu den industriell am häufigsten genutzten Lipasen gehört CalB, die sich durch eine hohe Thermostabilität, eine breite Substratspezifität und hohe Selektivität auszeichnet (Jung & Park, 2008). Die Aktivität ist in organischen Lösungen mit denen in wässrigen Lösungen vergleichbar und nicht von einer Grenzflächenakti-

vierung abhängig (Martinelle & Hult, 1995, Martinelle *et al.*, 1995). CalB wird aufgrund seiner Stereoselektivität unter anderem für die Racematspaltung von Alkoholen, Aminen und Säuren genutzt. Außerdem kann CalB zur Produktion von Biodiesel und zur Synthese von Polymeren eingesetzt werden (Anderson *et al.*, 1998, Kirk & Christensen, 2002).

Lipasen stellen ein gutes Testenzym für Proteinexpressionssysteme dar, da sie in der Biotechnologie einerseits zu den am häufigsten angewendeten Enzymen in der organischen Chemie gehören, deren biotechnologisches Potential ständig ansteigt (Jaeger & Reetz, 1998, Kapoor & Gupta, 2012). Andererseits stellen diese hydrophoben Proteine für viele Expressionssysteme eine Herausforderung dar (Jung & Park, 2008, Larsen *et al.*, 2008).

Die industriell wichtige Lipase CalB wurde zwar bereits in vielen eukaryotischen Organismen wie *P. pastoris*, *S. cerevisiae* und *A. oryzae* produziert (Rotticci-Mulder *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003, Høegh *et al.*, 1995). Eine erfolgreiche Expression von aktivem CalB in *E. coli* ist jedoch in der Regel schwierig (Liu *et al.*, 2006, Larsen *et al.*, 2008), weshalb verschiedenste aufwendige Methoden angewendet werden, um dies zu ermöglichen. So wurde CalB ins Periplasma sekretiert oder mit Thioredoxin fusioniert, um die Bildung der Disulfidbrücken zu unterstützen, Chaperone wurden koexprimiert, um eine bessere Faltung zu gewährleisten oder hydrophobe Aminosäuren wurden ausgetauscht, um IBs zu verhindern (Blank *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Jung & Park, 2008). Für die Produktion in Eukaryonten werden meist die Signalpeptide der jeweiligen Wirte oder von CalB selbst eingesetzt (Blank *et al.*, 2006), durch die CalB über den konventionellen Sekretionsweg ins Medium gelangt und womit posttranskriptionelle Modifikationen ermöglicht werden.

Die von Chow *et al.* (2012) aus dem Metagenom einer Heizungsanlage isolierte thermostabile Lipase LipT stammt vermutlich aus einem nahen Verwandten des Bakteriums *Thermus scotoductus*. Das Enzym besitzt bei einer Temperatur von 70 °C eine Halbwertszeit von drei Stunden. Es hat ein Temperaturoptimum von 75 °C und ein pH-Optimum von pH 8. Es ist in der Lage, Fettsäureester mit längeren Kohlenstoffketten (C12 - C14) zu hydrolysieren. LipT konnte zwecks dieser Analysen in *E. coli* produziert werden, wies jedoch im Vergleich zu anderen Lipasen eine deutlich geringere spezifische Aktivität auf (Chow *et al.*, 2012). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ein großer Teil der in *E. coli* produzierten Lipase aufgrund nicht nativer Faltung inaktiv war. Aufgrund der in *U. maydis* ablaufenden nichtkonventionellen Sekretion, die vermutlich im Zusammenhang mit Endosomentransport entlang von Mikrotubuli steht (Koepke *et al.*, 2011; Baumann *et al.*, 2012), waren solche Lipasen ein gute Möglichkeit, zu testen, ob mit diesem System auch hydrophobere Proteine produziert werden können, die bestimmte posttranslationale Modifikationen benötigen. Da die Quantifizierung von Gus-SHH-Cts1 (Abb. 2.6) suggerierte, dass nur relativ geringe Proteinmengen im Überstand zu erwarten waren und lipolytische Aktivitäten möglicherweise durch CalB-typische Hintergrundaktivitäten überdeckt worden wären, wurde die heterologe Expression der Lipa-

sen in einem AB33uml2Δ Stamm durchgeführt (siehe unten). Die Analyse des *uml2*-Deletionsstamms zeigte, dass die CalB-Typ Lipase Uml2 die Hydrolyse von Polysorbaten wie Tween20 und Tween80 vermitteln kann und dass bei Abwesenheit dieser Lipase keinerlei Hintergrundaktivität zu erwarten ist (Abb. 2.9). Dass diese Polysorbate auch zur Analyse von CalB geeignet sind, wurde im Zuge der Etablierung eines Polysorbat-Assays bestätigt, für die aus *P. pasoris* aufgereinigtes CalB-Myc-His und Uml2-Myc-His Fusionsprotein verwendet wurde (Abb. 2.10). Es stellte sich heraus, dass der etablierte Polysorbat-Assay für die hier gezeigte Anwendung einige Vorteile gegenüber anderen häufig genutzten Lipase-Assays hat, bei denen Substrate wie chromogene p-Nitrophenyl- oder fluorogene 4-Methylumbelliferyl-Derivate verwendet werden. Solche Substrate sind während langer Inkubationen nicht stabil, weshalb Enzymreaktionen nur über einen Zeitraum von einigen Minuten analysiert werden können (Plou *et al.*, 1998, Tamalampudi *et al.*, 2007, Kumar *et al.*, 2012). Substrate mit relativ kurzkettigen Fettsäuren (z.B. Butyrat) haben den Nachteil, dass sie auch von Esterasen, im Falle von p-Nitrophenyl-Butyrat auch von Proteasen und nicht-enzymatischen Proteinen, hydrolysiert werden können (Gilham & Lehner, 2004). Dies macht sie für die Anwendung zur Analyse von Zellextrakten und Überständen ungünstig. Bei dem Versuch, die spezifische Uml2-Aktivität in Überständen und Zellextrakten unter Verwendung von p-Nitrophenyl-Butyrat und 4-Methylumbelliferyl-Butyrat als Substrat nachzuweisen (Ergebnisse nicht gezeigt), konnten folglich auch nur unspezifische lipolytische Aktivitäten festgestellt werden, die auf andere Lipasen, Esterasen und andere hydrolytische Enzyme zurückzuführen sein könnten. Entsprechende Substrate mit langkettigen Fettsäuren haben den Nachteil, dass sie eine geringe Löslichkeit in wässrigen Lösungen aufweisen (Tigerstrom & Stelmaschuk, 1989), könnten den Nachweis der Lipasen jedoch bei ausreichender Sensitivität ermöglichen. Bei der Etablierung des Polysorbat-Assays zeigte sich, dass auch nach Inkubationen von 24 Stunden eine Instabilität der Substrate kaum festzustellen war (Abb. 2.11 und 2.14 B). Somit war es möglich, auch geringe Uml2-Myc-His- bzw. CalB-Myc-His-Konzentrationen von 10 ng/ml zu detektieren (Abb. 2.11). Damit wurde in dieser Arbeit ein sensitiver lipolytischer Assay etabliert, mit dem selektiv die Aktivität von CalB-Typ Lipasen wie Uml2 und CalB in Proteinsuspensionen wie Überständen und Zellextrakten von *U. maydis* analysiert werden kann.

In Zellextrakten der schließlich erstellten Lipase-Expressionsstämme konnte die Produktion aller Lipasefusionsproteine zwar gezeigt werden, lipolytische Aktivität konnte jedoch nur für das konventionell sekretierte Sp-Uml2-SHH-Cts1 bestätigt werden (Abb. 2.13). Die cytoplasmatischen Lipasefusionsproteine, welche über die Cts1-Sekretionsmaschinerie sekretiert werden sollten, waren unter den getesteten Bedingungen inaktiv. Da der extrazelluläre Raum in Bezug auf Ionenzusammensetzung und Redoxpotential meist mehr dem ER ähnelt als dem Cytoplasma (Anelli & Sitia, 2008), wäre es denkbar gewesen, dass diese cytoplasma-

tisch inaktiven Lipasefusionsproteine erst extrazellulär die native Konformation eingenommen hätten. Die Ergebnisse der Analyse der Überstände deuten schlussendlich jedoch darauf hin, dass die Lipasefusionsproteine zwar über die Cts1-Sekretionsmaschinerie in den Überstand exportiert werden können, eine lipolytische Aktivität aber auch hier nicht feststellbar ist (Abb. 2.14). Da für die Lipase LipT in dieser Arbeit nicht bestätigt wurde, dass deren Aktivität mit dem Polysorbat-Assay gemessen werden kann, darf hier nicht ausgeschlossen werden, dass LipT diese Substrate nicht hydrolysieren kann und somit vorhandenes aktives LipT nicht detektiert wurde. Dagegen spricht jedoch, dass auch unter der Verwendung anderer lipolytischer Assays (p-Nitrophenyl-Butyrat) und bei höheren Temperaturen (60 °C) keine Aktivität für LipT festzustellen war (Daten nicht gezeigt). Konventionelle Sekretion des Uml2-SHH-Cts1 Fusionsproteins führte hingegen zu einer deutlichen lipolytischen Aktivität im Überstand. Eine Western Blot-Analyse mit Proteinen aus Überständen gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Cts1-Fusionsproteine im Überstand allgemein sehr instabil sind. Nur konventionell sekretiertes und vermutlich durch proteolytische Aktivität entstandenes Uml2-SHH scheint relativ stabil im Überstand zu akkumulieren (Abb. 2.14 A). Somit stellte sich die Frage, warum die nichtkonventionell sekretierten Lipasefusionsproteine inaktiv sind und konventionell sekretiertes Uml2 nicht nur aktiv sondern auch deutlich stabiler zu sein scheint.

Da ein bereits bekannter Unterschied zwischen der konventionellen und der hier vorgestellten unkonventionellen Sekretion über Cts1 die beim letzteren ausbleibende *N*-Glykosylierung ist, wurden die Auswirkungen einer fehlenden Uml2 *N*-Glykosylierung näher untersucht. Dass konventionell sekretiertes Uml2-Fusionsprotein in *U. maydis* *N*-glykosyliert wird, konnte durch eine PNGaseF-Behandlung und anschließende Western Blot-Analyse von aus Zellextrakten gereinigten Uml2-Fusionsproteinen bestätigt werden, da die anzunehmende Uml2-SHH-Abbaubande durch die Deglykosylierung verschoben war (Abb. 2.15). Da diese Uml2-SHH-Abbaubande für das unkonventionell sekretierte Uml2-SHH-Cts1 nicht detektiert werden konnte, wurde die fehlende *N*-Glykosylierung hier zwar nicht bestätigt, das Fehlen dieser Bande könnte jedoch im Gegenzug ein Hinweis auf eine Instabilität dieses Proteins aufgrund der fehlenden *N*-Glykosylierung sein. Weiter unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass nur konventionell sekretiertes und daher *N*-glykosyliertes Uml2-SHH-Abbauprodukt im Überstand stabil zu sein scheint (Abb. 2.14). Es ist bekannt, dass Glykosylierungen Auswirkungen auf die Aktivität, die Faltung sowie die Stabilität von Proteinen haben können (Helenius & Aebi, 2004, Brocca *et al.*, 2000, Russell *et al.*, 2009). Da es für CalB Hinweise dafür gibt, dass die *N*-Glykosylierung nicht für die Aktivität des Proteins notwendig ist (Blank *et al.*, 2006), war zu vermuten, dass auch Uml2 Aktivität durch die fehlende *N*-Glykosylierung nicht beeinträchtigt werden sollte. Die Analyse der lipolytischen Aktivität von durch PNGaseF partiell deglykosyliertem Uml2-Myc-His zeigte keine Veränderung im Vergleich zur *N*-glykosylierten Variante (Abb. 2.16), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass *N*-

Glykosylierung für die Aktivität abdingbar ist. Geht man hiervon aus, stellt sich die Frage nach anderen Gründen für die fehlende Aktivität der unkonventionell sekretierten Lipasefusionsproteine. Dass eine C-terminale Fusion von Tags für die Aktivität der Lipasen Uml2, CalB und LipT normalerweise problemlos ist, wurde mehrfach gezeigt (Buerth *et al.*, 2014; Blank *et al.*, 2006; Tamalampudi *et al.*, 2007; Rotticci-Mulder *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2012). Ein kompletter Funktionsverlust aufgrund der C-terminalen Fusion mit SHH-Cts1 ist daher unwahrscheinlich.

Propeptide können als intramolekulare Chaperone fungieren, die für die native Faltung eines Proteins unabdingbar sind (Wang *et al.*, 2012). Auch wenn CalB ein Propeptid besitzt (Abb. 2.8 A), dessen Funktion bisher nicht näher bekannt ist (Larsen *et al.*, 2008), ist es unwahrscheinlich, dass CalB-SHH-Cts1 aufgrund des fehlenden Propeptids inaktiv ist, da eine unveränderte CalB Aktivität ohne Propeptid bereits mehrfach und in verschiedenen Organismen gezeigt wurde (Blank *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2008). Für Uml2 und LipT werden hingegen Signalpeptide, aber keine Propeptide vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; <http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>).

Die komplexe Tertiärstruktur von CalB erfordert die Bildung von drei Disulfidbrückenbindungen (Abb. 2.8 A), um eine funktionelle Konformation zu erreichen (Liu *et al.*, 2006) und für Uml2 werden die gleichen Disulfidbrücken vorausgesagt (Buerth *et al.*, 2014). Da die Produktion von CalB in *E. coli* vermutlich aufgrund fehlender Unterstützung der Faltung und Disulfidbrückenbildung oft schwierig ist (Blank *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Jung & Park, 2008), muss in Betracht gezogen werden, dass auch bei dem hier vorgestellten unkonventionellen Sekretionsmechanismus eine solche Faltungsunterstützung zu den nativen Lipasen ausbleibt. Damit könnte die Instabilität der unkonventionell sekretierten Lipasen auch auf die nicht native Faltung zurückzuführen sein. Da eine solche Fähigkeit zur Unterstützung der nativen Faltung von Proteinen jedoch ein wichtiges Argument für dieses Expressionssystem gegenüber *E. coli* ist, sollte künftig getestet werden, ob bei der Cts1-vermittelten Sekretion eine Unterstützung der Disulfidbrückenbildung und Faltung von ähnlich anspruchsvollen Proteinen möglich ist. Vier vorhandene Cysteinreste und zwei bioinformatisch vorhergesagte Disulfidbrücken in der Cts1-Proteinsequenz (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>) sprechen dafür, dass Disulfidbrückenbildung generell möglich sein sollte. Es könnte weiter auch untersucht werden, ob sich inaktive Lipasefusionsproteine durch veränderte Bedingungen wie pH, Temperatur oder Ionenzusammensetzung in eine native, aktive Form bringen lassen.

3.5 Die CalB-Typ Lipase Uml2

Mit dem Hauptziel die lipolytische Hintergrundaktivität zu reduzieren, um heterolog exprimierte Lipasen wie CalB analysieren zu können (siehe oben), wurden im Zuge dieser Arbeit auch die Auswirkungen der Deletion einer CalB-Typ Lipase (Uml2) in *U. maydis* untersucht. Da es

sich um ein für die Biotechnologie möglicherweise interessantes Enzym handelt (Buerth *et al.*, 2014), wurden die zugehörigen Deletionsstämme weiterführend charakterisiert. Uml2 besteht aus 336 Aminosäuren und besitzt ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 35 kDa (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>). Die hohe Identität von 66% zwischen CalB und Uml2 (Abb. 2.8 A) erklärt sich durch die bekannt nahe Verwandtschaft der Basidiomyceten *P. aphidis* und *U. maydis*, aus denen sie stammen (Uppenberg *et al.*, 1995; Feldbrügge *et al.*, 2013). Die vergleichende Analyse der lipolytischen Aktivität des AB33-Vorläuferstammes und des AB33uml2 Δ Stammes zeigte, dass Uml2 in *U. maydis* als aktive Lipase fungiert. Indikatorplatten-Assays mit den Substraten Tributyrin, Tween20 und Tween80 bestätigten, dass dabei sowohl die Hydrolyse von Triglyceriden mit kurzen Kohlenstoffketten (C3) als auch die Freisetzung von langkettigen Fettsäuren (C12 und C18) möglich ist. Für Uml2 wird wie für CalB ein N-terminales, 19 Aminosäuren langes Signalpeptid vorhergesagt (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), was auf eine konventionelle Sekretion des Proteins hindeutet. In dieser Arbeit konnte die Sekretion von aktivem Uml2 durch eine vergleichende Sekretomanalyse der Stämme AB33 und AB33uml2 Δ (Abb. 2.8 C) sowie eine Analyse der lipolytischen Aktivität in Überständen dieser beiden Stämme (Abb. 2.9 B) bestätigt werden. Die Tatsache, dass die N-Glykosylierung eines Sp-Uml2-SHH-Cts1 Fusionsproteins durch die Behandlung mit PNGaseF bestätigt werden konnte (Abb. 2.15), ist ein weiteres Indiz für eine konventionelle Sekretion von Uml2 über ER und Golgi-Apparat.

Vergleicht man die lipolytischen Aktivitäten in Überständen von dichten AB33 Kulturen (Abb. 2.9 B) mit den Aktivitäten definierter Uml2-Myc-His Mengen (Abb. 2.10 B), um sekretiertes Uml2 zu quantifizieren, so ergibt sich daraus eine Proteinmenge von fast 1,5 mg pro Liter Kultur. Hier muss jedoch vermutet werden, dass die tatsächliche Uml2-Konzentration deutlich niedriger sein könnte, da das für die Quantifizierung verwendete, aus *P. pastoris* aufgereinigte, Uml2-Myc-His deutlich geringere Aktivität besitzen könnte als endogenes Uml2. Für eine deutlich geringere Konzentration spricht auch die Sekretomanalyse der Stämme AB33 und AB33uml2 Δ (Abb. 2.8 C), die eher für eine Uml2-Konzentration von etwa 0,1 mg/L sprechen würde.

