

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. Dezember 2006 (07.12.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/128593 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2006/004758

(22) Internationales Anmeldedatum:
19. Mai 2006 (19.05.2006)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2005 025 191.9 1. Juni 2005 (01.06.2005) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **BAYER CROPSCIENCE AG** [DE/DE]; Alfred-No-
bel-Str. 50, 40789 Monheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SCHREIER, Peter**
[DE/DE]; Dasselstr. 16, 50674 Köln (DE). **LEUTHNER,**
Birgitta [DE/DE]; Hauptstr. 116, 40764 Langenfeld (DE).
LEICHER, Thorsten [DE/DE]; Rietherbach 42, 40764
Langenfeld (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER CROPSCIENCE**
AG; Business Planning And Administration, Law And
Patents, Patents And Licensing, Building 6100, Alfred-No-
bel-Str. 50, 40789 Monheim (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,
LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING FUNGICIDALLY ACTIVE COMPOUNDS THAT ARE BASED ON IPP
ISOMERASES

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM IDENTIFIZIEREN VON FUNGIZID WIRKSAMEN VERBINDUNGEN BASIEREND
AUF ISOPENTENYLPYROPHOSPHAT-ISOMERASEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for identifying fungicides, to the use of fungal IPP isomerase for identifying
fungicides, and to the use of inhibitors of the IPP isomerase as fungicides.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden, die Verwendung von
pilzlicher IPP-Isomerase zum Identifizieren von Fungiziden, und die Verwendung von Inhibitoren der IPP-Isomerase als Fungizide.



WO 2006/128593 A2

Verfahren zum Identifizieren von fungizid wirksamen Verbindungen basierend auf Isopentenylpyrophosphat-Isomerasen

Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden, die Verwendung von pilzlicher Isopentenylpyrophosphat-Isomerase zum Identifizieren von Fungiziden, und die
5 Verwendung von Inhibitoren der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase als Fungizide.

Unerwünschtes Pilzwachstum, das in der Landwirtschaft jedes Jahr zu beträchtlichen Schäden führt, kann durch die Verwendung von Fungiziden kontrolliert werden. Die Ansprüche an Fungizide sind dabei hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, Kosten und vor allem ihrer Umweltverträglichkeit stetig angestiegen. Es existiert deshalb ein Bedarf an neuen Substanzen bzw.
10 Substanzklassen, die zu leistungsfähigen und umweltverträglichen neuen Fungiziden entwickelt werden können. Im Allgemeinen ist es üblich, in Gewächshaustests nach solchen neuen Leitstrukturen zu suchen. Solche Tests sind jedoch arbeitsintensiv und teuer. Die Anzahl der Substanzen, die im Gewächshaus getestet werden können, ist entsprechend begrenzt. Eine Alternative zu solchen Tests ist die Verwendung von sogenannten Hochdurchsatzverfahren
15 (HTS = high throughput screening). Dabei werden in einem automatisierten Verfahren eine große Anzahl von Einzelsubstanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf Zellen, individuelle Genprodukte oder Gene getestet. Wird für bestimmte Substanzen eine Wirkung nachgewiesen, so können diese in herkömmlichen Screeningverfahren untersucht und gegebenenfalls weiter entwickelt werden.

Vorteilhafte Angriffspunkte für Fungizide werden oft in essentiellen Biosynthesewegen gesucht.
20 Ideale Fungizide sind weiterhin solche Stoffe, die Genprodukte hemmen, die eine entscheidende Bedeutung bei der Ausprägung der Pathogenität eines Pilzes haben.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, einen geeigneten neuen Angriffspunkt für potentielle fungizide Wirkstoffe zu identifizieren und zugänglich zu machen, und ein Verfahren zur Verfügung zu stellen, das die Identifizierung von Modulatoren dieses Angriffspunkts ermög-
25 licht, die dann als Fungizide verwendet werden können.

Die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase (EC 5.3.3.2), auch bekannt als Isopentenylpyrophosphat- Δ -Isomerase, Isopentenyl-Diphosphat- Δ -Isomerase, oder Methylbutenylpyrophosphat-Isomerase, katalysiert die Isomerisierung der Kohlenstoff-Doppelbindung von Isopentenylpyrophosphat (IPP), wobei Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (Abbildung 1) entsteht.

30 Die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase - im Folgenden auch als IPP-Isomerase oder IPPI abgekürzt - katalysiert damit einen essentiellen Schritt der Isoprenoid-Biosynthese mit mehr als 23000 bekannten Metaboliten. Der Syntheseweg ist in allen Organismen beschrieben und stellt

dabei unterschiedliche Stoffklassen zur Verfügung. Dazu gehören die Sterole, die Carotinoide, die Dolichole, die Ubichinone und prenylierte Proteine. Die IPP-Isomerase katalysiert den kritischen Aktivierungsschritt im Syntheseweg, der Isopentenylpyrophosphat (IPP) in das stark elektrophile Isomer Dimethyl-allyl-diphosphat (DMAPP) umwandelt. IPP und DMAPP sind Substrate für -
5 Prenyltransferasen, die Polyisoprenoid Ketten synthetisieren.

In *S.cerevisiae* (einem Ascomyceten) konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Gen IDI1 essentiell ist und im Genom nur einmal vorkommt. (Mayer et al. 1992).