Vergleichende Analysen der lipolytischen Aktivitäten von aus *P. pastoris* aufgereinigten Uml2-Myc-His und CalB-Myc-His Fusionsproteinen mit einem Tween20- bzw. Tween80-Assay deuten darauf hin, dass Uml2 diese unnatürlichen Substrate mit relativ langen Kohlenstoffketten besser umsetzen kann als CalB. Aufgrund der Struktur dieser Polysorbate gab es die Vermutung, dass Uml2 natürlicherweise auch die Hydrolyse von Phospholipiden katalysieren könnte. Eine von Filip Kovacic (Institut für Molekulare Enzymtechnologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführte lipolytische Aktivitätsanalyse mit gereinigtem CalB und Uml2, unter Verwendung von Phosphatidylcholinen mit unterschiedlichen Kohlenstoffkettenlängen (C6 - C18) als Substrate bekräftigten diese These schließlich (Buerth *et al.*,

2014). Während Uml2 eine signifikante Phospholipase A Aktivität gerade für die längerkettigen Phospholipide (C12 und C18) aufwies, konnte für CalB keine Phospholipaseaktivität festgestellt werden (Buerth *et al.*, 2014). Sowohl bei der Analyse mit Polysorbaten (diese Arbeit) als auch mit Phosphatidylcholinen (Buerth *et al.*, 2014) zeigte sich, dass Uml2 die stärkste Aktivität für Substrate mit langen Fettsäuren von 18 Kohlenstoffatomen besaß. Ein möglicher Grund für diese erweiterte Substratspezifität von Uml2 gegenüber CalB könnte in der 3D Struktur von Uml2 gesehen werden, die von Buerth *et al.* (2014) auf Grundlage der CalB-Struktur (Uppenberg *et al.*, 1994) bioinformatisch modelliert wurde. Hierzu wurde postuliert, dass bestimmte Aminosäureaustausche im aktiven Zentrum von Uml2 zu einer im Vergleich zu CalB veränderten Substratbindestelle führen (Buerth *et al.*, 2014). Die Erkenntnis, dass Uml2 auf der einen Seite große Ähnlichkeit zu der industriell genutzten Lipase CalB besitzt und sich auf der anderen Seite durch eine zusätzliche Phospholipaseaktivität deutlich von dieser Lipase abgrenzt, ist ein Hinweis darauf, dass Uml2 für biotechnologische Anwendungen interessant werden könnte. Durch weitere Analysen dieser Lipase gerade in Bezug auf Synthesereaktionen sowie Regio- und Sterioselektivität dieser Katalysen könnten aufzeigen, dass Uml2 eine vielversprechende Ergänzung zu den bereits genutzten Lipasen wie CalB darstellen könnte.

Auffällig war, dass bei der Analyse der Uml2-Aktivität mit Polysorbaten eine verzögerte Umsetzung des Substrats Tween80 festzustellen war (Abb. 2.9 A). Dies könnte auf eine Art kooperativen Effekt hindeuten, bei dem das Produkt zur Steigerung der Aktivität beiträgt. Eine solche abrupte Aktivierung konnte auch für Phospholipasen festgestellt werden, für die vermutet wird, dass eine Aktivierung der entsprechenden Dimere erst bei einer bestimmten Produktkonzentration stattfindet (Bell & Biltonen, 1992).

Mikrobielle Lipasen werden häufig während der späten logarithmischen oder stationären Phase produziert (Aravindan *et al.*, 2007). Auch für Uml2 waren hohe Aktivitäten insbesondere bei hohen optischen Dichten, nach längerem Andauern der stationären Phase zu messen. Da bei diesen Experimenten keine weiteren Lipide zugegeben wurden, kann vermutet werden, dass Uml2 unter diesen Bedingungen zur Hydrolyse eigener Lipide und Phospholipide der abgestorbenen Zellen beitragen könnte. Allgemein ist die Produktion von Lipasen von vielen Faktoren wie Temperatur, pH, Stickstoff-, Kohlenstoff- und Lipidquellen, Schüttler-/Rührgeschwindigkeit und Sauerstoffkonzentration abhängig und kann durch die Anwesenheit von Triglyceriden, Fettsäuren, hydrolysierbaren Estern, Gallensalzen oder Glycerin induziert werden (Ghosh *et al.*, 1996). Hohe Uml2-Konzentrationen konnten nur durch die Kultivierung in Reagenzglasern, jedoch nicht in Schüttelkolben erreicht werden. Dass die Kultivierung in Schüttelkolben und die damit verbundene hohe Sauerstoffkonzentration für die Lipaseproduktion ungünstig sein kann, wurde auch für andere Mikroorganismen gezeigt (Ghosh *et al.*, 1996). Somit kann vermutet werden, dass auch Uml2 gerade bei geringer Sauerstoff-

konzentration produziert wird. Die bei den Indikator-Plattentests (Abb. 2.8 B) festgestellten Uml2-Aktivitäten waren nur in Abwesenheit von Glukose festzustellen, was ein Anzeichen dafür sein könnte, dass die Uml2-Produktion durch Glukose unterbunden wird. Im Einklang mit diesem Ergebnis konnte reduzierte Lipase-Produktion in Anwesenheit von Glukose auch für Pilze wie *Rhizopus oligosporus* oder *Candida rugosa* gezeigt werden (NAHAS, 1988, Dalmau *et al.*, 2000). Eine vergleichende Wachstumsanalyse der Stämme AB33 und AB33uml2 Δ nach Zugabe der Substrate Tween20 und Tween80 deutet darauf hin, dass diese Substrate in Relation zu Glukose kaum zum Wachstum der Stämme beitragen können. Dennoch kann auf Grundlage dieser Ergebnisse vermutet werden, dass insbesondere Tween80 durch vorhandenes Uml2 besser metabolisiert werden kann. Weitere Analysen der Bedingungen, unter denen Uml2 vermehrt produziert wird und unter denen Uml2 zu einem verbesserten Wachstum beiträgt, könnten Aufschluss darüber geben, welche Funktion Uml2 natürlicherweise in *U. maydis* einnimmt.

Die wichtigste Rolle extrazellulärer Lipasen von Mikroorganismen liegt allgemein in der Zersetzung von Lipiden zur Nährstoffversorgung, insbesondere wenn diese Lipide die einzige Kohlenstoffquelle darstellen (Stehr *et al.*, 2003). Auch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse und gerade das festgestellte breite Substratspektrum machen eine solche Funktion auch für Uml2 wahrscheinlich. Sekretierte Lipasen und Phospholipasen können auch zur Virulenz pathogener Pilze beitragen (Voigt *et al.*, 2005, Ghannoum, 2000). Phospholipasen können die Zellmembranen der Wirtszellen destabilisieren und damit die Zelllyse verursachen, es wird jedoch auch vermutet, dass sie Prozesse wie Signaltransduktion, Ausschüttung von Cytokinen oder Immunantwort von Wirten beeinflussen könnten (Ghannoum, 2000). Auch wenn für einen solopathogenen SG200uml2 Δ Stamm in ersten Infektionsstudien keine reduzierte Pathogenität festzustellen war (M. Terfrüchte, Bachelorarbeit 2011), könnte Uml2 unter natürlicheren Bedingungen zum erfolgreichen Maisbefall beitragen.

3.5 Ausblick

Mit den durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnissen eröffnen sich sowohl in Bezug auf die Grundlagenforschung als auch auf mögliche biotechnologische Anwendungen viele neue Forschungsschwerpunkte.

Die Tatsache, dass *U. maydis* im Vergleich zu anderen filamentösen Pilzen wesentlich weniger Chitinasen besitzt, macht bereits deutlich, dass zukünftige Untersuchungen dieser Chitinasen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Funktion solcher Chitinasen in pathogenen filamentösen Pilzen leisten könnten. Aufgrund der unkonventionellen Sekretion ist Cts1 hier von besonderem Interesse. Das hier vorgestellte Gus-Reportersystem könnte unter Verwendung stärkerer Promotoren den Aufbau eines 'screening'-Systems ermöglichen, um an dem Sekretionsmechanismus beteiligte Komponenten zu identifizieren. Daraus gewonnene neue Erkenntnisse wären nicht nur in Bezug auf die bisher noch relativ unerforschten un-

konventionellen Sekretionsprozesse interessant, sie würden auch als wichtige Grundlage dienen, um das hier vorgestellte Expressionssystem zu verbessern.

Bezogen auf dieses Expressionssystem sollte der Fokus der zukünftigen Weiterentwicklungen insbesondere auf die derzeit hohe proteolytische Aktivität gelegt werden. Entsprechende Protease-Deletionsstämme werden derzeit bereits entwickelt und analysiert und versprechen deutlich höhere Ausbeuten (Parveen Sarkari). Als weiterer Schwerpunkt sollte zukünftig mit weiteren anspruchsvollen Proteinen untersucht werden, ob bei der Cts1-abhängigen Sekretion auch die Faltung und Bildung von Disulfidbrücken unterstützt wird, da dies ein wichtiges Argument gegenüber anderen Expressionssystemen wie *E. coli* wäre.

Auch die Analyse der Uml2 Lipase ist sowohl vom wissenschaftlichen Standpunkt gesehen als auch in Bezug auf eine biotechnologische Anwendung von großem Interesse. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Uml2 eine der wichtigsten extrazellulären Lipasen von *U. maydis* zu sein scheint. Weitere Wachstumsanalysen mit unterschiedlichsten Lipidsubstraten könnten Aufschluss über das natürliche Substrat und die Funktion von Uml2 geben. Da insbesondere für Phospholipasen bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle bei der Infektion von pathogenen Pilzen spielen können, könnte auch Uml2 weiter auf eine solche Funktion hin untersucht werden. Die Analysen dieser Arbeit zeigten, dass Uml2 insbesondere bei hohen optischen Dichten und während späterer Wachstumsphasen aktiv ist. Sollte dies auf den entsprechenden Promotor zurückzuführen sein, könnte dieser für biotechnologische Zwecke genutzt werden, um hohe Expressionen auch in dichtgewachsenen Fermenterkulturen zu gewährleisten. Die Identifizierung entsprechender Induktoren und Repressoren, könnte einen solchen Promotor zu einem wichtigen Werkzeug für die biotechnologische Nutzung von *U. maydis* machen. Darüber hinaus könnte sich auch die Uml2 Lipase selbst aufgrund seiner Ähnlichkeit zu CalB und der zusätzlichen Aktivität für Phospholipide zu einem wichtigen biotechnologisch genutzten Produkt entwickeln. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass Uml2 relativ stabil im Überstand von *U. maydis* akkumuliert, könnte dieser natürliche Wirt schließlich zur Produktion dieser Lipase dienen.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Bezugsquellen

4.1.1 Chemikalien, Enzyme und Kits

Chemikalien:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den folgenden Firmen bezogen: Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Gerbu, Roche, Seakem, Duchefa, Difco, Serva, BioRad, GE Healthcare, Pharmacia, Invitrogen und Carl Roth.

Tabelle 4.1: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Anwendung	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	Roche
Lysozym	Plasmidisolierung	Merck
Novozym 234	Protoplastierung von <i>U. maydis</i>	Novo Nordisc
Phusion DNA-Polymerase	DNA-Amplifikation	Finnzymes oder Laborpräparation
Restriktionsenzyme	DNA-Restriktion	New England Biolabs
RNase A	Plasmidisolierung, gDNA-Isolierung	Boehringer
T4-DNA-Ligase	DNA-Ligation	Roche
Taq DNA-Polymerase	DNA-Amplifikation	Laborpräparation
PNGaseF	Deglycosylierung von Proteinen	New England Biolabs
Quick-DNA-Ligase	DNA-Ligation	New England Biolabs

Tabelle 4.2: In dieser Arbeit verwendete Kits

Name	Anwendung	Bezugsquelle
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Herstellung der Sequenzierungsreaktion	Applied Biosystems, Invitrogen
CDP-Star®	Southern Blot-Analyse (chemilumineszentes Substrat für alkalische Phosphatase)	Roche
Amersham® ECL® Western blotting detection reagent	Western Blot-Analyse (chemilumineszentes Substrat für Meerrettich-Peroxidase (HRP))	GE Healthcare Life Sciences
High Pure Plasmid Isolation Kit	Präparation hochreiner Plasmid-DNA	Roche
High Pure PCR Product purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten, Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Roche
JETsorb® Kit	Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	Genomed

JETquick® General DNA Clean-Up Kit	Reinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung	Genomed
JETquick® Plasmid Miniprep Spin Kit	Präparation hochreiner Plasmid-DNA	Genomed
PCR DIG Labeling Mix	Dioxigenin-Markierung von PCR-Produkten (Synthese von DNA-Sonden)	Roche
Plasmid Midi Kit (100)	Präparation hochreiner Plasmid-DNA	Qiagen
SureClean	Reinigung von PCR-Produkten	Bioline

4.1.2 Lösungen und Medien

Puffer und Lösungen:

Standardpuffer und -lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgelistet.

Medien:

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989, Ausubel *et al.*, 1987), welche 5 min bei 121°C autoklaviert wurden. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt (YT-Amp).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die, sofern nicht anders angegeben, 5 min bei 121°C autoklaviert wurden.

CM-Vollmedium

(Banuett & Herskowitz, 1989, Holliday, 1974)

0,15% (w/v) NH₄NO₃

0,25% (w/v) Casamino-säuren

0,05% (w/v) DNA degr. Free Acid

0,15 (w/v) Hefeextrakt

1% (v/v) Vitamin-Lösung (siehe unten)

6,25% (v/v) Salz-Lösung (siehe unten)

pH-Wert mit NaOH auf 7,0 eingestellt und autoklaviert

nach dem Autoklavieren:

20 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung

NM-Medium

(Holliday, 1974)

0,3% KNO₃

6,25% Salz-Lösung

pH-Wert mit KOH auf 7,0 eingestellt und autoklaviert

nach dem Autoklavieren:

2% (v/v) 50% (w/v) Glukose-Lösung

YEPS_L-Medium:

modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988)

1% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Pepton

1% (w/v) Saccharose

NSY-Glycerin (Einfriermedium):

0,8% (w/v) Nutrient Broth

0,1% (w/v) Hefeextrakt

0,5% (w/v) Saccharose

69,6% (v/v) Glycerin

Salz-Lösung

(Holliday, 1974)
 1,6% (w/v) KH_2PO_4
 4% (w/v) Na_2SO_4
 0,8% (w/v) KCl
 0,4% (w/v) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
 0,132% (w/v) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 0,8% (v/v) Spurenelement-Lösung
 sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung

(Holliday, 1974)
 100 mg Thiamin
 50 mg Riboflavin
 50 mg Pyridoxin
 200 mg Calciumpantothenat
 500 mg p-Aminobenzoesäure
 200 mg Nikotinsäure
 200 mg Cholinchlorid
 1000 mg myo-Inositol
 mit H_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)
 60 mg H_3BO_3
 140 mg $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
 400 mg ZnCl_2
 40 mg $\text{NaMoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 100 mg $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
 40 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
 mit ddH_2O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Regenerationsagar

(Schulz *et al.*, 1990)
Top-Agar:
 1,5% (w/v) Bacto-Agar
 1 M Sorbitol
 in YEP_S-Medium (siehe oben)
Bottom-Agar:
 Top-Agar mit 4 µg/ml Carboxin

Für die Kultivierung von *Pichia pastoris* wurden folgende Medien verwendet, die 5 min bei 121°C autoklaviert wurden.

BMGY- und BMMY-Medium:

1% (w/v) Hefeextrakt
 2% (w/v) Pepton
 100 mM NaPi, pH 6,0
 1,34% Yeast Nitrogen Base
 4×10^{-5} % Biotin
 1% Glycerin oder Methanol

4.1.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben (Tab.4.3, 4.4).

Tabelle 4.3: Für Klonierungen verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
oMF369	TGTGGCCGTTTACGTCGC
oMF502	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
oMF503	TTACACAGGAAACAGCTATGACC
oMF746	TTCGAGCTGGTTGCCTGC
oMF749	TCTCCAAGCCACGGTTCC
oSL85	ccatggtggccgcgcttgccgcCTTGAGGCCGTTCTTGACATTGTCCC
oSL880	CTAGTGC GGCCGCGGCCAACG
oSL881	TGGCCGCGCCGCA
oRL18	aagtctagaTCGGTCCCTCAGACTCCG
oRL19	GGCCGCTTGCCGCACCAgcagcagaggctgttgc
oRL20	GGACTGGCATGAACTTCG
oRL138	GGCCCTAGCCGCGGT

oRL139	CGCGACCGCGGCTAGGGCCCCGT
oRL140	CTAGCACTAGTCGGCGCGCCT
oRL141	CTAGAGGCGCGCCGACTAGTG
oRL142	ggtggccgcgcttgccgagggcccgCCTTGCAGTCGATGTTG
oRL143	GGGCCCTCGGCCAACG
oRL144	TGGCCGAGGGCCCC
oRL145	GTACGCTGGGCCCTCGGCCAACG
oRL146	TGGCCGAGGGCCCAGC
oRL270	CCGGACTAGGCGCGCCGGGCC
oRL271	CGGCGCGCCTAGT
oRL272	gaccatggAGACAACCTTCGGTCATCTCCGCG
oRL273	gcactagtATTGATCGTTCCAGAGCACG
oRL283	GGAAATGTGCGCGGAACC
oRL292	aagggccgcgcttgccCTTGTTGCGTCACCACTC
oRL293	aagtctagAGGTCACGATTCACCACC
oRL294	aagcggccgcaCAGGGTGGTGCTGAAAGG
oRL295	aagcggccgcACCTTGCAGTCGATGTTG
oRL296	ATTTTGGCGGCCGC
oRL297	GTACGCGCCGCCAAAATC
oRL300	tacgtacgGTAGGTACGGTTGGTCTC
oRL301	cgtacgatGGCCACCAAGCCAACCTG
oRL405	aagtctagaGAGAACGACGGGTTGGATGG
oRL406	aagtctagaGATTCGCCGGTTCGTGG
oRL407	aagtctagaAGCCAGGGTGGTGCTGAAAGG
oRL1114	aatccatgtaGCACCGCTCGCCAGTTCC

Tabelle 4.4: Für Sequenzierungen verwendete Oligonukleotide:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
oMF506	GGCCACTCAGGCCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGG
oMF748	TTCGCTCTACCGATGCCTT
oMF807	TCCAATAAAGGGCGCTGTCTCGGC
oMF894	TCGCAAGACCGGCAACAG
oSL71	AGGAGAAGTGCTGCTGGG
oSL226	ATGGTCAGGTCCACAGGG
oSL339	ACGACACACCTCAGAACG
oSL459	TCCTGTTGCCGGTCTTGC
oSL466	ATAGCGGCCGCACGCGTTACGACTGCACAGGCACG
oSL549	ATTGTCGTTAGAACGCGGC
oSL757	TCACTCTCGGCATGGACG
oSL883	AGGTGGTGGCCAATGGTG

oSL884	CACATCACCCACGCTTGGG
oSL885	TGTTTGCCCTCCCTGCTGC
oSL929	GTGGTGTGCGATGTGTTG
oSL937	CTGTGCTTCTTGCAATGG
oSL949	CCACGAACCGGCGAAATC
oSL951	GAGCGGGATTCCGAGAAC

4.1.4 Plasmide

4.1.4.1 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid p123 (C. Aichinger und R. Kahmann, unveröffentlicht)

Dieses Plasmid enthält eine Carboxin-Resistenz, die die homologe Rekombination mit dem *ip*-Locus von *U. maydis* ermöglicht und die Expression von Genen unter der Kontrolle des konstitutiven *otef*-Promotors (Spellig *et al.*, 1996) ermöglicht.

pNCC_Gus und pGus_NCC (S. Kreibich, Diplomarbeit 2009)

Für C-terminale und N-terminale Gus Fusionen wurden die zwei Vorläuferplasmide pNCC_Gus und pGus_NCC aus dem Plasmid p123 (Aichinger *et al.*, 2003) generiert. Gus ersetzte dabei eGFP zwischen den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *NotI* wobei *NotI* durch die Restriktionsschnittstelle *Ascl* ersetzt wurde.

pCts1-Gus (pUMa1354) (S. Kreibich, Diplomarbeit 2009)

Für pCts1-Gus (pUMa1354) wurde der Cts1-ORF mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *Ascl* in pGus_NCC kloniert.

pGus-Cts1 (pUMa1355) (S. Kreibich, Diplomarbeit 2009)

Für pCts1-Gus (pUMa1355) wurde der Cts1-ORF mittels PCR amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XbaI* in pNCC_Gus kloniert.

pTC-cbx (pUMa260) (Loubradou *et al.*, 2001, Brachmann *et al.*, 2004)

Dieses Plasmid besitzt die Sequenz des *cbx*-Locus und wurde zur Amplifikation der entsprechenden DNA-Sonde mittels PCR verwendet. Darüber hinaus wurde das Plasmid in *U. maydis* transformiert, um hergestellte Protoplasten zu testen.

pCts1-G-nat-topo (pUMa828) (Koepke *et al.*, 2011)

In Koepke *et al.* (2011) wurde das Plasmid genutzt, um eine für eine N-terminale Fusion von eGfp an Cts1 kodierende Gensequenz im endogenen *cts1*-Locus zu erstellen. In dieser Arbeit wurde ein 5'-terminales DNA-Fragment aus der *cts1*-Sequenz für die Klonierung des pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) verwendet.

peGfp-TriTag-nos-nat-pBS (pUMa741) (Michael Feldbrügge)

peGfp-TriTag-nos-nat-pBS kann als Vorläuferplasmid genutzt werden, um Zielgene mit einer Sequenz kodierend für einen C-terminalen eGfp-TapTag-His10 Fusion im endogenen Locus zu versehen. Das Plasmid wurde auf Basis des *SfiI*-Systems (Brachmann *et al.*, 2004) konstruiert. In dieser Arbeit wurde aus diesem Plasmid ein DNA-Fragment mit der *gfp-tap-his*-Sequenz für die Klonierung von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) verwendet.

pcrg-eGfp-ubi3'UTR-nosT-cbx (pUMa958)

pcrg-eGfp-ubi3'UTR-nosT-cbx kann als Vorläuferplasmid genutzt werden, um Sequenzen für Zielproteine mit einer C-terminalen eGfp Fusion zu erstellen. Die Expression findet unter der Kontrolle des induzierbaren *crg*-

Promotors statt und es wird die 3'UTR von *ubi1* transkribiert. Zur homologen Rekombination in den ektopischen *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*). In dieser Arbeit wurde aus diesem Plasmid ein DNA-Fragment mit der 3'UTR Sequenz von *ubi1* für die Klonierung von pGus-Cts1-GTH *ubi1* 3'UTR (pUMa1425) verwendet.

pMA_Strep-HA-His (GeneArt; pUMa1533)

Das Plasmid stammt von der Firma GeneArt (Invitrogen) und besitzt die Sequenz für einen Strep-Tag gefolgt von drei HA-Tags und einem zehnfach His-Tag (SHH). Es wurde zur Klonierung von pRabX1Gus-SHH-Cts1 *ubi1* 3'UTR (pUMa1521) eingesetzt.

pmCalB-MK-RQ (GeneArt, pUMa1426)

Das Plasmid stammt von der Firma GeneArt (Invitrogen) und besitzt die für *U. maydis* Codon optimierte Sequenz der reifen CalB Lipase aus *Pseudozyma aphidis*. Es wurde zur Klonierung von pCalB-Cts1-GTH *ubi1* 3'UTR (pUMa1433) eingesetzt.

pmLipT-MK-RQ (GeneArt, pUMa1424)

Das Plasmid stammt von der Firma GeneArt (Invitrogen) und besitzt die für *U. maydis* codonoptimierte Sequenz der reifen LipT Lipase, die im Metagenom des Wassers einer Heizungsanlage gefunden wurde (Chow *et al.*, 2012). Es wurde zur Klonierung von pLipT-Cts1-GTH *ubi1* 3'UTR (pUMa1434) eingesetzt.

4.1.4.2 Plasmidkonstruktionen dieser Arbeit

pGus-Cts1-GTH (pUMa1385)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung wurde ein N-terminales Cts1 Fragment über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *AatII* aus pCts1-GFP-nat-topo (pUMa828) (Koepke *et al.*, 2011) mit einem eGfp-TriTap-His Fragment (*SfiI*, *AscI*) aus peGfp-TriTag-nos-nat-pBS (pUMa741) in den mit *AatII* und *AscI* linearisierten Vektor pGus-Cts1 (pUMa1355) integriert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-GTH (pUMa1403)

Plasmid für die Expression eines Gus-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pGus-GTH (pUMa1403) wurde Cts1 in pGUS-Cts1-GTH (pUMa1385), über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI*, durch ein DNA-Fragment aus den Primern SL880 und SL881 ausgetauscht. Die *XbaI* Restriktionsschnittstelle wurde dabei durch *NotI* ersetzt. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pCts1-Gus-GTH (pUMa1404)

Plasmid für die Expression eines Cts1-Gus-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pCts1-Gus-GTH (pUMa1404) wurde ein 3,5 kb DNA-Fragment aus pCts1-Gus (pUMa1354) über zwei *MfeI* Restriktionsschnittstellen mit einem 6,8 kb DNA-Fragment aus pGus-GTH (pUMa1403) ligiert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pSp-Gus-GTH (pUMa1412)

Plasmid für die Expression eines Sp-Gus-GTH Fusionsproteins. Das heterologe Signalpeptid stammt aus der Invertase Suc2. Das Plasmid enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pSp-Gus-GTH (pUMa1412) wurde ein DNA-Fragment aus den

Primern SL968 und SL969 mit einem 3,2 kb großen DNA-Fragment, das über die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *XbaI* aus pCts1-Gus-GTH (pUMa1404) generiert wurde, und einem 5,6 kb großen DNA-Fragment, das über die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *NcoI* aus dem Vektor pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) geschnitten wurde, ligiert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) wurde die ubi1 3'UTR mit *nos* Terminator aus pcrg-eGfp-ubi3'UTR-nosT-cbx (pUMa958) über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *AscI* in den entsprechend geschnittenen Vektor pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₁₋₄₆₀-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1384)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₁₋₄₆₀-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pGus-Cts1₁₋₄₆₀-GTH (pUMa1384) wurde eine C-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern RL20 und RL292 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) Vektor kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₁₋₃₁₇-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1512)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₁₋₃₁₇-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pGus-Cts1₁₋₃₁₇-GTH (pUMa1512) wurde eine in der Cts1-Sequenz befindliche Restriktionsschnittstelle *BsiWI* genutzt. Hierüber wurde der Cts1 Sequenz-Teil zwischen *BsiWI* und *SfiI* im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) durch ein DNA-Fragment aus den Primern RL145 und RL146 ersetzt. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₁₋₂₃₄-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1511)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₁₋₂₃₄-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pGus-Cts1₁₋₂₃₄-GTH (pUMa1511) wurde eine in der Cts1-Sequenz befindliche Restriktionsschnittstelle *XcmI* genutzt. Hierüber wurde der Cts1 Sequenz-Teil zwischen *XcmI* und *SfiI* im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) durch ein DNA-Fragment aus den Primern RL143 und RL144 ersetzt. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₁₋₁₀₃-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1510)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₁₋₁₀₃-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pGus-Cts1₁₋₁₀₃-GTH (pUMa1510) wurde die Sequenz für eine C-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern RL20 und RL142 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) Vektor kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1-N-term-GTH (pUMa1435)

Vorläufer Plasmid für Gus-Cts1-GTH₁₋₄₂ ubi1 3'UTR (pUMa1509) mit C-Terminus verkürzter Cts1 Variante. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} .

Zur Klonierung von pGus-Cts1-N-term-GTH (pUMa1435) wurde die Sequenz für eine C-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern RL19 und RL20 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) kloniert.

pGus-Cts1₁₋₄₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1509)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₁₋₄₂-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1₁₋₄₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1509) wurde ein DNA-Fragment mit der Gus und C-terminal verkürzter Cts1 Sequenz durch die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *SfiI* aus pGus-Cts1-Nterm-GTH (pUMa1435) geschnitten. Dieses 2075 bp Fragment wurde in den entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) Vektor kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₄₆₀₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1644)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₄₆₀₋₅₀₂-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1₄₆₀₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1644) wurde die Sequenz für eine N-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern MF369 und RL407 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₃₁₉₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1643)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₃₁₉₋₅₀₂-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1₃₁₉₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1643) wurde eine N-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern MF369 und RL406 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₂₃₅₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1642)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₂₃₅₋₅₀₂-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1₂₃₅₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1642) wurde die Sequenz für eine N-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern MF369 und RL405 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₁₀₃₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1388)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₁₀₃₋₅₀₂-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1₁₀₃₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1388) wurde die Sequenz für eine N-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern SL85 und RL293 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1₄₂₋₅₀₂-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1513)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1₄₂₋₅₀₂-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1₄₂₋₅₀₂-GTH

ubi1 3'UTR (pUMa1513) wurde die Sequenz für eine N-terminal verkürzte Cts1 Variante mittels PCR und den Primern RL18 und SL85 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) kloniert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1 Δ ₁₀₄₋₄₆₉-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1436)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1 Δ ₁₀₄₋₄₆₉-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von Gus-Cts1 Δ ₁₀₄₋₄₆₉-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1436) wurden zwei PCR-Fragmente mit den Sequenzen für Cts1 N-Terminus und C-Terminus über die Restriktionsschnittstellen *XbaI* und *SfiI* in den entsprechend geschnittenen pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) Vektor kloniert. Die Ligation zwischen den Sequenzen für den Cts1 N- und C-Terminus wurde dabei über eine *NotI* Schnittstelle erreicht. Die PCR-Fragmente für die Cts1 Sequenzen wurden durch die Primer RL20/RL295 für den N-Terminus-kodierenden Teil und die Primer MF369/RL294 für den C-Terminus-kodierenden Teil von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1 Δ ₃₁₉₋₃₂₇-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1593)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1 Δ ₃₁₉₋₃₂₇-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1 Δ ₃₁₉₋₃₂₇-GTH (pUMa1593) wurde eine in der Cts1-Sequenz befindliche Restriktionsschnittstelle *BsiWI* genutzt. Hierüber wurde der Cts1 Sequenzteil zwischen *BsiWI* und *SfiI* im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) durch ein ebenso restringiertes PCR-Produkt ersetzt, welches mit den Primern RL301 und SL85 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert wurde. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1 Δ ₂₇₃₋₃₁₅-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1591)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1 Δ ₂₇₃₋₃₁₅-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1 Δ ₂₇₃₋₃₁₅-GTH (pUMa1591) wurden die in der Cts1-Sequenz befindlichen Restriktionsschnittstelle *XcmI* und *BsiWI* genutzt. Hierüber wurde ein Cts1 Sequenz-Teil zwischen *XcmI* und *BsiWI* im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) durch ein DNA-Fragment aus den Primern RL296 und RL297 ersetzt. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pGus-Cts1 Δ ₂₈₆₋₃₁₆-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1592)

Plasmid für die Expression eines Gus-Cts1 Δ ₂₈₆₋₃₁₆-GTH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pGus-Cts1 Δ ₂₈₆₋₃₁₆-GTH (pUMa1592) wurde eine in der Cts1-Sequenz befindliche Restriktionsschnittstelle *BsiWI* genutzt. Hierüber wurde der Cts1 Sequenz-Teil zwischen *XbaI* und *BsiWI* im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) durch ein ebenso restringiertes PCR-Produkt ersetzt, welches mit den Primern RL20 und RL300 von pGus-Cts1-GTH (pUMa1385) amplifiziert wurde. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521)

Plasmid für die Expression eines Gus-SHH-Cts1 Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos}. Zur Klonierung von pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521) wurde die Sequenz für den egfp-Tap-His Tag in pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR über die Restriktionsschnittstellen *SfiI* und *AscI* durch ein DNA-Fragment aus den Primern RL138 und RL139 ersetzt. Über

die *XbaI* Restriktionsschnittstelle wurde dann ein DNA-Fragment aus den Primern RL140 und RL141 in den entsprechenden Vektor kloniert. Die Sequenz für den Strep-3HA-10His Tag wurde über die Restriktionsschnittstellen *SpeI* und *BspEI* aus pMA_Strep-HA-His (GeneArt; pUMa1533) in den Vektor eingebracht. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pRabX1Gus-SHH ubi1 3'UTR (pUMa1667)

Plasmid für die Expression eines Gus-SHH Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pRabX1Gus-SHH ubi1 3'UTR (pUMa1667) wurde Cts1 in pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521), über die Restriktionsschnittstellen *BspEI* und *ApaI*, durch ein DNA-Fragment aus den Primern RL270 und RL271 ausgetauscht. Das entsprechende Fragment enthielt eine *AscI* Restriktionsschnittstelle und ein Stoppcodon. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pRabX1Sp-Uml2-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1382)

Plasmid für die Expression eines Uml2-SHH-Cts1 Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Das kodierte Signalpeptid stammt aus dem endogenen *uml2*. Zur Klonierung von pRabX1Sp-Uml2-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1382) wurde die Gus Sequenz zwischen *NcoI* und *SpeI* im Vorläuferplasmid pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521) durch ein ebenso restringiertes PCR-Produkt ersetzt, welches mit den Primern RL272 und RL273 von genomischer DNA des Stammes UM521 (UMa54) amplifiziert wurde. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pRabX1Uml2-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa2012)

Plasmid für die Expression eines Uml2-SHH-Cts1 Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Das kodierte Signalpeptid stammt aus dem endogenen *uml2*. Zur Klonierung von pRabX1Uml2-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa2012) wurde die Gus Sequenz zwischen *NcoI* und *SpeI* im Vorläuferplasmid pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521) durch ein ebenso restringiertes PCR-Produkt ersetzt, welches mit den Primern RL1114 und SL938 von pRabX1Sp-Uml2-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1382) amplifiziert wurde. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pCalB-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1433)

Vorläuferplasmid für pRabX1CalB-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1551). Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins CalB-SHH-Cts1 und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pCalB-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1433) wurde die Gus Sequenz im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) über *NcoI* und *XbaI* durch eine, für *U. maydis* codonoptimierte, mCalB Sequenz aus pmCalB-MK-RQ (GeneArt, pUMa1426) ersetzt.

pRabX1CalB-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1551)

Plasmid für die Expression eines mCalB-SHH-Cts1 Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pRabX1CalB-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1551) wurde die Gus Sequenz über *NcoI* und *XbaI* aus dem Vorläuferplasmid pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521) entfernt und durch die mCalB Sequenz, welche über *NcoI* und *SpeI* aus dem pCalB-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1433) restringiert wurde, ersetzt. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

pLipT-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1434)

Vorläuferplasmid für pRabX1LipT-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1552). Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins LipT-SHH-Cts1 und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pLipT-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1434) wurde die Gus Sequenz im Vorläuferplasmid pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1425) über *NcoI* und *XbaI* durch eine, für *U. maydis* codonoptimierte, *lipT* Sequenz aus pLipT-MK-RQ (GeneArt, pUMa1424) ersetzt.

pRabX1LipT-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1552)

Plasmid für die Expression eines mLipT-SHH-Cts1 Fusionsproteins. Es enthält den Promotor P_{otef} gefolgt von der Sequenz des Fusionsproteins und dem heterologen Terminator T_{nos} . Zur Klonierung von pRabX1LipT-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1552) wurde die Gus Sequenz über *NcoI* und *XbaI* aus dem Vorläuferplasmid pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521) entfernt und durch die mCalB-kodierende Sequenz, welche über *NcoI* und *SpeI* aus dem pLipT-Cts1-GTH ubi1 3'UTR (pUMa1434) restringiert wurde, ersetzt. Zur homologen Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenz (*ipR*).