Der Isoprenoid Stoffwechselweg kommt in allen Organismen vor und erzeugt eine Vielzahl von kleinen, meist lipophilen Stoffen, die eine Reihe wichtiger Funktionen erfüllen. Eine hervor-
10 ragende Rolle spielen dabei die Sterole, Bestandteile eukariotischer Membranen und Hormone, die Carotene, Photorezeptoren beim Sehen und bei der Photosynthese, Coenzyme bei der Atmung, die Häutungshormone bei Insekten, sowie die Cytokinine, Hormone bei Pflanzen. Isoprenoide werden in zwei verschiedenen Phasen synthetisiert. Die erste Phase der Synthese ist der schrittweise Aufbau von Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A aus drei Molekülen Acetyl-CoA. Dies wird durch
15 HMG-CoA Reduktase zu Mevalonat reduziert und wird in einer Reihe weiterer Reaktionen zu Squalen kondensiert. An zentraler Stelle dieser ersten Phase steht die IPP-Isomerase, die sowohl das Isopentenyl-phyrophosphat als auch das Dimethylallyl-phyrophosphat zur Verfügung stellt (Wouters et al., 2003). Diese beiden Verbindungen werden weiter in einer Kopf zu Schwanz Reaktion zu Geranyl-diphosphat kondensiert. Dies kann dann im Stoffwechsel je nach Organismus
20 zu unterschiedlichen Produkten weiter verarbeitet werden. Für Pilze ist dabei die Synthese von Sterolen von essentieller Bedeutung.

Die IPP-Isomerase ist bereits aus einer Reihe von Pilzen bekannt (siehe dazu auch Abbildung 2). Dazu gehören z.B. *S. cerevisiae*, *S. pombe* etc.

IPP-Isomerasen sind durch spezifische Motive auf Aminosäureebene gekennzeichnet und können
25 unter anderem anhand dieser Motive identifiziert werden. So konnte durch gezielte Mutagenese in Hefe gezeigt werden, dass zwei Aminosäuren eine essentielle Bedeutung haben. Es handelt sich um die Aminosäuren Cys und Gln in den Positionen 139 und 207 (*S. cerevisiae*, siehe auch Abb. 2), eingebettet in die Sequenzen CCSH bzw. HEIDY (Street et al. 1994, Wouters et al, 2003).

Gene für die IPP-Isomerase wurden aus verschiedenen Organismen kloniert, darunter auch aus
30 verschiedenen Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Swissprot Accession No.: P15496), *Schizosaccharomyces pombe* (Swissprot Accession No.: Q10132), und *Phaffia rhodozyma* (Swissprot Accession No.: O42641). Die Sequenzähnlichkeiten sind innerhalb der eukaryontischen Klassen signifikant.

Weiterhin war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung neue Angriffspunkte von Fungiziden in Pilzen, insbesondere in phytopathogenen Pilzen, zu identifizieren und ein Verfahren zugänglich zu machen, in denen Inhibitoren eines solchen Angriffspunktes bzw. Polypeptids identifiziert und auf ihre fungiziden Eigenschaften hin geprüft werden können. Aufgabe der vorliegenden Erfindung
5 war es daher zu prüfen, ob die IPP-Isomerase des pflanzenpathogenen Basidiomyceten *U.maydis* ebenfalls ein essentielles Gen ist und deren Entfernung zu nicht lebensfähigen Sporen führt, und die IPP-Isomerase aus pflanzenpathogenen Pilzen als ein Target für Fungizide grundsätzlich geeignet ist.

Die Aufgabe wurde gelöst, indem aus einem phytopathogenen Pilz, *U. maydis*, die für IPP-
10 Isomerase kodierende Nukleinsäure (*ipil*) isoliert, das davon kodierte Polypeptid (IPI1) gewonnen und ein Verfahren zur Verfügung gestellt wurde, mit dem Inhibitoren dieses Enzyms bestimmt werden können. Die mit diesem Verfahren identifizierten Inhibitoren können tatsächlich *in vivo* gegen Pilze eingesetzt werden.

Beschreibung der Abbildungen

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der von der IPP-Isomerase katalysierten Isomerisierung des Isopentenylpyrophosphats zu Dimethylallylpyrophosphat.
- Abbildung 2:** Vergleich der bekannten IPP-Isomerase Proteine aus Pilzen und phytopathogenen Pilzen (UM = *U. maydis*; PC = *P. chrysosporium*; IDI1 = *S. cerevisiae*; ADL = *A. gossypii*; Idi1 = *S. pombe*; MG = *M. grisea*; CA = *C. albicans*; AN = *A. nidulans*; FG = *F. graminis*; NC = *N. crassa*; PHYSO = *P. soya*; PHYTRA = *P. ramorum*). Bereiche mit Identität bzw. hoher Homologie sind grau unterlegt
- Abbildung 3:** 12% Bis-Tris-SDS Gel zur Darstellung der heterologen Expression von *U.maydis* IPP-Isomerase in *E.coli*.
- 1+18 = Marker; 2-13 = Eluierte Fraktionen mit 250mM Imidazol; 14-17 = Eluierte Fraktionen mit 1M Imidazol; 19 = Cytoplasmafraktion; 20 = Membranfraktion; 21 = Durchfluss; 22+23 = 1. und 2. Waschfraktion; 24 = Gepoolte Fraktionen Nr. 6,7,8,9
- Abbildung 4:** Sporenanalyse der ipi-knock-out Stämme. Kandidaten-Sporen wurden auf Medium (PD-Medium) ohne (1A-4A, PD/Hyg-Medium) und mit Selektion 1B-4B ausgestrichen. Ist das ausgeschaltete Gen essentiell, dürfen auf PD/Hyg Medium keine Sporen wachsen, wenn alle Sporen haploid sind. Immer wieder kommt es vor, dass diploide Sporen als Kandidaten ausgesucht werden. Deshalb wurden in allen Fällen bei denen Sporen auf PD/Hyg-Medium wuchsen, diese mit Hilfe einer PCR-Analyse untersucht. Es wurde gezeigt, dass diese Sporen diploid waren, also noch eine Kopie des ipi-Wildtyp-Gens enthielten.
- SEQ ID NO:1** Nukleinsäuresequenz kodierend für die Isopentenylpyrophosphat-Isomerase aus *Ustilago maydis*.
- SEQ ID NO: 2** Aminosäuresequenz der Isopentenylpyrophosphat-Isomerase aus *Ustilago maydis*.

Definitionen

Unter dem Begriff "Homologie" bzw. "Identität" soll die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren (Identität) mit anderen Proteinen, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche einer gegebenen Sequenz zu anderen Proteinen mit Hilfe von

5 Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Die Identität kann standardmäßig mittels bekannten und der Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogrammen wie z.B. ClustalW (Thompson et al., *Nucleic Acids*

10 *Research* 22 (1994), 4673-4680) ermittelt werden. ClustalW wird z.B. öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch

15 Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) und beim EBI (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden. Wenn das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt wird, um die Identität zwischen z.B. einem gegebenen Referenzprotein und anderen Proteinen zu bestimmen, sind folgende Parameter

20 einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP. Eine Möglichkeit zum Auffinden von ähnlichen Sequenzen ist die Durchführung von Sequenzdatenbankrecherchen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als sogenannte Abfrage ("query") vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels

25 statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen ("blast searches") sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden. Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die

30 jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind, benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche ("blastp") sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1. Als Ergebnis einer solchen Abfrage werden neben anderen Parametern auch der Anteil an Identität zwischen der Abfragesequenz und den in den Datenbanken

35 aufgefundenen ähnlichen Sequenzen dargestellt. Unter einem erfindungsgemäßen Protein sollen daher im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung solche Proteine verstanden werden, die

bei der Verwendung mindestens einer der vorstehend beschriebenen Methoden zur Identitätsbestimmung eine Identität von mindestens 70 % aufweisen, bevorzugt von mindestens 75 %, besonders bevorzugt von mindestens 80 %, weiter bevorzugt von mindestens 85 %, und insbesondere von mindestens 90 %.

- 5 Der Ausdruck "vollständige IPP-Isomerase" wie er hierin verwendet wird, beschreibt eine IPP-Isomerase, die von einer vollständigen kodierenden Region einer Transkriptionseinheit kodiert wird, umfassend ein ATG-Startcodon und umfassend alle informationstragenden Exonbereiche des im Herkunftsorganismus vorliegenden, für eine IPP-Isomerase kodierenden Gens, sowie die für eine korrekte Termination der Transkription nötigen Signale.
- 10 Der Ausdruck "biologische Aktivität einer IPP-Isomerase" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die Fähigkeit eines Polypeptids, die vorstehend beschriebene Reaktion, d.h. die Isomerisierung der Kohlenstoff-Doppelbindung von Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat zu katalysieren.
- Der Ausdruck "aktives Fragment" wie er hierin verwendet wird, beschreibt nicht mehr vollständige
- 15 Nukleinsäuren kodierend für IPP-Isomerase, die aber noch für Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer IPP-Isomerase kodieren, und die eine für die IPP-Isomerase charakteristische Reaktion wie vorne beschrieben katalysieren können. Solche Fragmente sind kürzer als die oben beschriebenen vollständigen, für die IPP-Isomerase kodierenden Nukleinsäuren. Dabei können sowohl an den 3'- und/oder 5'-Enden der Sequenz Nukleinsäuren entfernt worden sein, es können
- 20 aber auch Teile der Sequenz deletiert, d.h. entfernt worden sein, die die biologische Aktivität der IPP-Isomerase nicht entscheidend beeinträchtigen. Eine geringere oder gegebenenfalls auch eine erhöhte Aktivität, die aber noch die Charakterisierung bzw. Verwendung des resultierenden IPP-Isomerase Fragments gestattet, wird dabei als ausreichend im Sinne des hier verwendeten Ausdrucks verstanden. Der Ausdruck "aktives Fragment" kann sich ebenso auf die Aminosäuresequenz
- 25 der IPP-Isomerase beziehen und gilt dann analog den obigen Ausführungen für solche Polypeptide, die im Vergleich zur oben definierten vollständigen Sequenz bestimmte Teile nicht mehr enthalten, wobei die biologische Aktivität des Enzyms jedoch nicht entscheidend beeinträchtigt ist. Die Fragmente können dabei verschiedene Längen besitzen.
- Die Begriffe "IPP-Isomerase-Hemmtest" oder "Hemmtest " wie sie hierin verwendet werden,
- 30 beziehen sich auf ein Verfahren bzw. einen Test, der es gestattet, die Inhibition der enzymatischen Aktivität eines Polypeptids mit der Aktivität einer IPP-Isomerase durch eine oder mehrere chemische Verbindungen (Kandidatenverbindung(en)) zu erkennen, wodurch die chemische Verbindung als Inhibitor der IPP-Isomerase identifiziert werden kann.

Der Ausdruck "Gen", wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für einen Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, der für die Synthese einer Polypeptid-Kette verantwortlich ist.

Der Ausdruck "Fungizid" bzw. "fungizid" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf chemische Verbindungen, die zur Bekämpfung von human-, tier- und pflanzenpathogenen Pilzen, insbesondere von pflanzenpathogenen Pilzen geeignet sind. Solche pflanzenpathogene Pilze werden nachfolgenden genannt, wobei die Aufzählung nicht abschließend ist:

Plasmodiophoromycetes, Oomycetes, Chytridiomycetes, Zygomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes und Deuteromycetes, z.B.