4.1.5 Stämme**Tabelle 4.5: In dieser Arbeit verwendete Stämme**

Stammbezeichnung	Relevanter Genotyp	UMa	Referenz	Integriertes Plasmid	Locus	Ausgangsstamm
<i>Ustilago maydis</i>						
UM521	<i>a1 b1</i>	54	R. Holliday			
AB33	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	133	Brachmann <i>et al.</i> , 2001		<i>b</i>	FB2
AB33uml2Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1 uml2Δ</i>	792	Marius Terfrüchte, pers. Mitteilung	pUml2Δ-HygR (pUMa1505)	<i>uml2 um014 22</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₄₆₀₋₅₀₂ -gth ubi1 3'UTR	<i>ip^r [P_{otef}gus:cts1₄₆₀₋₅₀₂:gth ubi1 3'UTR] ip^s</i>	979	Michael Knopp, pers. Mitteilung	pGus-Cts1 ₄₆₀₋₅₀₂ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1644)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 _{Δ104-469} -gth ubi1 3'UTR	<i>ip^r [P_{otef}gus:cts1_{Δ104-469}:gth ubi1 3'UTR] ip^s</i>	980	Michael Knopp, pers. Mitteilung	pGus-Cts1 _{Δ104-469} -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1436)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 _{Δ319-327} -gth ubi1 3'UTR	<i>ip^r [P_{otef}gus:cts1₃₁₉₋₃₂₇:gth ubi1 3'UTR] ip^s</i>	982	Michael Knopp, pers. Mitteilung	pGus-Cts1 _{Δ319-327} -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1593)	<i>ip</i>	AB33
<i>Pichia pastoris</i>						
X-33[pCalB]		786	Christoph Buerth, Denis Tielker, pers. Mitteilung	pCalB (pPICZα-Life Technologies, Darmstadt, Germany)		X-33 (Invitrogen)
<i>Escherichia coli</i>						
Top10		1027				Invitrogen
Rosetta 2 (DE3) pLysS [pUMa1671]		791		pUMa1671		Rosetta (Novagen/Merck)

Tabelle 4.6: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stammbezeichnung	Genotyp	UMA	Referenz	Integriertes Plasmid	Locus	Ausgangsstamm
AB33gus-cts1-gth	$ip^r [P_{oter}gus:cts1:gth]$ ip^s	711	Stock <i>et al.</i> , 2012	pGus-Cts1-GTH (pUMa1385)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-gth	$ip^r [P_{oter}gus:gth]$ ip^s	718	Stock <i>et al.</i> , 2012	pGus-GTH (pUMa1403)	<i>ip</i>	AB33
AB33cts1-gus-gth	$ip^r [P_{oter}cts1:gus:gth]$ ip^s	720	Stock <i>et al.</i> , 2012	pCts1-Gus-GTH (pUMa1404)	<i>ip</i>	AB33
AB33sp-gus-gth	$ip^r [P_{oter}sp:gus:gth]$ ip^s	731	Stock <i>et al.</i> , 2012	pSp-Gus-GTH (pUMa1412)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1-gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	732	Stock <i>et al.</i> , 2012	pGus-Cts1-GTH ubi1 3'UTR/cbxR (pUMa1425)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₁₋₄₂ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{1-42}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	807	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₁₋₄₂ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1509)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₁₋₁₀₃ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{1-103}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	808	Stock <i>et al.</i> , 2012	pGus-Cts1 ₁₋₁₀₃ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1510)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₁₋₂₃₄ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{1-234}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	809	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₁₋₂₃₄ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1511)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₁₋₃₁₇ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{1-317}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	810	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₁₋₃₁₇ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1512)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₁₋₄₆₀ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{1-460}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	838	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₁₋₄₆₀ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1384)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₁₀₃₋₅₀₂ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{103-502}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	839	Stock <i>et al.</i> , 2012	pGus-Cts1 ₁₀₃₋₅₀₂ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1388)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 _{Δ237-315} - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{Δ237-315}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	840	diese Arbeit	pGus-Cts1 _{Δ237-315} -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1591)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 _{Δ286-316} - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{Δ286-316}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	841	diese Arbeit	pGus-Cts1 _{Δ286-316} -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1592)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₄₂₋₅₀₂ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{42-502}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	842	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₄₂₋₅₀₂ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1513)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-shh-cts1 ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:shh:cts1$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	843	Stock <i>et al.</i> , 2012	pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1521)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₂₃₅₋₅₀₂ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{235-502}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	875	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₂₃₅₋₅₀₂ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1642)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-cts1 ₃₁₉₋₅₀₂ - gth ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:cts1_{319-502}:gth$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	876	diese Arbeit	pGus-Cts1 ₃₁₉₋₅₀₂ -GTH ubi1 3'UTR (pUMa1643)	<i>ip</i>	AB33
AB33gus-shh ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}gus:shh ubi1$ $3'UTR]$ ip^s	1212	diese Arbeit	pRabX1Gus-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1667)	<i>ip</i>	AB33
AB33uml2Δsp-uml2- shh-cts1 ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}sp-uml2:shh:cts1$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	1275	diese Arbeit	pRabX1SP-Uml2-SHH- Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1382)	<i>ip</i>	AB33
AB33uml2Δuml2- shh-cts1 ubi1 3'UTR	$ip^r [P_{oter}uml2:shh:cts1$ $ubi1 3'UTR]$ ip^s	1276	diese Arbeit	pRabX1Uml2-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa2012)	<i>ip</i>	AB33

AB33umI2ΔcalB-shh-cts1 ubi1 3'UTR	<i>ip'</i> [<i>P_{oter}calB:shh:cts1 ubi1 3'UTR</i>] <i>ip</i> ^s	1277	diese Arbeit	pRabX1CalB-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1551)	<i>ip</i>	AB33
AB33umI2ΔlipT-shh-cts1 ubi1 3'UTR	<i>ip'</i> [<i>P_{oter}lipT:shh:cts1 ubi1 3'UTR</i>] <i>ip</i> ^s	1278	diese Arbeit	pRabX1LipT-SHH-Cts1 ubi1 3'UTR (pUMa1552)	<i>ip</i>	AB33

4.1.6 Computerprogramme und Bioinformatik

CLONEMANAGER9; Microsoft Office 2007; Canvas 12; NCBI; Genom Datenbank *U. maydis* 'mumdb' (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/ustilago>); Signalpeptidvorhersage 'signalP 4.1' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>); Propeptidvorhersage 'ProP 1.0' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/>); Vorhersage für unkonventionelle Sekretion 'secretomeP 2.0' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>); *N*-Glykosylierungsvorhersage 'NetNGlyc 1.0' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>); PEST-Motiv Vorhersage 'epestfind' (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>); Twin-Arginin-Translokationspeptid Vorhersage 'TatP 1.0' (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TatP/>); Vorhersage von Disulfidbrücken 'DiANNA 1.1' (<http://clavius.bc.edu/~clotelab/DiANNA/>).

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

Zur Kultivierung von *E. coli* wurde dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Als Antibiotikum wurde Ampicillin mit einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Flüssigkulturen wurden bei 110 Upm im Erlenmeyerkolben oder im Reagenzglas, auf dem Drehrad, inkubiert. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen über Nacht bei 37 °C.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert zwischen 0,2 und 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 10⁹ Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Cohen *et al.*, (1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem je 10 mM MgCl₂ und MgSO₄ zugesetzt war, mit 1 ml einer frischen Top10-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ ≈ 0,5 bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 1.250 g und 4°C pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30

bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (15 min, 1.250 g, 4°C) der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit 1 bis 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 800 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 3466 g und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
 30 mM K-Acetat
 10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 15% (v/v) Glycerin
 in ddH₂O
 mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen
 und sterilfiltrieren

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
 15% (v/v) Glycerin
 in ddH₂O
 mit NaOH auf pH 5,8 einstellen
 und sterilfiltrieren

4.2.2 Arbeiten mit *U. maydis***Kultivierung von *U. maydis***

U. maydis Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei 80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert zwischen 0,2 und 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. OD₆₀₀ = 1,0 entspricht etwa 1-5 x 10⁷ Zellen/ml.

Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach Schulz *et al.* (1990) und Gillissen *et al.* (1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS_L-Flüssigkultur angesetzt und für 8 bis 10 Stunden bei 28°C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:2000 in 50 ml fri-

schem YEPS_L-Medium verdünnt und bei 28°C bis zu einer Zelldichte von 1-2 x 10⁷ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters (OD₆₀₀ = 0,8) wurden die Zellen durch Zentrifugation (1.250 g, 5 min, 4°C) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 3,5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Waren etwa 1/3 der Zellen sichtbar protoplastiert (5 - 15 min) wurden 10 ml SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10 minütige Zentrifugation bei 735 g (4°C) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang dreimal wiederholt. Anschließend wurde mit 10 ml STC gewaschen und das Pellet in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 bis 4 Stunden auf Eis oder aliquotiert bei 80°C mehrere Monate aufbewahrt werden.

Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1 bis 10 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Für eine Transformation mit freireplizierenden Plasmiden werden 50 µl Protoplasten mit 1 bis 5 µl zirkulärer Plasmid-DNA (ca. 0,5 – 3 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 3 bis 7 Tagen Inkubation bei 28°C wurden die gewachsenen Kolonien auf CM-Platten vereinzelt. Anschließend wurde die erlangte Resistenz auf entsprechenden antibiotikahaltigen CM-Platten erneut getestet.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in ddH₂O, sterilfiltriert

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in ddH₂O, sterilfiltriert

STC/PEG:

15 ml STC
10 g PEG4000

Induktion des filamentösen Wachstums

AB33 Stämme wurden in CM-Flüssigmedium über Nacht bei 28 °C und 200 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (1.250 g, 3 min, RT, Heraeus Biofuge) geerntet, in vorgewärmtem ddH₂O gewaschen und in vorgewärmtem NM-Glk-Flüssigmedium aufgenommen. Diese Kulturen mit einem Volumen von 20 bis 50 ml und einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,5 wurden für 6 bis 8 Stunden erneut bei 28 °C und 200 Upm inkubiert.

Wachstumsanalysen von *U. maydis*

Um das Wachstum der *U. maydis* Stämme AB33 und AB33umIΔ auf den Substratquellen Glukose, Tween 20 und Tween80 zu untersuchen, wurden CM-Vorkulturen (mit Glukose) bis

zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 1250 g) und in gleichem Volumen mit ddH₂O gewaschen. Das Zellpellet wurde in einem entsprechenden Volumen CM-Medium (ohne Glukose) aufgenommen, um eine OD_{600} von 0,5 zu erhalten. Von diesen gewaschenen Kulturen wurden jeweils 5 ml zu 45 ml CM-Medium mit den entsprechenden Substratzusätzen gegeben. Die erstellten Hauptkulturen hatten so eine äquivalente Start- OD_{600} von ~0,05. Die Substratkonzentrationen lagen bei 1% für die mit Glukose und 0,2 % für die mit Tween20 und Tween80 versetzten Kulturen. Die Kulturen wurden über 24 Stunden kultiviert.

4.2.3 Arbeiten mit *P. pastoris*

Kultivierung von *P. pastoris*

Zur Kultivierung von *P. pastoris* wurde BMGY- und BMMY-Flüssigmedium verwendet. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 28°C und 200 Upm. Zur Induktion der Proteinexpression diente das Methanol-haltige BMMY-Flüssigmedium.

Bestimmung der Zelldichte bei *P. pastoris*

Die Zelldichte von *P. pastoris* Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD_{600} die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert zwischen 0,2 und 0,5 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD_{600} des jeweiligen Kulturmediums verwendet. $OD_{600} = 1,0$ entspricht etwa 5×10^7 Zellen/ml.

4.3 Molekularbiologische Standardmethoden

Standardtechniken, wie z. B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind in Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) oder in den Herstellerangaben der entsprechenden Kits beschrieben.

4.3.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml einzelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus A260 zu A280. Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (NanoDrop-Technologies).

4.3.2 Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*:

Die Isolierung erfolgte über „Lyse durch Kochen“ nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden pelletiert (6.080 g, 2 min, RT). Das Zellpellet wurde in 200 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 1 min bei 95°C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellenreste und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 16.060 g zentrifugiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 20 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 500 µl Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 10 min bei 16.060 g. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routineäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

50 mM Tris-Cl, pH8,0
50 mM Na₂-EDTA
8% (w/v) Saccharose
5% (v/v) Triton X-100
in ddH₂O

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH8,0
in ddH₂O

DNA-Isolierung aus *U. maydis*

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman & Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur in YEPS_L-Flüssigmedium in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (16.060 g, 1 min, RT), der Überstand abgenommen und das Pellet mit 100 µl Glaskugeln, 500 µl TE-Phenol/Chloroform und 500 µl Ustilago-Lysispuffer versetzt. Die Proben wurden für 6 - 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (16.060 g, 15 min, RT) wurden 400 µl des Überstands in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml Ethanol überführt und dadurch gefällt. Nach Zentrifugation (16.060 g, 5 min, RT) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase-A aufgenommen, sorgfältig resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Ustilago-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS
in ddH₂O

TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol
(mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

4.3.3 PCR Techniken

Standard-PCR-Ansätze:

Die Methode ist modifiziert nach Innis *et al.* (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Matrizen-DNA, zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (1 μ M) und 125 μ M dNTPs (d.h. je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer (50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 8,3). Es wurden 1 bis 2 U Taq- oder Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus: Denaturierung bei 94 °C für 1 min, 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Anlagerung bei 65 °C und 1 min Elongation bei 72 °C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 8 min bei 72 °C. Bei der Herstellung längerer Amplifikate wurde die Elongationszeit entsprechend angepasst. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 200, MJ Research oder Labcycler, SensoQuest).

4.3.4 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern Blot-Analyse)

Diese Methode ist modifiziert nach Southern, (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch einen Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20x SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüber liegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für jeweils 20 min in 0,25 M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um u. a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 4 h. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung in einem Bio-Link BRX254 (Vilber Lourmat GmbH) fixiert.

20x SSC:

3 M NaCl

0,3 M Na-Citrat*2H₂O

in ddH₂O:

pH-Wert mit HCl auf 7,0 einstellen.

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl

0,4 M NaOH

in ddH₂O:

RENAT-Lösung:

1,5 M NaCl

282 mM Tris-HCl

218 mM Tris-Base

in ddH₂O:

Der spezifische Nachweis immobilisierter DNA

Genspezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) während einer PCR markiert. Ein PCR-Ansatz enthielt 10 bis 100 pg Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 5 μ l PCR-Puffer, 5 μ l PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche, siehe Herstellerangabe).

ben), jeweils 20 pmol der beiden Oligonukleotide und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (mit ddH₂O auf 50 µl aufgefüllt). Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler (PTC200, MJ Research oder Labcycler, SensoQuest) analog einem Standard-PCR-Ansatz. Die Hybond-N+-Membranen (Amersham GE Healthcare Life Science) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 62 °C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die für 5 min bei 95 °C denaturierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Im Anschluss wurden die Membranen für je 15 min bei 65 °C mit 2x SSPE + 0,1% SDS, 1x SSPE + 0,1% SDS und 0,1x SSPE + 0,1% SDS gewaschen.

Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur in folgenden Lösungen inkubiert: 5 min DIG-Waschpuffer, 30 min DIG2-Lösung, 30 min DIG2-Antikörper-Lösung (1:20.000 Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung) und zweimal 20 min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran für 5 min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte in einem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Science).

20x SSPE-Puffer:

3 mM NaCl
227 mM NaH₂PO₄*H₂O
20 mM Na₂-EDTA*2H₂O

pH-Wert mit NaOH auf 7,4 einstellen

DIG1-Lösung:

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
in ddH₂O:

pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen.

DIG-Waschpuffer:

0,3% (v/v) Tween20 in DIG1-Lösung

Denhardt-Lösung:

2% (w/v) BSA Fraktion V
2% (w/v) Ficoll
2% (w/v) PVP

DIG2-Lösung:

2% (w/v) Magermilchpulver
in DIG1-Lösung

Southern-Hybridisierungspuffer:

26% (v/v) SSPE (20x)
5% (v/v) Denhardt-Lösung
5% (v/v) SDS (10%)

DIG3-Lösung:

0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaCl
in ddH₂O

pH-Wert mit NaOH auf 9,5 einstellen.

4.3.5 Sequenz- und Strukturanalyse

Die DNA-Sequenzierung wurde von dem Sequenzierungsservice im Institut für Genetik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Sequenzierung fand dort nach der Sanger-Methode in einem Abi 3730 96-Kapillarsequenzierer (Applied Biosystems) statt. Dabei wurde das Sequenzier-Kit BigDye-Terminator v3.1 (Applied Biosystems) verwendet. Die erhaltenen Daten wurden mit dem Programm CLONEMANAGER (Version 8 und Version 9; Sci Ed Central) ausgewertet.

4.4 Biochemische Methoden

4.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) wurden 200 µl Bradford-Reagenz (Biorad, 1/5 verdünnt) mit 10 µl, wenn nötig verdünnter Proteinlösung gemischt. Für die photometrische Messung wurden die Protein- und Standardproben (BSA 50, 100, 150 und 200 µg/ml) in dreifach Bestimmung auf einer 96 Well Platte im Fluoreszenz-Spektrometer (Infinite M200, TECAN; Extinktion 595 nm) gemessen. Mit Hilfe einer BSA-Eichkurve wurde der Proteingehalt der Proben berechnet.

4.4.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zur Herstellung von Proteinproben wurden jeweils 50 ml Kulturen ($OD_{600} = 0,5$) von Spordien- oder sechs Stunden induzierten Filamenten abzentrifugiert (860 g für 5 min) und das entsprechende Zellpellet in 2 ml Lysepuffer (denaturierend oder nativ) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Mahlbechern mit flüssigem Stickstoff pipettiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4 °C in einer Schwingmühle (Retsch; 10 min; 30 Hz). Die aufgetauten Proben wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 30 min bei 16.060 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und ein Aliquot für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode entnommen.