Pythium-Arten, wie beispielsweise *Pythium ultimum*, Phytophthora-Arten, wie beispielsweise *Phytophthora infestans*, Pseudoperonospora-Arten, wie beispielsweise *Pseudoperonospora humuli* oder *Pseudoperonospora cubensis*, Plasmopara-Arten, wie beispielsweise *Plasmopara viticola*, Bremia-Arten, wie beispielsweise *Bremia lactucae*, Peronospora-Arten, wie beispielsweise *Peronospora pisi* oder *P. brassicae*, Erysiphe-Arten, wie beispielsweise *Erysiphe graminis*, Sphaerotheca-Arten, wie beispielsweise *Sphaerotheca fuliginea*, Podosphaera-Arten, wie beispielsweise *Podosphaera leucotricha*, Venturia-Arten, wie beispielsweise *Venturia inaequalis*, Pyrenophora-Arten, wie beispielsweise *Pyrenophora teres* oder *P. graminea* (Konidienform: Drechslera, Syn: Helminthosporium), Cochliobolus-Arten, wie beispielsweise *Cochliobolus sativus* (Konidienform: Drechslera, Syn: Helminthosporium), Uromyces-Arten, wie beispielsweise *Uromyces appendiculatus*, Puccinia-Arten, wie beispielsweise *Puccinia recondita*, Sclerotinia-Arten, wie beispielsweise *Sclerotinia sclerotiorum*, Tilletia-Arten, wie beispielsweise *Tilletia caries*, Ustilago-Arten, wie beispielsweise *Ustilago nuda* oder *Ustilago avenae*, Pellicularia-Arten, wie beispielsweise *Pellicularia sasakii*, Pyricularia-Arten, wie beispielsweise *Pyricularia oryzae*, Fusarium-Arten, wie beispielsweise *Fusarium culmorum*, Botrytis-Arten, Septoria-Arten, wie beispielsweise *Septoria nodorum*, Leptosphaeria-Arten, wie beispielsweise *Leptosphaeria nodorum*, Cercospora-Arten, wie beispielsweise *Cercospora canescens*, Alternaria-Arten, wie beispielsweise *Alternaria brassicae* oder *Pseudocercospora*-Arten, wie beispielsweise *Pseudocercospora herpotrichoides*.

Von besonderem Interesse sind z.B. auch *Magnaporthe grisea*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Nectria hematococcus* and *Phytophthora* species.

Fungizide Wirkstoffe, die mit Hilfe der erfindungsgemäßen IPP-Isomerasen aus pflanzenpathogenen Pilzen gefunden werden, können aber auch mit IPP-Isomerase aus humanpathogenen Pilzspezies interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in diesen Pilzen vorkommenden IPP-Isomerasen nicht immer gleich stark sein muss.

Gegenstand der vorliegenden Erfindungen ist deshalb auch die Verwendung von Inhibitoren der IPP-Isomerase zum Herstellen von Mitteln zur Behandlung von durch humanpathogene Pilze hervorgerufenen Erkrankungen.

5 Dabei sind die folgenden humanpathogenen Pilze von besonderem Interesse, die die nachfolgend genannten Krankheitsbilder hervorrufen können:

Dermatophyten, wie z.B. *Trichophyton spec.*, *Microsporum spec.*, *Epidermophyton floccosum* oder *Keratomyces ajelloi*, die z.B. Fußmykosen (*Tinea pedis*) hervorrufen,

10 Hefen, wie z.B. *Candida albicans*, die Soor-Ösophagitis und Dermatitis hervorruft, *Candida glabrata*, *Candida krusei* oder *Cryptococcus neoformans*, die z.B. pulmonale Cryptococcose und auch Torulose hervorrufen können,

Schimmelpilze, wie z.B. *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, die z.B. bronchopulmonale Aspergillose oder Pilzsepsis hervorrufen, *Mucor spec.*, *Absidia spec.*, oder *Rhizopus spec.*, die z.B. Zygomycosen (intravasale Mykosen) hervorrufen, *Rhinosporidium seeberi*, der z.B. chronische granulomatöse Pharyngitis und Tracheitis hervorruft, *Madurella mycetomatis*, der z.B. subkutane Mycetome hervorruft, *Histoplasma capsulatum*, der z.B. retikuloendotheliale Zytomykose und M. Darling hervorruft, *Coccidioides immitis*, der z. B. pulmonale Coccidioidomykose und Sepsis hervorruft, *Paracoccidioides brasiliensis*, der z.B. brasilianische Blastomykose hervorruft, *Blastomyces dermatitidis*, der z.B. Gilchrist-Krankheit und nordamerikanische Blastomykose hervorruft, *Loboa lobo*, der z.B. Keloid-Blastomykose und Lobo's Krankheit hervorruft, und
20 *Sporothrix schenckii*, der z.B. Sporotrichose (granulomatöse Hautmykose) hervorruft.

Fungizide Wirkstoffe, die mit Hilfe einer aus einem bestimmten Pilz, hier aus *Ustilago maydis*, gewonnenen IPP-Isomerase gefunden werden, können also auch mit IPP-Isomerase aus anderen zahlreichen Pilzspezies, gerade auch mit pflanzenpathogenen Pilzen interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in diesen Pilzen vorkommenden IPP-Isomerase nicht immer
25 gleich stark sein muss. Dies erklärt unter anderem die beobachtete Selektivität der an diesem Enzym wirksamen Substanzen.

Der Ausdruck "homologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert. Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor,
30 der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

Der Ausdruck "Kompetitor" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die Eigenschaft der Verbindungen, mit anderen, gegebenenfalls zu identifizierenden Verbindungen um die Bindung an der IPP-Isomerase zu kompetitieren und diese vom Enzym zu verdrängen bzw. von dieser verdrängt zu werden.

- 5 Der Ausdruck "Inhibitor" bzw. "spezifischer Inhibitor", wie er hierin gebraucht wird, bezeichnet eine Substanz, die direkt eine enzymatische Aktivität der IPP-Isomerase inhibiert. Ein solcher Inhibitor ist vorzugsweise "spezifisch", d.h. er inhibiert gezielt die IPP-Isomerase-Aktivität bei einer Konzentration die niedriger ist als die Konzentration eines Inhibitors, die benötigt wird, um einen anderen, damit nicht verbundenen Effekt hervorzurufen. Vorzugsweise ist die Konzentration
- 10 zweifach niedriger, insbesondere bevorzugt fünffach niedriger und ganz besonders bevorzugt zumindest zehnfach oder 20fach niedriger als die Konzentration einer Verbindung, die zum Hervorrufen eines unspezifischen Effekts benötigt wird.

- Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt einen Oberbegriff für Inhibitoren und Aktivatoren dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder
- 15 Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden bzw. die deren Aktivität beeinflussen. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und dadurch deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder strukturelle oder funktionelle Mimetika davon.
- 20 Bevorzugt handelt es sich beim Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, jedoch um solche Moleküle, die nicht die natürlichen Substrate bzw. Liganden darstellen.

Beschreibung der Erfindung

In der vorliegenden Erfindung wird zum ersten Mal die vollständige Sequenz einer IPP-Isomerase aus dem pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* zur Verfügung gestellt, die die weitere Erforschung von IPP-Isomerasen insbesondere aus pflanzenpathogenen Pilzen und damit die Erschließung eines neuen Zielproteins für die Identifizierung neuer fungizider Wirkstoffe ermöglicht.

Die Forschung an der IPP-Isomerase beschränkte sich bislang in erster Linie auf deren pharmakologische Bedeutung (Cheng und Oldfield, 2004; Thompsom et al, 2002; Rohdich et al. 2004). Dabei sind durchaus auch Inhibitoren dieses Enzyms bearbeitet worden, die eine pharmazeutische Anwendung finden sollen. Inhibitoren der IPP-Isomerase wie natürliche Inhibitoren oder Analoga des Übergangszustandes des Substrats der IPP-Isomerase sind beschrieben worden (Wouters et al., 2003).

Trotz der umfangreichen Forschung an der IPP-Isomerase war bislang dennoch unbekannt, dass die IPP-Isomerase in Pilzen ein Zielprotein (ein so genanntes "Target") fungizid wirksamer Substanzen sein kann. Damit wird in der vorliegenden Erfindung zum ersten Mal gezeigt, dass die IPP-Isomerase ein insbesondere für Pilze wichtiges Enzym darstellt und deshalb in besonderem Maße dazu geeignet ist, als Zielprotein für die Suche nach weiteren und verbesserten fungizid wirksamen Wirkstoffen verwendet zu werden.

Inhibitoren der IPP-Isomerase mit einer fungiziden Wirkung wurden bisher nicht beschrieben. Es ist zwar bekannt, dass das Enzym in *S. cerevisiae* essentiell ist (Mayer et al. 1992). Allerdings nimmt keine der Veröffentlichungen Stellung zu der Frage, ob das pilzliche Enzym IPP-Isomerase, insbesondere in pflanzenpathogenen Pilzen, durch Wirkstoffe beeinflusst, z.B. inhibiert werden kann, und ob die Bekämpfung von Pilzen, insbesondere von pflanzenpathogenen Pilzen, *in vivo* mit einem die IPP-Isomerase modulierenden Wirkstoff möglich ist. Die IPP-Isomerase wurde damit als Zielprotein für Fungizide bislang noch nicht beschrieben. Es sind keine Wirkstoffe bekannt, die eine fungizide Wirkung aufweisen und deren Wirkort die IPP-Isomerase ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte nun gezeigt werden, dass die IPP-Isomerase bei pflanzenpathogenen Pilzen ein Angriffspunkt oder "Target" für fungizide Wirkstoffe sein kann, die Inhibition der IPP-Isomerase also zur Schädigung oder zum Absterben des Pilzes führen könnte. So wurde im pflanzenpathogenen Pilz *Ustilago maydis* ein für eine IPP-Isomerase kodierendes Gen gemäß SEQ ID NO:1 identifiziert (*ipil1*). Der Knock-out dieses Gens erwies sich als letal. Es konnten keine lebensfähigen Knock-out Sporen von *U. maydis* erhalten werden. In weiteren Versuchen, die auf die Zugänglichkeit der IPP-Isomerase für Wirkstoffe *in vitro* und auch *in vivo* gerichtet waren, konnte das Enzym IPP-Isomerase weiter als ein Polypeptid bestimmt werden, das

zum Identifizieren von Modulatoren bzw. Inhibitoren seiner enzymatischen Aktivität in geeigneten Testverfahren verwendet werden kann, was bei verschiedenen theoretisch interessanten Targets nicht selbstverständlich gegeben ist.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, das geeignet ist, 5 die Aktivität der IPP-Isomerase sowie die Hemmung dieser Aktivität in einem so genannten Hemmtest zu bestimmen, auf diese Weise Inhibitoren des Enzyms z.B. in HTS- und UHTS-Verfahren zu identifizieren und deren fungizide Eigenschaften zu prüfen. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde auch gezeigt, dass die Inhibitoren der IPP-Isomerase aus Pilzen als Fungizide verwendet werden können.