Lysepuffer:	denaturierend	nativ
	100 mM NaPi, pH 8	1 x PBS
	10 mM Tris/HCl, pH 8	1 mM PMSF
	8 M Harnstoff	2,5 mM Benzamidin
	1 mM DTT	2 x EDTA free Complete
	1 mM PMSF	Proteaseinhibitor-Cocktail
	2,5 mM Benzamidin	(Roche)
	2 x Complete Proteaseinhibitor-Cocktail	
	(Roche)	

4.4.3 Proteinreinigung

Reinigung von Strep-Fusionsproteinen aus *U. maydis* Zellextrakten

Für die Reinigung von Strep-getaggtten Proteinen wurden zunächst jeweils 1 ml StrepTactin Sepharose (IBA) auf einer Säule mit 10 ml Wasch-Puffer (100 mM Tris-Cl pH 8,0; 150 mM NaCl₂, 1 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Zellextrakte (nativer Zellaufschluss (siehe 4.4.2) auf die Sepharose gegeben. Die Säulen wurden dreimal mit 10 ml Waschpuffer gewaschen. Es wurden jeweils Proben von Zellextrakt, Durchfluss und den Waschfraktionen zur Analyse aufbewahrt. Zur Eluierung wurden jeweils 3-mal 400 µl Elutionspuffer (Waschpuffer, + 2,5 mM Biotin) auf die Säule gegeben und die Eluate in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die gesamte Reinigung wurde bei 4 °C durchgeführt.

Reinigung von Poly-Histidin Fusionsproteinen aus *U. maydis* Zellextrakten

Zur Reinigung von Poly-Histidin-getaggtten Proteinen wurden jeweils 2-mal 250 µl Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und 3-mal mit 1 ml Lysispuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl₂; 20 mM Imidazol; pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml Zellextrakt (nativer Zellaufschluss, siehe 4.4.2) auf die Ni-NTA Agarose gegeben und für 2 Stunden bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ni-NTA Agarose Suspension wurde dann auf eine Säule überführt und der Durchfluss abgelassen. Gewaschen wurde die Ni-NTA Agarose 3-mal mit 10 ml Waschpuffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl₂; 10 mM Imidazol; pH 8,0). Es wurden jeweils Proben von Zellextrakt, Durchfluss und den Waschfraktionen zur Analyse aufbewahrt. Die Elution wurde 3- bis 5-mal mit 400 µl Elutions-Puffer (50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl₂; 250-500 mM Imidazol; pH 8,0) durchgeführt und die Eluate in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen. Die gesamte Reinigung wurde bei 4 °C durchgeführt.

Produktion von heterologen Lipasen mit *P. pastoris*

Das zur Quantifizierung genutzte CalB-His-Myc Fusionsprotein wurde aus Überständen des Stamms *Pichia pastoris* X-33[pCalB] (Christoph Buerth, Denis Tielker) gereinigt. Dazu wurde eine 20 ml BMGY-Medium Vorkultur (ü.N.) zentrifugiert (5 min, 1250 g) und mit der entsprechenden Zellmenge eine 100 ml BMMY-Medium Hauptkultur, mit einer Start OD₆₀₀ von 1, angeimpft. Nach 24 stündiger Kultivierung bei 28 °C wurden der Kultur 0,5 % (v/v) Methanol zugegeben. Nach einer weiteren Kultivierung von 24 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 1250 g) und der Überstand für die Reinigung der Lipase verwendet. Zur Reinigung wurde eine Säule mit 1,5 ml Ni-NTA Agarose (Macherey-Nagel) gefüllt und mit 2 Säulenvolumen gewaschen. Die Säule wurde dann mit dem Überstand beladen und anschließend mit 3 Säulenvolumen Waschpuffer (10 mM Imidazol) gewaschen. Zur Eluierung wurde zunächst 1 ml Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol und anschließend 3-mal 1 ml Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol über die Säule gegeben. Von den erhaltenen Eluaten wurden jeweils 20 µl auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert. Die Aktivität der Eluate wurde durch Auftropfen von 5 µl auf Tributyrin-Platten getestet.

Das ebenfalls für die Quantifizierung genutzte Uml2-His-Myc Fusionsprotein wurde von Christoph Buerth zur Verfügung gestellt.

4.4.4 Präzipitation von Proteinen

Proteinfällung aus zellfreien Überständen mittels Trichloressigsäure

Zur Präzipitation von Proteinen in Kulturüberständen wurden Kulturen für 5 min bei 3466 g zentrifugiert, die Überstände filtriert (Faltenfilter N615 No.1, Macherey-Nagel) und mit 10 % Trichloressigsäure versetzt. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Sedimente 3-

mal mit Aceton gewaschen und anschließend bei 37 °C getrocknet. Die Proteine wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und der pH mit NaOH (0,1 M) eingestellt.

4.4.5 Deglykosylierung von Proteinen

Denaturierende Deglykosylierung von Proteinen wurde nach Herstellerangaben mit PNGaseF (NEB) durchgeführt. Für die native Deglykosylierung wurden 350 ng Protein mit 1000 U PNGaseF (NEB) versetzt und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

4.4.6 Elektrophoretische-Auftrennung und Nachweis von Proteinen

Denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode nach Laemmli (1970) zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proben wurden mit 1/3 Vol. 3x Probenpuffer (6% SDS; 150 mM Tris/HCl pH 6,8; 30% Glycerin; 0,003% Bromphenolblau, 15% β -Mercaptoethanol) versetzt und für 5 min gekocht. Im SDS-Gel wurden die Proteine zunächst in einem 5% Sammelgel aufkonzentriert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 8% oder 10% Trenngel. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 4.7 aufgelistet. Der verwendete Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS. Als Größenstandard wurden Proteinleitern #26616, #26619 oder #26634 von Thermo Scientific verwendet. Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-Protean II Gelapparatur (BioRad) bei 30 mA pro Gel für eine Stunde durchgeführt.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoren

Lösungen	5% Sammelgel	8% Trenngel	10% Trenngel
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	800 μ l	4,8 ml	6 ml
0,5 M Tris-Cl, pH 6,8	1,2 ml	-	-
1 M Tris-Cl, pH 8,8	-	6,75 ml	6,75 ml
20% SDS	24 μ l	90 μ l	90 μ l
50% Glycerin	-	450 μ l	450 μ l
ddH ₂ O	2,8 ml	4,5 ml	5,8 ml
APS	24 μ l	90 μ l	90 μ l
TEMED	4,8 μ l	18 μ l	18 μ l

Transfer von Proteinen (Western Blot-Analysen)

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden mittels einer 'SemiDry'-Elektroblot-Kammer (L/SC-280, Sigma oder 846-015-200, Biometra) in einem dreistufigen Puffersystem auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond-P, RPN303F, GE Healthcare

Life Science) transferiert. Dafür wurde die Membran für 10 sec in Methanol aktiviert, mit ddH₂O gewaschen und mit Anodenpuffer 2 äquilibriert. Für den Aufbau des Blots wurde zunächst zwei Whatman-Papiere getränkt in Anodenpuffer 1 und ein Whatman-Papier mit Anodenpuffer 2 auf die Anode gelegt. Darauf wurden PVDF-Membran und SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Zuletzt wurden drei Whatman-Papiere getränkt mit Kathodenpuffer aufgelegt. Der Proteintransfer wurde bei einer Spannung von 1 mA pro cm² für eine Stunde durchgeführt.

Anodenpuffer 1:

300 mM Tris-HCl, pH 10,4
15% (v/v) Methanol
in ddH₂O

Anodenpuffer 2:

30 mM Tris-HCl, pH10,4
15% (v/v) Methanol
in ddH₂O

Kathodenpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 9,4
15% (v/v) Methanol
ε-Aminocapronsäure
in ddH₂O

Nachweis von immobilisierten Proteinen

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die PVDF-Membran nach dem Elektroblobot zunächst für mindestens 30 min in Blockierungslösung auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 4.8), verdünnt in Blockierungslösung, in einem Autoklavierbeutel eingeschweißt. Dieser wurde für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit TBST wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper, verdünnt in Blockierungslösung inkubiert. Abschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST und einmal 5 min mit TBS gewaschen. Nun wurde die ECL-Lösung (GE Healthcare Life Sciences) nach Herstellerangaben angesetzt, auf der Membran verteilt und letztere in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Detektiert wurden die Chemilumineszenzsignale in einem ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences).

Tabelle 4.8: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Firma
Primäre Antikörper:		
Monoklonal Anti-c-Myc aus Maus	1/5.000	Sigma Aldrich, M5546
Monoklonal Anti-Gfp aus Maus	1/1.000	Roche, #118144601
Monoklonal Anti-HA aus Maus	1/3.000	Roche, #11583816001
Anti-β-Glucuronidase aus Kaninchen	1/2.000	Invitrogen, A-5790

Sekundäre Antikörper:

Anti-Maus IgG HRP-gekoppelt aus Ziege	1/4.000-1/20.000	Promega, W4021
Anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelt aus Ziege	1/3000	Promega, W4011

TBS:

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
136 mM NaCl
in ddH₂O

TBST:

20 mM Tris-Cl, pH 7,6
136 mM NaCl
0,05% (v/v) Tween 20
in ddH₂O

Blockierungslösung:

3% Milchpulver in TBST

Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen und PVDF-Membranen

Um die Proteinbanden in SDS-Polyacrylamid-Gelen sichtbar zu machen, wurde das Gel für 3 Stunden oder über Nacht unter leichtem Schütteln bei RT in 100 ml Coomassie-Färbelösung (7,5% Essigsäure, 50% Methanol, 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte für einige Stunden oder über Nacht in ca. 100 ml Entfärbelösung (7,5% Essigsäure, 20% Methanol). Die Entfärbelösung musste dabei regelmäßig erneuert werden. Gefärbte Gele wurden in 20% Glycerin gelagert.

PVDF-Membranen wurden zur Färbung 5 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend für 30 min entfärbt. Die Entfärbelösung musste dabei regelmäßig erneuert werden.

Coomassie-Färbelösung:

0,05% Coomassie Brilliant Blue R250
1 Teil Essigsäure
5 Teile Methanol
5 Teile ddH₂O

Entfärbelösung:

10% Essigsäure
10% Methanol
80% ddH₂O

Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Silberfärbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden diese zunächst unter leichtem Schütteln für eine Stunde in einer Lösung aus 10% Essigsäure, 50% Methanol und 40% ddH₂O fixiert. Anschließend wurde das Gel 30 min in 30% Ethanol gewaschen. Die Färbung erfolgte durch folgende Inkubationsschritte: 1 min in Thiosulfatlösung, 20 min in Färbelösung und einige Minuten (je nach Proteinmenge) in Entwickler-Lösung. Abgestoppt wurde durch 10-minütige Inkubation in einer Lösung aus 18% Essigsäure, 75% Methanol und 7% ddH₂O. Gefärbte Gele wurden in 20% Glycerin gelagert.

Thiosulfat-Lösung:

0,02% (w/v) Na-Thiosulfat

Färbelösung:

0,2% (w/v) AgNO₃
0,015% (v/v) Formaldehyd (37%)

Entwickler-Lösung

6% (w/v) NaCO₃
0,05% (v/v) Formaldehyd (37%)
2% (v/v) Thiosulfat-Lösung

Lösungen wurden immer frisch in ddH₂O angesetzt.

4.4.7 Enzymaktivitätstests

Analyse der β -Glucuronidase-Aktivität im Platten- und Membran-Test

Für die β -Glucuronidase Platten-Tests wurden CM-Platten mit 1,125 mM X-Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronid, Sigma Aldrich) bzw. 2 mM MUG (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Hydrat, Sigma Aldrich) hergestellt. Dabei wurde für die X-Gluc-Platten jeweils 100 μ l einer 100 mg/ml Substratlösung auf CM-Platten ausgestrichen. Nach vier Stunden wurden jeweils 50 μ l verdünnter CM-Kulturen (OD_{600} : 0,5 - 1/100.000) auf 1/5 der Platte ausgestrichen, um Einzelkolonien zu erhalten. Die Platten wurden für drei Tage bei 28 °C inkubiert. Für MUG-Platten-Test wurde das Substrat in 1xGus-Extraktionspuffer gelöst, steriltfiltriert und ebenso auf CM-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden 10 μ l der CM-Kulturen (OD_{600} auf 1 eingestellt) aufgetropft und die Platten für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

Für den Membran-Test wurden 10 μ l der CM-Kulturen (OD_{600} auf 1 eingestellt) auf CM-Platten getropft und nach dem Trocknen mit einer Nitrozellulosemembran (Protran BA 85, Schleicher und Schuell) überschichtet. Nach zwölf stündiger Inkubation bei 28 °C wurde die Membran mit den Zellen abgezogen und mit 2 ml X-Gluc Substratlösung (11,25 mM X-Gluc in 1x Gus-Extraktionspuffer) getränkt. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Membran fotografiert und für 30 Sekunden in flüssigem Stickstoff gebadet um die Zellen aufzuschließen. Nach weiterer Inkubation für 24 Stunden wurde die Membran erneut fotografiert.

Quantifizierung der β -Glucuronidase-Aktivität in Flüssigtests

Für die fluorimetrische Quantifizierung der β -Glucuronidase-Aktivität wurde das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid Hydrat (Sigma Aldrich) verwendet. Zunächst wurden CM-Vorkulturen über Nacht bis zu einer OD_{600} von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden 4 OD_{600} Zellen zentrifugiert (3 min, 1250 g), in 20 ml ddH₂O gewaschen und dann in 20 ml CM- oder NM-Medium aufgenommen (Start OD_{600} 0,2). Nach 6 Stunden Kultivierung wurde die OD_{600} bestimmt und durch Zentrifugation (10 min 16.060 g) und anschließender Filtration (Faltenfilter N615 No.1, Macherey-Nagel) jeweils 1 ml Überstand in ein 2 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden die filamentösen Zellkulturen, nach der Kultivierung, mit 162 μ M Digitonin (Sigma Aldrich) versetzt und für 2 min bei 28 °C vorinkubiert. Für Zellextrakte wurden Sporidien aus 1 ml Kultur zentrifugiert (10 min, 16.060 g), in 1 ml 1xGus-Extraktionspuffer gewaschen und anschließend in 200 μ l 1xGus-Extraktionspuffer aufgenommen und mit 100 μ l Glaskugeln versetzt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei 4 °C in einer Schwingmühle (Retsch, 5 min, 30 Hz). Nach Zentrifugation (4 °C, 5 min, 6080 g) wurden die Überstände 1/100 mit 1xGus-Extraktionspuffer verdünnt. Für den Enzymassay wurden jeweils 1 ml zellfreie Überstände bzw. verdünnte Zellextrakte mit 1 ml 2xGus-Assaypuffer versetzt und bei 37 °C inkubiert. Es wurden jeweils nach 0, 2, 3 und 4,5 Stunden 200 μ l Probe auf 800 μ l Gus-Stoppuffer gegeben. Abgestoppte Proben wurden

bis zur Messung dunkel bei 4 °C gelagert. Zur fluorometrischen Quantifizierung wurde eine Eichgerade durch Messung eines MU-Standards erstellt. Dazu wurde aus dem Produkt MU (4-Methylumbelliferyl, Sigma Aldrich) eine 100 µM Stocklösung mit Gus-Stoppuffer auf 0 µM - 0,1 µM - 1 µM – 10 µM und 100 µM verdünnt. Jeweils 200 µl dieser Standardlösungen wurden mit 600 µl Gus-Stoppuffer und 200 µl Gus-Extraktionspuffer (für Zellextraktmessungen) oder mit 600 µl Gus-Stoppuffer, 100 µl des jeweiligen Mediums und 100 µl Gus-Extraktionspuffer (für Überstandsmessungen) gemischt. Für die fluorimetrische Messung wurden jeweils 3x 200 µl der abgestoppten Proben und der Standard-Proben auf eine 96-Well Platte übertragen und im Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, TECAN; 365 nm Anregung, 465 nm Emission, Gain 60) gemessen. Die Proteinkonzentrationen der Zellextrakte wurden durch Bradford-Tests ermittelt.

Um die Standardgerade zur Quantifizierung von sekretierter β -Glucuronidase zu erstellen, wurde mit *E. coli* produziertes und gereinigtes Gus-SHH verwendet. Die Ansätze wurden hierzu jeweils aus 1 ml CM-Medium, 800 µl 2x Gus-Assay-Puffer (mit 1/5 höhere BSA und MUG Konzentration) und 200 µl Gus-SHH (2,5-25 ng/ml) in 2x Gus-Extraktionspuffer.

2x Gus-Extraktionspuffer:

28 µM β -Mercaptoethanol
0,8 mM EDTA pH 8,0
10 mM NaPO₄-Puffer pH 7,0
0,004 % Lauroyl-Sarcosin
0,004% Triton-X-100

2x Gus-Assay-Puffer:

1x Gus-Extraktionspuffer
+ 0,2 mg/ml BSA
+ 2 mM MUG

GUS-Stop-Puffer:

0,2 M Na₂CO₃

Analyse der lipolytischen Aktivität in Plattentests

Für den Tributyrin-Plattentests wurde CM-Festmedium (ohne Glukose) mit 1/25 Volumen einer mit Ultraschall behandelten Tributyrinemulsion (25 % Tributyrin (v/v), 2,5 % Gummi arabicum (m/v), ad ddH₂O) versetzt (modifiziert nach: Kok *et al.*, 1993). Plattentests mit Tween20/80 als Substrat wurden nach Kumar *et al.*, 2012 modifiziert. Dazu wurde CM-Festmedium (ohne Glukose) mit 0,2 % Tween20 oder Tween80 und 0,6 mM CaCl₂ versetzt. Zur Analyse der lipolytischen Aktivität von *U. maydis* Stämmen wurden dichte YEPS_L-Kulturen auf eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt und 4 µl aufgetropft. Die Platten wurden drei Tage bei 28 °C inkubiert.

Quantifizierung der lipolytischen Aktivität in Flüssigttests

Zur Analyse der lipolytischen Aktivität wurde ein nach Tigerstrom und Stelmaschuk, 1989 modifizierter Tween20/Tween80-CaCl₂ Flüssigttest angewendet. Zur Messung von Überständen wurden die entsprechenden Kulturen für 10 min bei 16.060 g zentrifugiert. Für den Assay wurden sowohl Überstände als auch native Zellextrakte (siehe 4.4.5) 1/1 mit Tween20/80-Substratlösung versetzt und bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung von hohen Aktivitäten wurde die OD₅₀₀ dabei jede Minute über einen Zeitraum von zwei Stunden ge-

messen und aus der Steigung von drei Messpunkten mit der höchsten Umsatzrate die Aktivität in OD_{500}/min ermittelt. Zur Messung von niedrigen Aktivitäten wurden die Ansätze über 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend eine Endpunktmessung der OD_{500} durchgeführt. Gemessen wurden jeweils 200 μl der Ansätze als dreifach Bestimmung in 96-Well Platten mit Hilfe des Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200, TECAN). Zur Messung von gereinigtem CalB und Uml2 wurden Überstände durch 90 μl $YEPS_L$ -Medium mit 10 μl Enzymlösung ersetzt.