10 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde weiter gefunden, dass die IPP-Isomerase auch *in vivo* durch Wirkstoffe inhibiert werden kann und ein mit diesen Wirkstoffen behandelter pilzlicher Organismus durch die Behandlung mit diesen Wirkstoffen geschädigt und abgetötet werden kann. Die Inhibitoren einer pilzlichen IPP-Isomerase können also als Fungizide im Pflanzenschutz oder als Antimykotika in Pharmaindikationen verwendet werden. In der vorliegenden Erfindung wird 15 beispielsweise gezeigt, dass die Hemmung der IPP-Isomerase mit einer in einem erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Substanzen zum Absterben der behandelten Pilze in synthetischen Medien bzw. auf der Pflanze führt.

Die IPP-Isomerase kann aus verschiedenen pflanzenpathogenen oder auch aus human- oder tierpathogenen Pilzen gewonnen werden, z.B. aus Pilzen wie dem pflanzenpathogenen Pilz *U. maydis*. 20 Zur Herstellung der IPP-Isomerase aus Pilzen kann das Gen z.B. rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert und aus *E. coli* Zellen eine Enzympräparation hergestellt werden (Beispiel 1). Bevorzugt werden IPP-Isomerasen aus pflanzenpathogenen Pilzen verwendet, um im Pflanzenschutz einsetzbare Fungizide zu identifizieren. Ist das Ziel die Identifizierung von Fungiziden bzw. Antimykotika, die in Pharmaindikationen verwendet werden sollen, empfiehlt 25 sich der Einsatz von IPP-Isomerasen aus human- bzw. tierpathogenen Pilzen.

So wurde für die Expression des von *ipil* kodierten Polypeptids IPI1 aus *U. maydis* der zugehörige ORF mittels PCR nach dem Fachmann bekannten Methoden über ausgewählte Primer amplifiziert. Die entsprechende DNA wurde in den Expressionsvektor pET21b kloniert, so dass das IPI1-Protein mit einem His₆-Tag exprimiert wird. Zur Expression der IPI1 wurde das Plasmid in *E. coli* 30 BL21(DE3) transformiert und das Polypeptid gemäß Beispiel 1 gewonnen.

In der vorliegenden Erfindung wird damit auch eine vollständige genomische Sequenz eines pflanzenpathogenen Pilzes kodierend für eine IPP-Isomerase zur Verfügung gestellt, und deren

Verwendung bzw. die Verwendung des davon kodierten Polypeptids zur Identifizierung von Inhibitoren des Enzyms beschrieben.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch die für ein Polypeptid mit der enzymatischen Funktion einer IPP-Isomerase kodierende Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO:1 aus dem Pilz *Ustilago maydis*.

Aufgrund der Homologien (siehe auch Abb. 2), die bei speziesspezifischen Nukleinsäuren kodierend für IPP-Isomerasen vorliegen, können auch IPP-Isomerasen aus anderen pflanzenpathogenen Pilzen identifiziert und verwendet werden, um die oben gestellte Aufgabe zu lösen, d.h. sie können ebenfalls zum Identifizieren von Inhibitoren einer IPP-Isomerase verwendet werden, welche wiederum als Fungizide im Pflanzenschutz verwendet werden können. Es ist jedoch auch denkbar einen anderen Pilz, der nicht pflanzenpathogen ist, bzw. dessen IPP-Isomerase oder die dafür kodierende Sequenz zu verwenden, um fungizid wirkende Inhibitoren der IPP-Isomerase zu identifizieren. Aufgrund der hier angegebenen Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 und eventuell davon abgeleiteten Primern sowie gegebenenfalls unter Zuhilfenahme der in Abbildung 2 dargestellten Konsensussequenzabschnitte, insbesondere der vorstehend genannten (Aminosäure-)Sequenzabschnitte „CCSH“ und „HEIDY“, ist es dem Fachmann möglich, z.B. mittels PCR weitere für IPP-Isomerasen kodierende Nukleinsäuren aus anderen (pflanzenpathogenen) Pilzen zu erhalten und zu identifizieren oder vorliegende Nukleinsäure- bzw. Aminosäuresequenzen zuzuordnen. Solche Nukleinsäuren und deren Verwendung in Verfahren zum Identifizieren von fungiziden Wirkstoffen werden als von der vorliegenden Erfindung umfasst betrachtet.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz sowie gemäß den vorstehend beschriebenen Verfahren erhaltene Sequenzen aus anderen pflanzenpathogenen Pilzen können weitere für eine IPP-Isomerase kodierende Nukleinsäuresequenzen aus anderen Pilzen identifiziert werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind daher Nukleinsäuren aus pflanzenpathogenen Pilzen, die für ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer IPP-Isomerase kodieren, insbesondere Polypeptide, die das vorstehend beschriebene Motiv umfassen.

Bevorzugt sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren aus den vorstehend unter Defintionen genannten pflanzenpathogenen Pilzspezies, die für ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer IPP-Isomerase kodieren.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere bevorzugt die für die IPP-Isomerase aus *Ustilago maydis* kodierende Nukleinsäure mit der SEQ ID NO:1 sowie die für die Polypeptide gemäß SEQ ID NO:2 oder aktive Fragmente davon kodierenden Nukleinsäuren.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, und cDNAs.

Besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Sequenz aus pflanzenpathogenen Pilzen kodierend für ein Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer IPP-Isomerase ausgewählt aus

- 10 a) einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
- b) Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,
- c) Sequenzen, welche an die unter a) und b) definierten Sequenzen bei einer Hybridisierungstemperatur von 42-65°C hybridisieren,
- 15 d) Sequenzen, welche eine zumindest 80 %ige, bevorzugt zumindest 85 %ige und besonders bevorzugt eine zumindest 90 %ige Identität mit den unter a) und b) definierten Sequenzen aufweisen, und
- e) Sequenzen, welche zu den unter a) bis d) definierten Sequenzen komplementär sind.

Wie bereits vorstehend ausgeführt, ist die vorliegende Erfindung nicht nur auf die IPP-Isomerase aus *Ustilago maydis* beschränkt. In analoger und dem Fachmann bekannter Weise können auch aus anderen Pilzen, vorzugsweise aus pflanzenpathogenen Pilzen, Polypeptide mit der Aktivität einer IPP-Isomerase gewonnen werden, die dann z.B. in einem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können. Bevorzugt wird die IPP-Isomerase aus *Ustilago maydis* verwendet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin DNA-Konstrukte, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure und einen homologen oder heterologen Promotor umfassen.

Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der 35S Promoter des Blumenkohlmosaikvirus für pflanzliche Zellen, der Promoter der Alkoholdehydrogenase für Hefezellen, die T3-, T7- oder SP6-Promotoren für prokaryotische Zellen oder zellfreie Systeme.

Bevorzugt sollten pilzliche Expressionssysteme wie z.B. das *Pichia pastoris*-System verwendet werden, wobei hier die Transkription durch den Methanol induzierbaren AOX-Promotor angetrieben wird.

5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ferner Vektoren, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, eine erfindungsgemäße regulatorische Region oder ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

Bevorzugte Vektoren sind z.B. die p4XXprom. Vektorserie (Mumberg et al., 1995) für Hefezellen, 10 pSPORT-Vektoren (Fa. Life Technologies) für bakterielle Zellen, oder den Gateway Vektoren (Fa. Life Technologies) für verschiedene Expressionssysteme in bakteriellen Zellen, Pflanzen, *P. pastoris*, *S. cerevisiae* oder Insektenzellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Wirtszellen, die eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäßen Vektor 15 enthalten.

Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht enthalten.

Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, vorzugsweise *E. coli*, als auch eukaryotische Zellen, wie Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, Insekten, 20 Pflanzen, Froschoozyten und Zelllinien von Säugern.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Polypeptide mit der biologischen Aktivität einer IPP-Isomerase, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden.

Bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Polypeptide eine Aminosäuresequenz aus pflanzenpathogenen Pilzen ausgewählt aus

- 25 (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO:2,
- (b) Sequenzen, welche eine zumindest 80 %ige, bevorzugt eine zumindest 85 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige und insbesondere bevorzugt eine 95 %ige Identität mit der unter a) definierten Sequenz haben,
- (c) Fragmenten der unter a) oder b) angegebenen Sequenzen, welche die gleiche biologische 30 Aktivität aufweisen wie die unter a) definierte Sequenz.

Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise am Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen. Die erfindungsgemäßen Proteine können ebenfalls so vorliegen, wie sie natürlicherweise in ihrem Herkunftsorganismus vorliegen, aus dem sie zum Beispiel direkt gewonnen werden können. In den erfindungsgemäßen Verfahren können ebenso aktive Fragmente einer IPP-Isomerase eingesetzt werden, solange sie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Polypeptids bzw. deren Inhibition durch eine Kandidatenverbindung ermöglichen.

Die in den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzten Polypeptide können im Vergleich zu den entsprechenden Regionen von natürlich vorkommender IPP-Isomerasen Deletionen oder Aminosäuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch die biologische Aktivität einer vollständigen IPP-Isomerase zeigen. Konservative Substitutionen sind bevorzugt. Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;

4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

Ein mögliches Reinigungsverfahren der IPP-Isomerase basiert auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie oder Affinitätschromatographie (vgl. Beispiel 2).

- Ein schnelles Verfahren zum Isolieren von IPP-Isomerase, die von Wirtszellen synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise ein MBP-Tag sein.
- 10 Das Fusionsprotein kann dann an Amylose-Resin gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-
 - 15 Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren wiederum auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen); Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

- 20 Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.
- 25 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

Das Verfahren zum Herstellen von Polypeptiden mit der Aktivität einer IPP-Isomerase, wie z.B. des Polypeptids IPI1 aus *U. maydis*, ist damit gekennzeichnet durch

- (a) das Kultivieren einer Wirtszelle enthaltend zumindest eine exprimierbare
- 30 Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid aus Pilzen mit der biologischen

Aktivität einer IPP-Isomerase unter Bedingungen, die die Expression dieser Nukleinsäure gewährleisten, oder

- (b) das Exprimieren einer exprimierbaren Nukleinsäuresequenz kodierend für ein Polypeptid aus Pilzen mit der biologischen Aktivität einer IPP-Isomerase in einem *in vitro*-System, und
- (c) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle, dem Kulturmedium oder dem *in vitro*-System.

Die so erhaltenen Zellen enthaltend das erfindungsgemäße Polypeptid oder das so erhaltene gereinigte Polypeptid sind geeignet, in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren bzw. Inhibitoren der IPP-Isomerase verwendet zu werden.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung von Polypeptiden aus Pilzen, bevorzugt aus pflanzenpathogenen Pilzen, welche zumindest eine biologische Aktivität einer IPP-Isomerase ausüben, in Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden, wobei die Inhibitoren der IPP-Isomerase als Fungizide verwendet werden können. Besonders bevorzugt wird die IPP-Isomerase aus *Ustilago maydis* verwendet.