Tween20/80-Substratlösung:

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

3 mM $CaCl_2$

14,7 mM Tween20 oder Tween80

5. Literaturverzeichnis

- Abouakil, N., E. Mas, N. Bruneau, A. Benajiba & D. Lombardo, (1993) Bile salt-dependent lipase biosynthesis in rat pancreatic AR 4-2 J cells. Essential requirement of N-linked oligosaccharide for secretion and expression of a fully active enzyme. *The Journal of biological chemistry* 268: 25755-25763.
- Al-Ghouleh, A.O., (2011) The role of glycosylation in allergen recognition. Dissertation. The University of Nottingham.
- Anderson, E.M., K.M. Larsson & O. Kirk, (1998) One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 16: 181-204.
- Anelli, T. & R. Sitia, (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *The EMBO journal* 27: 315-327.
- Anne, J., B. Maldonado, J. Van Impe, L. Van Mellaert & K. Bernaerts, (2012) Recombinant protein production and streptomycetes. *Journal of biotechnology* 158: 159-167.
- Ansari, I.H., B. Kwon, F.A. Osorio & A.K. Pattnaik, (2006) Influence of N-linked glycosylation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus GP5 on virus infectivity, antigenicity, and ability to induce neutralizing antibodies. *Journal of virology* 80: 3994-4004.
- Arakane, Y., Q. Zhu, M. Matsumiya, S. Muthukrishnan & K.J. Kramer, (2003) Properties of catalytic, linker and chitin-binding domains of insect chitinase. *Insect biochemistry and molecular biology* 33: 631-648.
- Aravindan, R., P. Anbumathi & T. Viruthagiri, (2007) Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology* 6: 141.
- Archer, D., D. MacKenzie, D. Jeenes & I. Roberts, (1992) Proteolytic degradation of heterologous proteins expressed in *Aspergillus niger*. *Biotechnology letters* 14: 357-362.
- Arpigny, J.L. & K.E. Jaeger, (1999) Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *The Biochemical journal* 343 Pt 1: 177-183.
- Ausubel, F., R. Brent, R. Kingstone, D. Moore, J. Seidman, J. Smith & K. Struhl, (1987) In: Current protocols in molecular biology. section 2.4. 2. In.: Wiley, New York, NY, pp.
- Ballance, D.J., F.P. Buxton & G. Turner, (1983) Transformation of *Aspergillus nidulans* by the orotidine-5'-phosphate decarboxylase gene of *Neurospora crassa*. *Biochemical and biophysical research communications* 112: 284-289.
- Ballew, N. & T. Gerngross, (2004) Production of therapeutic proteins in fungal hosts. *Expert opinion on biological therapy* 4: 623-626.
- Baneyx, F., (1999) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology* 10: 411-421.
- Banks, G.R., P.A. Shelton, N. Kanuga, D.W. Holden & A. Spanos, (1993) The *Ustilago maydis* nar1 gene encoding nitrate reductase activity: sequence and transcriptional regulation. *Gene* 131: 69-78.
- Banks, G.R. & S.Y. Taylor, (1988) Cloning of the PYR3 gene of *Ustilago maydis* and its use in DNA transformation. *Molecular and cellular biology* 8: 5417-5424.
- Banuett, F., (1992) *Ustilago maydis*, the delightful blight. *Trends Genet* 8: 174-180.
- Banuett, F., (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* 29: 179-208.
- Banuett, F. & I. Herskowitz, (1989) Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 5878-5882.
- Banuett, F. & I. Herskowitz, (2002) Bud morphogenesis and the actin and microtubule cytoskeletons during budding in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 37: 149-170.
- Bartholdson, S.J., L.Y. Bustamante, C. Crosnier, S. Johnson, S. Lea, J.C. Rayner & G.J. Wright, (2012) Semaphorin-7A is an erythrocyte receptor for *P. falciparum* merozoite-specific TRAP homolog, MTRAP. *PLoS pathogens* 8: e1003031.

- Bartnicki-Garcia, S., (2006) Chitosomes: past, present and future. *FEMS yeast research* 6: 957-965.
- Basse, C.W. & G. Steinberg, (2004) *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Molecular plant pathology* 5: 83-92.
- Baumann, S., T. Pohlmann, M. Jungbluth, A. Brachmann & M. Feldbrügge, (2012) Kinesin-3 and dynein mediate microtubule-dependent co-transport of mRNPs and endosomes. *Journal of cell science* 125: 2740-2752.
- Becht, P., J. König & M. Feldbrügge, (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *Journal of cell science* 119: 4964-4973.
- Becht, P., E. Vollmeister & M. Feldbrügge, (2005) Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell* 4: 121-133.
- Beijersbergen, A.G.M., P. Bundock, R.J. Gouka, M.J.A. De Groot & P.J.J. Hooykaas, (2001) *Agrobacterium* mediated transformation of moulds, in particular those belonging to the genus *Aspergillus*. US Patent: 6255,115B1.
- Bell, J.D. & R.L. Biltonen, (1992) Molecular details of the activation of soluble phospholipase A2 on lipid bilayers. Comparison of computer simulations with experimental results. *The Journal of biological chemistry* 267: 11046-11056.
- Benton, T., T. Chen, M. McEntee, B. Fox, D. King, R. Crombie, T.C. Thomas & C. Bebbington, (2002) The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein. *Cytotechnology* 38: 43-46.
- Bessette, P.H., F. Aslund, J. Beckwith & G. Georgiou, (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13703-13708.
- Bier, M., (1955) [106] Lipases: $\text{RCOOR} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{R}'\text{OH}$. In: Methods in enzymology. Academic Press, pp. 627-642.
- Birsoy, B., M. Kofron, K. Schaible, C. Wylie & J. Heasman, (2006) Vg 1 is an essential signaling molecule in *Xenopus* development. *Development* 133: 15-20.
- Blank, K., J. Morfill, H. Gump & H.E. Gaub, (2006) Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli*. *Journal of biotechnology* 125: 474-483.
- Böhmer, M., T. Colby, C. Böhmer, A. Brautigam, J. Schmidt & M. Bölker, (2007) Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics* 7: 675-685.
- Bölker, M., (2001) *Ustilago maydis*--a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* 147: 1395-1401.
- Bölker, M., H.U. Bohnert, K.H. Braun, J. Gorl & R. Kahmann, (1995) Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). *Molecular & general genetics* : MGG 248: 547-552.
- Bölker, M., M. Urban & R. Kahmann, (1992) The a mating type locus of *U. maydis* specifies cell signaling components. *Cell* 68: 441-450.
- Boller, T., (1995) Chemoperception of Microbial Signals in Plant-Cells. *Annu Rev Plant Phys* 46: 189-214.
- Boothroyd, B., J.A. Thorn & R.H. Haskins, (1956) Biochemistry of the ustilaginales. XII. Characterization of extracellular glycolipids produced by *Ustilago* sp. *Can J Biochem Physiol* 34: 10-14.
- Bottin, A., J. Kämper & R. Kahmann, (1996) Isolation of a carbon source-regulated gene from *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics* : MGG 253: 342-352.
- Brachmann, A., J. König, C. Julius & M. Feldbrügge, (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 272: 216-226.
- Brachmann, A., G. Weinzierl, J. Kämper & R. Kahmann, (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* 42: 1047-1063.
- Bradford, M.M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.

- Brefort, T., G. Doehlemann, A. Mendoza-Mendoza, S. Reissmann, A. Djamei & R. Kahmann, (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annual review of phytopathology* 47: 423-445.
- Brocca, S., M. Persson, E. Wehtje, P. Adlercreutz, L. Alberghina & M. Lotti, (2000) Mutants provide evidence of the importance of glycosydic chains in the activation of lipase 1 from *Candida rugosa*. *Protein science : a publication of the Protein Society* 9: 985-990.
- Broekhuisen, M.P., I.E. Mattern, R. Contreras, J.R. Kinghorn & C.A. van den Hondel, (1993) Secretion of heterologous proteins by *Aspergillus niger*: production of active human interleukin-6 in a protease-deficient mutant by KEX2-like processing of a glucoamylase-hIL6 fusion protein. *Journal of biotechnology* 31: 135-145.
- Broomfield, P.L. & J.A. Hargreaves, (1992) A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Current genetics* 22: 117-121.
- Brzozowski, A.M., U. Derewenda, Z.S. Derewenda, G.G. Dodson, D.M. Lawson, J.P. Turkenburg, F. Bjorkling, B. Hüge-Jensen, S.A. Patkar & L. Thim, (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351: 491-494.
- Budde, A.D. & S.A. Leong, (1989) Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. *Mycopathologia* 108: 125-133.
- Buerth, C., Kovacic, F., Stock, J., Terfrüchte, M., Wilhelm, S., Jaeger, K.E., Feldbrügge, M., Schipper, K., Ernst, J.F., Tielker, D., (2014) Uml2 is a novel CalB-type lipase of *Ustilago maydis* with phospholipase A activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 4963-4973.
- Chen, R., (2012) Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. *Biotechnology advances* 30: 1102-1107.
- Choi, B.K., P. Bobrowicz, R.C. Davidson, S.R. Hamilton, D.H. Kung, H. Li, R.G. Miele, J.H. Nett, S. Wildt & T.U. Gerngross, (2003) Use of combinatorial genetic libraries to humanize N-linked glycosylation in the yeast *Pichia pastoris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5022-5027.
- Choi, J.H., K.C. Keum & S.Y. Lee, (2006) Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. *Chemical Engineering Science* 61: 876-885.
- Chow, J., F. Kovacic, Y. Dall'Antonia, U. Krauss, F. Fersini, C. Schmeisser, B. Lauinger, P. Bongen, J. Pietruszka, M. Schmidt, I. Menyes, U.T. Bornscheuer, M. Eckstein, O. Thum, A. Liese, J. Mueller-Dieckmann, K.E. Jaeger & W.R. Streit, (2012) The metagenome-derived enzymes LipS and LipT increase the diversity of known lipases. *PLoS one* 7: e47665.
- Christensen, J.J., (1963) In: Corn smut caused by *Ustilago maydis*. American Phytopathological Society St Paul, Minn.
- Christensen, P.U., J. Davey & O. Nielsen, (1997) The *Schizosaccharomyces pombe* mam1 gene encodes an ABC transporter mediating secretion of M-factor. *Molecular & general genetics : MGG* 255: 226-236.
- Cohen, S.N., A.C. Chang & L. Hsu, (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69: 2110-2114.
- Colussi, P.A., C.A. Specht & C.H. Taron, (2005) Characterization of a nucleus-encoded chitinase from the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Applied and environmental microbiology* 71: 2862-2869.
- Couturier, M., D. Navarro, C. Olive, D. Chevret, M. Haon, A. Favel, L. Lesage-Meessen, B. Henrissat, P.M. Coutinho & J.G. Berrin, (2012) Post-genomic analyses of fungal lignocellulosic biomass degradation reveal the unexpected potential of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *BMC genomics* 13: 57.
- Crosnier, C., L.Y. Bustamante, S.J. Bartholdson, A.K. Bei, M. Theron, M. Uchikawa, S. Mboup, O. Ndir, D.P. Kwiatkowski, M.T. Duraisingh, J.C. Rayner & G.J. Wright, (2011) Basigin is a receptor essential for erythrocyte invasion by *Plasmodium falciparum*. *Nature* 480: 534-537.

- Dalmau, E., J.L. Montesinos, M. Lotti & C. Casas, (2000) Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme and microbial technology* 26: 657-663.
- Damasceno, L.M., C.J. Huang & C.A. Batt, (2012) Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production. *Applied microbiology and biotechnology* 93: 31-39.
- de Jonge, R., H. Peter van Esse, A. Kombrink, T. Shinya, Y. Desaki, R. Bours, S. van der Krol, N. Shibuya, M.H.A.J. Joosten & B.P.H.J. Thomma, (2010) Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* 329: 953-955.
- De Schutter, K., Y.C. Lin, P. Tiels, A. Van Hecke, S. Glinka, J. Weber-Lehmann, P. Rouze, Y. Van de Peer & N. Callewaert, (2009) Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature biotechnology* 27: 561-566.
- Dean, R., J.A. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis & G.D. Foster, (2012) The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology* 13: 414-430.
- Demain, A.L. & P. Vaishnav, (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances* 27: 297-306.
- Denny, P.W., S. Gokool, D.G. Russell, M.C. Field & D.F. Smith, (2000) Acylation-dependent protein export in *Leishmania*. *The Journal of biological chemistry* 275: 11017-11025.
- Derman, A.I., W.A. Prinz, D. Belin & J. Beckwith, (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* 262: 1744-1747.
- Desai, P.N., N. Shrivastava & H. Padh, (2010) Production of heterologous proteins in plants: strategies for optimal expression. *Biotechnology advances* 28: 427-435.
- Dickinson, K., V. Keer, C.A. Hitchcock & D.J. Adams, (1991) Microsomal chitinase activity from *Candida albicans*. *Biochimica et biophysica acta* 1073: 177-182.
- Doehlemann, G., K. van der Linde, D. Assmann, D. Schwammbach, A. Hof, A. Mohanty, D. Jackson & R. Kahmann, (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS pathogens* 5: e1000290.
- Doehlemann, G., R. Wahl, R.J. Horst, L.M. Voll, B. Usadel, F. Poree, M. Stitt, J. Pons-Kuhnemann, U. Sonnewald, R. Kahmann & J. Kämper, (2008a) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 56: 181-195.
- Doehlemann, G., R. Wahl, M. Vranes, R.P. de Vries, J. Kämper & R. Kahmann, (2008b) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* 165: 29-40.
- Ebert, A.D., M. Laussmann, S. Wegehangel, L. Kaderali, H. Erfle, J. Reichert, J. Lechner, H.D. Beer, R. Pepperkok & W. Nickel, (2010) Tec-kinase-mediated phosphorylation of fibroblast growth factor 2 is essential for unconventional secretion. *Traffic* 11: 813-826.
- Fatal, N., T. Suntio & M. Makarow, (2002) Selective protein exit from yeast endoplasmic reticulum in absence of functional COPII coat component Sec13p. *Molecular biology of the cell* 13: 4130-4140.
- Feldbrügge, M., M. Bölker, G. Steinberg, J. Kämper & R. Kahmann, (2006) Regulatory and Structural Networks Orchestrating Mating, Dimorphism, Cell Shape, and Pathogenesis in *Ustilago maydis*. In: Growth, Differentiation and Sexuality. U. Kües & R. Fischer (eds). Springer Berlin Heidelberg, pp. 375-391.
- Feldbrügge, M., J. Kämper, G. Steinberg & R. Kahmann, (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Current opinion in microbiology* 7: 666-672.
- Feldbrügge, M., R. Kellner & K. Schipper, (2013) The biotechnological use and potential of plant pathogenic smut fungi. *Applied microbiology and biotechnology* 97: 3253-3265.
- Fernandez-Alvarez, A., A. Elias-Villalobos & J.I. Ibeas, (2010) Protein glycosylation in the phytopathogen *Ustilago maydis*: From core oligosaccharide synthesis to the ER glycoprotein quality control system, a genomic analysis. *Fungal genetics and biology : FG & B* 47: 727-735.

- Fischer, R., S. Schillberg, S. Hellwig, R.M. Twyman & J. Drossard, (2012) GMP issues for recombinant plant-derived pharmaceutical proteins. *Biotechnology advances* 30: 434-439.
- Flor-Parra, I., M. Vranes, J. Kämper & J. Perez-Martin, (2006) Biz1, a zinc finger protein required for plant invasion by *Ustilago maydis*, regulates the levels of a mitotic cyclin. *The Plant cell* 18: 2369-2387.
- Fotheringham, S. & W.K. Holloman, (1989) Cloning and disruption of *Ustilago maydis* genes. *Molecular and cellular biology* 9: 4052-4055.
- Fuchs, U., G. Hause, I. Schuchardt & G. Steinberg, (2006) Endocytosis is essential for pathogenic development in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *The Plant cell* 18: 2066-2081.
- Fuchs, U., I. Manns & G. Steinberg, (2005) Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell* 16: 2746-2758.
- Fusetti, F., H. von Moeller, D. Houston, H.J. Rozeboom, B.W. Dijkstra, R.G. Boot, J.M. Aerts & D.M. van Aalten, (2002) Structure of human chitotriosidase. Implications for specific inhibitor design and function of mammalian chitinase-like lectins. *The Journal of biological chemistry* 277: 25537-25544.
- Garcia-Muse, T., G. Steinberg & J. Perez-Martin, (2003) Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Eukaryotic cell* 2: 494-500.
- Garrido, E. & J. Perez-Martin, (2003) The *crk1* gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* 47: 729-743.
- Gellissen, G., (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Applied microbiology and biotechnology* 54: 741-750.
- Gellissen, G., (ed.) (2005) In: Production of recombinant proteins. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- Gellissen, G., Z.A. Janowicz, U. Weydemann, K. Melber, A.W. Strasser & C.P. Hollenberg, (1992) High-level expression of foreign genes in *Hansenula polymorpha*. *Biotechnology advances* 10: 179-189.
- Gellissen, G., G. Kunze, C. Gaillardin, J.M. Cregg, E. Berardi, M. Veenhuis & I. van der Klei, (2005) New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica* - a comparison. *FEMS yeast research* 5: 1079-1096.
- Ghannoum, M.A., (2000) Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews* 13: 122-143, table of contents.
- Ghosh, P.K., R.K. Saxena, R. Gupta, R.P. Yadav & S. Davidson, (1996) Microbial lipases: production and applications. *Science progress* 79 (Pt 2): 119-157.
- Gilham, D. & R. Lehner, (2004) The physiological role of triacylglycerol hydrolase in lipid metabolism. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* 5: 303-309.
- Gillissen, B., J. Bergemann, C. Sandmann, B. Schroer, M. Bölker & R. Kahmann, (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* 68: 647-657.
- Gilmore, R., P. Walter & G. Blobel, (1982) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *The Journal of cell biology* 95: 470-477.
- Girod, P.A., M. Zahn-Zabal & N. Mermod, (2005) Use of the chicken lysozyme 5' matrix attachment region to generate high producer CHO cell lines. *Biotechnology and bioengineering* 91: 1-11.
- Giuliani, F., A. Grieve & C. Rabouille, (2011) Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Current opinion in cell biology* 23: 498-504.
- Gold, S.E., G. Bakkeren, J.E. Davies & J.W. Kronstad, (1994) Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis*. *Gene* 142: 225-230.
- Gouka, R.J., P.J. Punt & C.A. van den Hondel, (1997) Efficient production of secreted proteins by *Aspergillus*: progress, limitations and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* 47: 1-11.

- Hamilton, S.R., P. Bobrowicz, B. Bobrowicz, R.C. Davidson, H. Li, T. Mitchell, J.H. Nett, S. Rausch, T.A. Stadheim, H. Wischnewski, S. Wildt & T.U. Gerngross, (2003) Production of complex human glycoproteins in yeast. *Science* 301: 1244-1246.
- Hartl, L., S. Zach & V. Seidl-Seiboth, (2012) Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential. *Applied microbiology and biotechnology* 93: 533-543.
- Hartmann, H.A., J. Kruger, F. Lottspeich & R. Kahmann, (1999) Environmental signals controlling sexual development of the corn Smut fungus *Ustilago maydis* through the transcriptional regulator Prf1. *The Plant cell* 11: 1293-1306.
- Haskins, R.H., (1950) Biochemistry of the Ustilaginales: I. Preliminary cultural studies of *Ustilago zaeae*. *Can J Res C* 28: 213 - 223.
- Heimel, K., M. Scherer, M. Vranes, R. Wahl, C. Pothiratana, D. Schuler, V. Vincon, F. Finkernagel, I. Flor-Parra & J. Kämper, (2010) The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS pathogens* 6: e1001035.
- Helenius, A. & M. Aebi, (2001) Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291: 2364-2369.
- Helenius, A. & M. Aebi, (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual review of biochemistry* 73: 1019-1049.
- Helms, J.B. & J.E. Rothman, (1992) Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* 360: 352-354.
- Hitzeman, R.A., F.E. Hagie, H.L. Levine, D.V. Goeddel, G. Ammerer & B.D. Hall, (1981) Expression of a human gene for interferon in yeast. *Nature* 293: 717-722.
- Høegh, I., S. Patkar, T. Halkier & M.T. Hansen, (1995) Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botany* 73: 869-875.
- Hoffman, C.S. & F. Winston, (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57: 267-272.
- Hollenberg, C.P. & G. Gellissen, (1997) Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current opinion in biotechnology* 8: 554-560.
- Holliday, R., (1964) The Induction of Mitotic Recombination by Mitomycin C in *Ustilago* and *Saccharomyces*. *Genetics* 50: 323-335.
- Holliday, R., (1974) Molecular aspects of genetic exchange and gene conversion. *Genetics* 78: 273-287.
- Houdebine, L.M., (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 32: 107-121.
- Huang, C.J., L.M. Damasceno, K.A. Anderson, S. Zhang, L.J. Old & C.A. Batt, (2011) A proteomic analysis of the *Pichia pastoris* secretome in methanol-induced cultures. *Applied microbiology and biotechnology* 90: 235-247.
- Huang, C.J., H. Lin & X. Yang, (2012a) Industrial production of recombinant therapeutics in *Escherichia coli* and its recent advancements. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 39: 383-399.
- Huang, Q.S., X.L. Xie, G. Liang, F. Gong, Y. Wang, X.Q. Wei, Q. Wang, Z.L. Ji & Q.X. Chen, (2012b) The GH18 family of chitinases: their domain architectures, functions and evolutions. *Glycobiology* 22: 23-34.
- Huang, Y., Y. Li, Y.G. Wang, X. Gu, Y. Wang & B.F. Shen, (2007) An efficient and targeted gene integration system for high-level antibody expression. *Journal of immunological methods* 322: 28-39.
- Hughes, R.C., (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1473: 172-185.
- Humphreys, A.M. & G.W. Gooday, (1984) Properties of Chitinase Activities from *Mucor mucedo*: Evidence for a Membrane-bound Zymogenic Form. *Journal of general microbiology* 130: 1359-1366.
- Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White, (1990) In: PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego, USA, Academic Press.

- Itakura, K., T. Hirose, R. Crea, A.D. Riggs, H.L. Heyneker, F. Bolivar & H.W. Boyer, (1977) Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science* 198: 1056-1063.
- Iturriaga, G., R.A. Jefferson & M.W. Bevan, (1989) Endoplasmic reticulum targeting and glycosylation of hybrid proteins in transgenic tobacco. *The Plant cell* 1: 381-390.
- Jaeger, K.E. & M.T. Reetz, (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in biotechnology* 16: 396-403.
- Jarvis, D.L., (2009) Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods in enzymology* 463: 191-222.
- Jayapal, K.P., K.F. Wlaschin, W. Hu & M.G. Yap, (2007) Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* 103: 40.
- Jefferson, R.A., S.M. Burgess & D. Hirsh, (1986) beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83: 8447-8451.
- Johnson, A.E. & M.A. van Waes, (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annual review of cell and developmental biology* 15: 799-842.
- Jonson, B., L. Malm, A. Ivarsson, M. Benthin & C.J. Lamm, (1983) Automated rhinomanometry. *Rhinology* 21: 265-272.
- Jung, S. & S. Park, (2008) Improving the expression yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis. *Biotechnology letters* 30: 717-722.
- Kämper, J., R. Kahmann, M. Bölker, L.J. Ma, T. Brefort, B.J. Saville, F. Banuett, J.W. Kronstad, S.E. Gold, O. Müller, M.H. Perlin, H.A. Wosten, R. de Vries, J. Ruiz-Herrera, C.G. Reynaga-Pena, K. Snetselaar, M. McCann, J. Perez-Martin, M. Feldbrügge, C.W. Basse, G. Steinberg, J.I. Ibeas, W. Holloman, P. Guzman, M. Farman, J.E. Stajich, R. Sentandreu, J.M. Gonzalez-Prieto, J.C. Kennell, L. Molina, J. Schirawski, A. Mendoza-Mendoza, D. Greilinger, K. Munch, N. Rossel, M. Scherer, M. Vranes, O. Ladendorf, V. Vincon, U. Fuchs, B. Sandrock, S. Meng, E.C. Ho, M.J. Cahill, K.J. Boyce, J. Klose, S.J. Klosterman, H.J. Deelstra, L. Ortiz-Castellanos, W. Li, P. Sanchez-Alonso, P.H. Schreier, I. Hauser-Hahn, M. Vaupel, E. Koopmann, G. Friedrich, H. Voss, T. Schluter, J. Margolis, D. Platt, C. Swimmer, A. Gnirke, F. Chen, V. Vysotskaia, G. Mannhaupt, U. Guldener, M. Munsterkotter, D. Haase, M. Oesterheld, H.W. Mewes, E.W. Mauceli, D. DeCaprio, C.M. Wade, J. Butler, S. Young, D.B. Jaffe, S. Calvo, C. Nusbaum, J. Galagan & B.W. Birren, (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* 444: 97-101.
- Kämper, J., M. Reichmann, T. Romeis, M. Bölker & R. Kahmann, (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* 81: 73-83.
- Kapoor, M. & M.N. Gupta, (2012) Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry* 47: 555-569.
- Karhinen, L., R.N. Bastos, E. Jokitalo & M. Makarow, (2005) Endoplasmic reticulum exit of a secretory glycoprotein in the absence of sec24p family proteins in yeast. *Traffic* 6: 562-574.
- Kaufman, R.J., L.C. Wasley, A.J. Spiliotes, S.D. Gossels, S.A. Latt, G.R. Larsen & R.M. Kay, (1985) Coamplification and coexpression of human tissue-type plasminogen activator and murine dihydrofolate reductase sequences in Chinese hamster ovary cells. *Molecular and cellular biology* 5: 1750-1759.
- Keller, M., A. Ruegg, S. Werner & H.D. Beer, (2008) Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell* 132: 818-831.
- Kelly, J.M. & M.J. Hynes, (1985) Transformation of *Aspergillus niger* by the amdS gene of *Aspergillus nidulans*. *The EMBO journal* 4: 475-479.
- Keon, J.P., G.A. White & J.A. Hargreaves, (1991) Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen, *Ustilago maydis*. *Current genetics* 19: 475-481.
- Keränen, S. & M. Penttilä, (1995) Production of recombinant proteins in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Current opinion in biotechnology* 6: 534-537.

- Khrunyk, Y., K. Munch, K. Schipper, A.N. Lupas & R. Kahmann, (2010) The use of FLP-mediated recombination for the functional analysis of an effector gene family in the biotrophic smut fungus *Ustilago maydis*. *The New phytologist* 187: 957-968.
- Kim, J.Y., Y.G. Kim & G.M. Lee, (2012) CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied microbiology and biotechnology* 93: 917-930.
- Kim, M.W., E.J. Kim, J.Y. Kim, J.S. Park, D.B. Oh, Y. Shimma, Y. Chiba, Y. Jigami, S.K. Rhee & H.A. Kang, (2006) Functional characterization of the *Hansenula polymorpha* HOC1, OCH1, and OCR1 genes as members of the yeast OCH1 mannosyltransferase family involved in protein glycosylation. *The Journal of biological chemistry* 281: 6261-6272.
- Kinal, H., J.S. Tao & J.A. Bruenn, (1991) An expression vector for the phytopathogenic fungus, *Ustilago maydis*. *Gene* 98: 129-134.
- Kirk, O. & M.W. Christensen, (2002) Lipases from *Candida antarctica*: Unique Biocatalysts from a Unique Origin. *Organic Process Research & Development* 6: 446-451.
- Kitamoto, D., H. Isoda & T. Nakahara, (2002) Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants--from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of bioscience and bioengineering* 94: 187-201.
- Kito, M., S. Itami, Y. Fukano, K. Yamana & T. Shibui, (2002) Construction of engineered CHO strains for high-level production of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology* 60: 442-448.
- Kjaerulff, S., S. Müller & M.R. Jensen, (2005) Alternative protein secretion: the Mam1 ABC transporter supports secretion of M-factor linked GFP in fission yeast. *Biochemical and biophysical research communications* 338: 1853-1859.
- Kleizen, B. & I. Braakman, (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current opinion in cell biology* 16: 343-349.
- Klement, T., S. Milker, G. Jager, P.M. Grande, P. Dominguez de Maria & J. Buchs, (2012) Biomass pretreatment affects *Ustilago maydis* in producing itaconic acid. *Microbial cell factories* 11: 43.
- Koepke, J., (2010) Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*. . *Dissertation. Philipps-Universität Marburg*.
- Koepke, J., F. Kaffarnik, C. Haag, K. Zarnack, N.M. Luscombe, J. König, J. Ule, R. Kellner, D. Begerow & M. Feldbrügge, (2011) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 10: M111 011213.
- Kojic, M. & W.K. Holloman, (2000) Shuttle vectors for genetic manipulations in *Ustilago maydis*. *Canadian journal of microbiology* 46: 333-338.
- König, J., S. Baumann, J. Koepke, T. Pohlmann, K. Zarnack & M. Feldbrügge, (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *The EMBO journal* 28: 1855-1866.
- Kozlov, G., M. Menade, A. Rosenauer, L. Nguyen & K. Gehring, (2010) Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *Journal of molecular biology* 397: 397-407.
- Kozlov, G., J.F. Trempe, K. Khaleghpour, A. Kahvejian, I. Ekiel & K. Gehring, (2001) Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4409-4413.
- Kronstad, J.W., J. Wang, S.F. Covert, D.W. Holden, G.L. McKnight & S.A. Leong, (1989) Isolation of metabolic genes and demonstration of gene disruption in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Gene* 79: 97-106.
- Kügel, H., G. Fiedler, C. Smith & S. Baumberg, (1993) Sequence and transcriptional analysis of the nourseothricin acetyltransferase-encoding gene nat1 from *Streptomyces noursei*. *Gene* 127: 127-131.
- Kumar, D., L. Kumar, S. Nagar, C. Raina, R. Parshad & V.K. Gupta, (2012) Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus sp.* strain DVL2 and its

- potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Archives of Applied Science Research* 4: 1763-1770.
- Kunigo, M., C. Buerth, D. Tielker & J.F. Ernst, (2013) Heterologous protein secretion by *Candida utilis*. *Applied microbiology and biotechnology* 97: 7357-7368.
- Laemmli, U.K., (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larsen, M.W., U.T. Bornscheuer & K. Hult, (2008) Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems. *Protein expression and purification* 62: 90-97.
- Lawrence, C.J., L.C. Harper, M.L. Schaeffer, T.Z. Sen, T.E. Seigfried & D.A. Campbell, (2008) MaizeGDB: The maize model organism database for basic, translational, and applied research. *International journal of plant genomics* 2008: 496957.
- Lee, M.C., E.A. Miller, J. Goldberg, L. Orci & R. Schekman, (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology* 20: 87-123.
- Lehmler, C., G. Steinberg, K.M. Snetselaar, M. Schliwa, R. Kahmann & M. Bölker, (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* 16: 3464-3473.
- Lenz, J.H., I. Schuchardt, A. Straube & G. Steinberg, (2006) A dynein loading zone for retrograde endosome motility at microtubule plus-ends. *The EMBO journal* 25: 2275-2286.
- Li, H., N. Sethuraman, T.A. Stadheim, D. Zha, B. Prinz, N. Ballew, P. Bobrowicz, B.K. Choi, W.J. Cook, M. Cukan, N.R. Houston-Cummings, R. Davidson, B. Gong, S.R. Hamilton, J.P. Hoopes, Y. Jiang, N. Kim, R. Mansfield, J.H. Nett, S. Rios, R. Strawbridge, S. Wildt & T.U. Gerngross, (2006) Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature biotechnology* 24: 210-215.
- Liang, S., B. Wang, L. Pan, Y. Ye, M. He, S. Han, S. Zheng, X. Wang & Y. Lin, (2012) Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC genomics* 13: 738.
- Liu, D., R.D. Schmid & M. Rusnak, (2006) Functional expression of *Candida antarctica* lipase B in the *Escherichia coli* cytoplasm--a screening system for a frequently used biocatalyst. *Applied microbiology and biotechnology* 72: 1024-1032.
- Liu, T., T. Wang, X. Li & X. Liu, (2008) Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (cbh1) promoter optimization. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40: 158-165.
- Liu, Y., C.M. Koh & L. Ji, (2011) Bioconversion of crude glycerol to glycolipids in *Ustilago maydis*. *Bioresource technology* 102: 3927-3933.
- Loubradou, G., A. Brachmann, M. Feldbrügge & R. Kahmann, (2001) A homologue of the transcriptional repressor Ssn6p antagonizes cAMP signalling in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* 40: 719-730.
- Malhotra, V., (2013) Unconventional protein secretion: an evolving mechanism. *The EMBO journal* 32: 1660-1664.
- Mamedov, T., A. Ghosh, R.M. Jones, V. Mett, C.E. Farrance, K. Musiychuk, A. Horsey & V. Yusibov, (2012) Production of non-glycosylated recombinant proteins in *Nicotiana benthamiana* plants by co-expressing bacterial PNGase F. *Plant biotechnology journal* 10: 773-782.
- Martinelle, M., M. Holmquist & K. Hult, (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et biophysica acta* 1258: 272-276.
- Martinelle, M. & K. Hult, (1995) Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B. *Biochimica et biophysica acta* 1251: 191-197.
- Martinez-Espinoza, A.D., M.D. Garcia-Pedrajas & S.E. Gold, (2002) The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal genetics and biology : FG & B* 35: 1-20.
- Mattanovich, D., A. Graf, J. Stadlmann, M. Dragosits, A. Redl, M. Maurer, M. Kleinheinz, M. Sauer, F. Altmann & B. Gasser, (2009) Genome, secretome and glucose transport

- highlight unique features of the protein production host *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories* 8: 29.
- Mergulhao, F.J., D.K. Summers & G.A. Monteiro, (2005) Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances* 23: 177-202.
- Mewes, H.W., D. Frishman, U. Guldener, G. Mannhaupt, K. Mayer, M. Mokrejs, B. Morgenstern, M. Munsterkötter, S. Rudd & B. Weil, (2002) MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic acids research* 30: 31-34.
- Meyer, D.I. & B. Dobberstein, (1980) A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: requirements for its extraction and reassociation with the membrane. *The Journal of cell biology* 87: 498-502.
- Meyer, V., (2008) Genetic engineering of filamentous fungi--progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances* 26: 177-185.
- Michaelis, S., (1993) STE6, the yeast α -factor transporter. *Seminars in cell biology* 4: 17-27.
- Moir, D.T. & J.I. Mao, (1990) Protein secretion systems in microbial and mammalian cells. *Bioprocess Technol* 9: 67-94.
- Müller, M., (2005) Twin-arginine-specific protein export in *Escherichia coli*. *Research in microbiology* 156: 131-136.
- Müller, O., P.H. Schreier & J.F. Uhrig, (2008) Identification and characterization of secreted and pathogenesis-related proteins in *Ustilago maydis*. *Molecular genetics and genomics* : MGG 279: 27-39.
- Müller, P., C. Aichinger, M. Feldbrügge & R. Kahmann, (1999) The MAP kinase kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* 34: 1007-1017.
- Müller, S., T. Sandal, P. Kamp-Hansen & H. Dalbøge, (1998) Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* 14: 1267-1283.
- Murashima, K., C.L. Chen, A. Kosugi, Y. Tamaru, R.H. Doi & S.L. Wong, (2002) Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. *Journal of bacteriology* 184: 76-81.
- Murby, M., M. Uhlen & S. Stahl, (1996) Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 7: 129-136.
- NAHAS, E., (1988) Control of Lipase Production by *Rhizopus oligosporus* under Various Growth Conditions. *Journal of general microbiology* 134: 227-233.
- Neilands, J.B., (1995) Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *The Journal of biological chemistry* 270: 26723-26726.
- Neuman-Silberberg, F.S. & T. Schüpbach, (1996) The Drosophila TGF- α -like protein Gurken: expression and cellular localization during Drosophila oogenesis. *Mechanisms of development* 59: 105-113.
- Nevalainen, K.M., V.S. Te'o & P.L. Bergquist, (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in biotechnology* 23: 468-474.
- Ni, Y. & R. Chen, (2009) Extracellular recombinant protein production from *Escherichia coli*. *Biotechnology letters* 31: 1661-1670.
- Nickel, W., (2005) Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic* 6: 607-614.
- Nickel, W., (2011) The unconventional secretory machinery of fibroblast growth factor 2. *Traffic* 12: 799-805.
- Nickel, W. & C. Rabouille, (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10: 148-155.
- Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa & E.Y. Park, (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied microbiology and biotechnology* 84: 597-606.

- Ollis, D.L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman, J. Schrag & et al., (1992) The alpha/beta hydrolase fold. *Protein engineering* 5: 197-211.
- Outchkourov, N.S., W. Roeffen, A. Kaan, J. Jansen, A. Luty, D. Schuiffel, G.J. van Gemert, M. van de Vegte-Bolmer, R.W. Sauerwein & H.G. Stunnenberg, (2008) Correctly folded Pfs48/45 protein of *Plasmodium falciparum* elicits malaria transmission-blocking immunity in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 4301-4305.
- Pan, Y., P. Lu, Y. Wang, L. Yin, H. Ma, G. Ma, K. Chen & Y. He, (2012) In silico identification of novel chitinase-like proteins in the silkworm, *Bombyx mori*, genome. *Journal of insect science* 12: 150.
- Pankiv, S., T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J.A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy & T. Johansen, (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *The Journal of biological chemistry* 282: 24131-24145.
- Parekh, R., K. Forrester & D. Wittrup, (1995) Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates the protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein expression and purification* 6: 537-545.
- Plou, F., M. Ferrer, O. Nuero, M. Calvo, M. Alcalde, F. Reyes & A. Ballesteros, (1998) Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnology Techniques* 12: 183-186.
- Porro, D., M. Sauer, P. Branduardi & D. Mattanovich, (2005) Recombinant protein production in yeasts. *Molecular biotechnology* 31: 245-259.
- Punt, P.J., N. van Biezen, A. Conesa, A. Albers, J. Mangnus & C. van den Hondel, (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends in biotechnology* 20: 200-206.
- Rabouille, C., V. Malhotra & W. Nickel, (2012) Diversity in unconventional protein secretion. *Journal of cell science* 125: 5251-5255.
- Ramezani-Rad, M., C.P. Hollenberg, J. Lauber, H. Wedler, E. Griess, C. Wagner, K. Albermann, J. Hani, M. Piontek, U. Dahlems & G. Gellissen, (2003) The *Hansenula polymorpha* (strain CBS4732) genome sequencing and analysis. *FEMS yeast research* 4: 207-215.
- Rechsteiner, M. & S.W. Rogers, (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences* 21: 267-271.
- Rigaut, G., A. Shevchenko, B. Rutz, M. Wilm, M. Mann & B. Seraphin, (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature biotechnology* 17: 1030-1032.
- Roberts, I.N., R.P. Oliver, P.J. Punt & C.A. van den Hondel, (1989) Expression of the *Escherichia coli* beta-glucuronidase gene in industrial and phytopathogenic filamentous fungi. *Current genetics* 15: 177-180.
- Rogers, S., R. Wells & M. Rechsteiner, (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- Romeis, T., A. Brachmann, R. Kahmann & J. Kämper, (2000) Identification of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Molecular microbiology* 37: 54-66.
- Roth, A.F. & N.G. Davis, (2000) Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. *The Journal of biological chemistry* 275: 8143-8153.
- Rotticci-Mulder, J.C., M. Gustavsson, M. Holmquist, K. Hult & M. Martinelle, (2001) Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain. *Protein expression and purification* 21: 386-392.
- Russell, D., N.J. Oldham & B.G. Davis, (2009) Site-selective chemical protein glycosylation protects from autolysis and proteolytic degradation. *Carbohydrate research* 344: 1508-1514.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch & T. Maniatis, (1989) In: Molecular cloning. Cold spring harbor laboratory press New York.

- Sandkvist, M. & M. Bagdasarian, (1996) Secretion of recombinant proteins by Gram-negative bacteria. *Current opinion in biotechnology* 7: 505-511.
- Scherer, M., K. Heimel, V. Starke & J. Kämper, (2006) The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *The Plant cell* 18: 2388-2401.
- Schmidt, F.R., (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology* 65: 363-372.
- Schuchardt, I., D. Assmann, E. Thines, C. Schuberth & G. Steinberg, (2005) Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular biology of the cell* 16: 5191-5201.
- Schulz, B., F. Banuett, M. Dahl, R. Schlesinger, W. Schafer, T. Martin, I. Herskowitz & R. Kahmann, (1990) The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60: 295-306.
- Schuster, A. & M. Schmoll, (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology* 87: 787-799.
- Scorer, C.A., R.G. Buckholz, J.J. Clare & M.A. Romanos, (1993) The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 136: 111-119.
- Seidl, V., (2008) Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biology Reviews* 22: 36-42.
- Shokri, A., A.M. Sanden & G. Larsson, (2003) Cell and process design for targeting of recombinant protein into the culture medium of *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology* 60: 654-664.
- Singh, G.P., M. Ganapathi, K.S. Sandhu & D. Dash, (2006) Intrinsic unstructuredness and abundance of PEST motifs in eukaryotic proteomes. *Proteins* 62: 309-315.
- Singh, P. & S.S. Cameotra, (2004) Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in biotechnology* 22: 142-146.
- Snetselaar, K.M., M. Bölker & R. Kahmann, (1996) *Ustilago maydis* Mating Hyphae Orient Their Growth toward Pheromone Sources. *Fungal genetics and biology : FG & B* 20: 299-312.
- Snetselaar, K.M. & C.W. Mims, (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycological Research* 98: 347-355.
- Southern, E.M., (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 98: 503-517.
- Specht, C.A., C.C. DiRusso, C.P. Novotny & R.C. Ullrich, (1982) A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Analytical biochemistry* 119: 158-163.
- Spellig, T., M. Bölker, F. Lottspeich, R.W. Frank & R. Kahmann, (1994) Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* 13: 1620-1627.
- Spellig, T., A. Bottin & R. Kahmann, (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics : MGG* 252: 503-509.
- Stehr, F., M. Kretschmar, C. Kröger, B. Hube & W. Schäfer, (2003) Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22: 347-355.
- Steinberg, G., M. Schliwa, C. Lehmler, M. Bölker, R. Kahmann & J.R. McIntosh, (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *Journal of cell science* 111 (Pt 15): 2235-2246.
- Steringer, J.P., S. Bleicken, H. Andreas, S. Zacherl, M. Laussmann, K. Temmerman, F.X. Contreras, T.A. Bharat, J. Lechner, H.M. Müller, J.A. Briggs, A.J. Garcia-Saez & W. Nickel, (2012) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P2)-dependent oligomerization of fibroblast growth factor 2 (FGF2) triggers the formation of a lipidic membrane pore implicated in unconventional secretion. *The Journal of biological chemistry* 287: 27659-27669.

- Stock, J., P. Sarkari, S. Kreibich, T. Brefort, M. Feldbrügge & K. Schipper, (2012) Applying unconventional secretion of the endochitinase Cts1 to export heterologous proteins in *Ustilago maydis*. *Journal of biotechnology* 161: 80-91.
- Straube, A., I. Weber & G. Steinberg, (2005) A novel mechanism of nuclear envelope breakdown in a fungus: nuclear migration strips off the envelope. *The EMBO journal* 24: 1674-1685.
- Tamalampudi, S., M. Talukder, S. Hama, T. Tanino, Y. Suzuki, A. Kondo & H. Fukuda, (2007) Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*. *Applied microbiology and biotechnology* 75: 387-395.
- Temmerman, K., A.D. Ebert, H.M. Müller, I. Sinning, I. Tews & W. Nickel, (2008) A direct role for phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in unconventional secretion of fibroblast growth factor 2. *Traffic* 9: 1204-1217.
- Terpe, K., (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied microbiology and biotechnology* 72: 211-222.
- Tigerstrom, R.G.v. & S. Stelmaschuk, (1989) The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Canadian journal of microbiology* 35: 511-514.
- Tokuoka, M., M. Tanaka, K. Ono, S. Takagi, T. Shintani & K. Gomi, (2008) Codon optimization increases steady-state mRNA levels in *Aspergillus oryzae* heterologous gene expression. *Applied and environmental microbiology* 74: 6538-6546.
- Torrado, L.C., K. Temmerman, H.M. Müller, M.P. Mayer, C. Seelenmeyer, R. Backhaus & W. Nickel, (2009) An intrinsic quality-control mechanism ensures unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 in a folded conformation. *Journal of cell science* 122: 3322-3329.
- Tournaviti, S., S. Hannemann, S. Terjung, T.M. Kitzing, C. Stegmayer, J. Ritzerfeld, P. Walther, R. Grosse, W. Nickel & O.T. Fackler, (2007) SH4-domain-induced plasma membrane dynamization promotes bleb-associated cell motility. *Journal of cell science* 120: 3820-3829.
- Tracy, W., C. Vargas, L. Zepeda, J. Pataky, M. Chandler, J. Janick & A. Whipkey, (2007) Production and marketing of huitlacoche. *Issues in new crops and new uses*: 233-236.
- Treitschke, S., G. Doehlemann, M. Schuster & G. Steinberg, (2010) The myosin motor domain of fungal chitin synthase V is dispensable for vesicle motility but required for virulence of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant cell* 22: 2476-2494.
- Tsukuda, T., S. Carleton, S. Fotheringham & W.K. Holloman, (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Molecular and cellular biology* 8: 3703-3709.
- Uppenberg, J., M.T. Hansen, S. Patkar & T.A. Jones, (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2: 293-308.
- Uppenberg, J., N. Ohrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen & T.A. Jones, (1995) Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. *Biochemistry* 34: 16838-16851.
- Urban, M., R. Kahmann & M. Bölker, (1996) Identification of the pheromone response element in *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics* : MGG 251: 31-37.
- Urlaub, G. & L.A. Chasin, (1980) Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 4216-4220.
- Valverde, M.E., P.F. Moghaddam, M.S. Zavala-Gallardo, J.K. Pataky, O. Paredes-Lopez & W.L. Pedersen, (1993) Yield and Quality of Huitlacoche on Sweet Corn Inoculated with *Ustilago maydis*. *HortScience* 28: 782-785.

- van den Hombergh, J.P., P.J. van de Vondervoort, L. Fraissinet-Tachet & J. Visser, (1997) *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in biotechnology* 15: 256-263.
- van Dijl, J.M. & M. Hecker, (2013) *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microbial cell factories* 12: 3.
- van Esse, H.P., M.D. Bolton, I. Stergiopoulos, P.J.G.M. de Wit & B.P.H.J. Thomma, (2007) The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1092-1101.
- van Zutphen, T., R.J. Baerends, K.A. Susanna, A. de Jong, O.P. Kuipers, M. Veenhuis & I.J. van der Klei, (2010) Adaptation of *Hansenula polymorpha* to methanol: a transcriptome analysis. *BMC genomics* 11: 1.
- Vervecken, W., V. Kaigorodov, N. Callewaert, S. Geysens, K. De Vusser & R. Contreras, (2004) In vivo synthesis of mammalian-like, hybrid-type N-glycans in *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology* 70: 2639-2646.
- Voigt, C.A., W. Schafer & S. Salomon, (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 42: 364-375.
- von Tigerstrom, R.G. & S. Stelmaschuk, (1989) The use of Tween 20 in a sensitive turbidimetric assay of lipolytic enzymes. *Canadian journal of microbiology* 35: 511-514.
- Wacker, M., D. Linton, P.G. Hitchen, M. Nita-Lazar, S.M. Haslam, S.J. North, M. Panico, H.R. Morris, A. Dell, B.W. Wren & M. Aebi, (2002) N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science* 298: 1790-1793.
- Wall, J.G. & A. Pluckthun, (1995) Effects of overexpressing folding modulators on the in vivo folding of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology* 6: 507-516.
- Walter, P. & G. Blobel, (1982) Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 299: 691-698.
- Walter, P., I. Ibrahimi & G. Blobel, (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *The Journal of cell biology* 91: 545-550.
- Wan, J., X.C. Zhang & G. Stacey, (2008) Chitin signaling and plant disease resistance. *Plant signaling & behavior* 3: 831-833.
- Wang, J., D.W. Holden & S.A. Leong, (1988) Gene transfer system for the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 865-869.
- Wang, J., D. Wang, B. Wang, Z.H. Mei, J. Liu & H.W. Yu, (2012) Enhanced activity of *Rhizomucor miehei* lipase by directed evolution with simultaneous evolution of the propeptide. *Applied microbiology and biotechnology* 96: 443-450.
- Ward, O.P., (2012) Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology advances* 30: 1119-1139.
- Wedlich-Söldner, R., M. Bölker, R. Kahmann & G. Steinberg, (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* 19: 1974-1986.
- Wedlich-Söldner, R., A. Straube, M.W. Friedrich & G. Steinberg, (2002) A balance of KIF1A-like kinesin and dynein organizes early endosomes in the fungus *Ustilago maydis*. *The EMBO journal* 21: 2946-2957.
- White, C.E., M.J. Hunter, D.P. Meininger, L.R. White & E.A. Komives, (1995) Large-scale expression, purification and characterization of small fragments of thrombomodulin: the roles of the sixth domain and of methionine 388. *Protein engineering* 8: 1177-1187.
- Wurm, F.M., (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature biotechnology* 22: 1393-1398.
- Yaffe, M.B. & A.E. Elia, (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Current opinion in cell biology* 13: 131-138.

- Yoo, J.S., B.D. Moyer, S. Bannykh, H.M. Yoo, J.R. Riordan & W.E. Balch, (2002) Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *The Journal of biological chemistry* 277: 11401-11409.
- Zahn-Zabal, M., M. Kobr, P.A. Girod, M. Imhof, P. Chatellard, M. de Jesus, F. Wurm & N. Mermod, (2001) Development of stable cell lines for production or regulated expression using matrix attachment regions. *Journal of biotechnology* 87: 29-42.
- Zarnack, K., S. Maurer, F. Kaffarnik, O. Ladendorf, A. Brachmann, J. Kämper & M. Feldbrügge, (2006) Tetracycline-regulated gene expression in the pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 43: 727-738.
- Zehe, C., A. Engling, S. Wegehingel, T. Schafer & W. Nickel, (2006) Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 15479-15484.
- Zhang, N., W.C. Suen, W. Windsor, L. Xiao, V. Madison & A. Zaks, (2003) Improving tolerance of *Candida antarctica* lipase B towards irreversible thermal inactivation through directed evolution. *Protein engineering* 16: 599-605.
- Zoufaly, S., J. Frobel, P. Rose, T. Flecken, C. Maurer, M. Moser & M. Müller, (2012) Mapping precursor-binding site on TatC subunit of twin arginine-specific protein translocase by site-specific photo cross-linking. *The Journal of biological chemistry* 287: 13430-13441.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Michael Feldbrügge für die Möglichkeit, in seinem hervorragend organisierten Institut die Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm insbesondere für die Betreuung in dem sehr interessanten Projekt und dafür, dass er viele Freiräume gelassen und mich jederzeit unterstützt hat.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Karl-Erich Jaeger für die bereitwillige Übernahme des Korreferats und der Betreuung meiner Arbeit im Hinblick auf das CLIB-Graduiertenschulprogramm.

Mein größter Dank gilt Kerstin Schipper, die unsere Forschungsgruppe „RAB Xpress“ hervorragend leitet. Sie war sowohl während der Arbeit im Labor als auch während des Schreibens meiner Dissertation die wichtigste Stütze für mich.

Ich danke allen Mitgliedern von „RAB Xpress“ für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, deren Unterstützung und den Spaß im Labor. Insbesondere danke ich Michael Knopp und Marius Terfrüchte, die diese Arbeit durch ihre Bachelorprojekte unterstützt haben.

Außerdem danke ich dem gesamten Institut für Mikrobiologie für die gute Atmosphäre, die schöne Zeit und die leckeren Brotzeiten.

Ich danke den Instituten für Molekulare Mykologie und Molekulare Enzymtechnologie für die gute Kollaboration im Uml2-Projekt.

Dem Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie der Universität Hamburg danke ich für die Bereitstellung der LipT-Sequenz.

Bei der CLIB-Graduiertenschule möchte ich mich für die Finanzierung bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner gesamten Familie und meiner Freundin Margret für die Unterstützung und das Verständnis bedanken.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Janpeter Stock
 Geburtstag: 30.12.1982
 Geburtsort: Hilden

Schulische und universitäre Ausbildung

08/1993 – 06/2003	Konrad-Adenauer-Gymnasium, Langenfeld Abschluss: Abitur
10/2004 – 01/2010	Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Fach: Biologie Abschluss: Diplom Titel der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur Phosphorylierung und Funktion von Adaptorprotein Ste50 während der Signalübertragung in Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .“ Angefertigt im Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von PD Dr. Ramezani-Rad.
04/2010 – bis heute	Promotionsstudium (Biologie) Titel der Dissertation: „Etablierung eines neuartigen Protein-Expressionssystems in <i>Ustilago maydis</i> .“ Angefertigt am Institut für Mikrobiologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Feldbrügge.

Stipendien und Mitarbeiter in Forschungsgruppen

03/2009 – 03/2010	Zeitweise studentische Hilfskraft Institut für Mikrobiologie, PD Dr. Ramezani-Rad Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01.04.2010 – 31.07.2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. Feldbrügge Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01.08.2010 – 31.07.2013	Stipendiat des CLIB-Graduiertenclusters Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
01.08.2013 – bis heute	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Mikrobiologie, Prof. Dr. Feldbrügge Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Düsseldorf, November 2013