Fungizide Wirkstoffe, die mit Hilfe einer IPP-Isomerase aus einer bestimmten Pilzspezies und auf Basis eines erfindungsgemäßen Verfahrens gefunden werden, können auch mit IPP-Isomerase aus anderen Pilzspezies interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in diesen Pilzen vorkommenden IPP-Isomerase nicht immer gleich stark sein muss. Dies erklärt unter anderem die Selektivität wirksamer Substanzen. Die Nutzung der Wirkstoffe, die mit einer spezifischen IPP-Isomerase gefunden wurden, als Fungizid auch bei anderen Pilzen kann darauf zurückgeführt werden, dass sich IPP-Isomerasen aus verschiedenen Pilzspezies nahe stehen und in größeren Bereichen eine klare Homologie zeigen. So wird an Abbildung 2 deutlich, dass eine solche Homologie über beträchtliche Sequenzabschnitte hinweg zwischen *S. cerevisiae*, *S. pombe*, und *U. maydis* besteht und damit die Wirkung der z.B. mit Hilfe der IPP-Isomerase aus *U. maydis* gefundenen Substanzen nicht auf *U. maydis* beschränkt bleibt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb auch ein Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden durch Testen von potentiellen Inhibitoren bzw. Modulatoren der enzymatischen Aktivität der IPP-Isomerase (Kandidatenverbindung oder Testverbindung) in einem IPP-Isomerase-Hemmtest, wobei ein in einem Aktivitätstest gefundener Inhibitor bzw. Modulator der IPP-Isomerase anschließend auf seine Wirksamkeit als Fungizid *in vivo*, d.h. an einem Pilz, getestet werden kann.

Verfahren, die geeignet sind, Modulatoren, insbesondere Inhibitoren bzw. Antagonisten der erfindungsgemäßen Polypeptide zu identifizieren, beruhen in aller Regel auf der Bestimmung der Aktivität bzw. der biologischen Funktionalität des Polypeptids. Dazu kommen prinzipiell sowohl auf ganzen Zellen beruhende Verfahren (*in vivo* Verfahren) in Frage, wie auch Verfahren, die auf der Verwendung des aus den Zellen isolierten Polypeptids beruhen, das in gereinigter oder teilweise gereinigter Form oder auch als Rohextrakt vorliegen kann. Diese zellfreien *in vitro* Verfahren können ebenso wie *in vivo* Verfahren im Labormaßstab, in bevorzugter Weise aber auch in HTS oder UHTS Verfahren genutzt werden. Im Anschluss an die *in vivo* oder *in vitro* Identifizierung von Modulatoren des Polypeptids können Tests an Pilzkulturen durchgeführt werden, um die fungizide Wirksamkeit der gefundenen Verbindungen zu prüfen.

Viele Testsysteme, die die Prüfung von Verbindungen und natürlichen Extrakten zum Ziel haben, sind bevorzugt auf hohe Durchsatzzahlen ausgerichtet, um die Zahl der untersuchten Substanzen in einem gegebenen Zeitraum zu maximieren. Testsysteme, die auf zellfreiem Arbeiten beruhen, brauchen gereinigtes oder semi-gereinigtes Protein. Sie sind geeignet für eine "erste" Prüfung, die in erster Linie darauf abzielt, einen möglichen Einfluss einer Substanz auf das Zielprotein zu detektieren. Ist eine solche erste Prüfung erfolgt und eine oder mehrere Verbindungen, Extrakte etc. gefunden, kann die Wirkung solcher Verbindungen im Labor noch gezielter untersucht werden. So kann in einem ersten Schritt die Inhibierung oder Aktivierung des erfindungsgemäßen Polypeptids *in vitro* noch einmal geprüft werden, um im Anschluss daran die Wirksamkeit der Verbindung am Zielorganismus, hier einem oder mehreren pflanzenpathogenen Pilzen, zu testen. Die Verbindung kann dann gegebenenfalls als Ausgangspunkt für die weitere Suche und Entwicklung von fungiziden Verbindungen verwendet werden, die auf der ursprünglichen Struktur basieren, jedoch z.B. hinsichtlich Wirksamkeit, Toxizität oder Selektivität optimiert sind.

Um Modulatoren aufzufinden, kann z.B. ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der *in vitro* Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, wie eine Membran, ein Kompartiment oder irgendeine andere Präparation, die die erfindungsgemäßen Polypeptide enthält, zusammen mit einem gegebenenfalls markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls die enzymatische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide zu hemmen, wird z.B. erkennbar an einer verringerten Bindung des gegebenenfalls markierten Liganden oder an einer verringerten Umsetzung des gegebenenfalls markierten Substrates. Moleküle, die die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide hemmen, sind gute Antagonisten bzw. Inhibitoren.

Die Detektion der biologischen Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide kann durch ein so genanntes Reportersystem verbessert werden. Reportersysteme in dieser Hinsicht umfassen, sind

aber nicht beschränkt auf colorimetrisch oder fluorimetrische nachweisbare Substrate, die in ein Produkt umgewandelt werden oder ein Reportergen, das auf Veränderungen der Aktivität oder der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide anspricht oder andere bekannte Bindungstests.

Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Die erfindungsgemäßen Polypeptide selbst können markiert werden, z.B. fluorimetrisch oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann. Ebenso kann jedoch die Bindung mittels des gegebenenfalls markierten Substrats, Liganden bzw. Substratanalogen verfolgt werden. Auf diese Weise lässt sich die Effektivität Antagonisten ermes-

Effekte wie Zelltoxizität werden in diesen *in vitro* Systemen in der Regel ignoriert. Die Testsysteme überprüfen dabei sowohl inhibierende bzw. suppressive Effekte der Substanzen, als auch stimulatorische Effekte. Die Effektivität einer Substanz kann durch konzentrationsabhängige Testreihen überprüft werden. Kontrollansätze ohne Testsubstanzen bzw. ohne Enzym können zur Bewertung der Effekte herangezogen werden.

Durch die anhand der vorliegenden Erfindung verfügbaren, für eine erfindungsgemäße IPP-Isomerase kodierende Nukleinsäuren enthaltenden Wirtszellen, wird auch die Entwicklung von Testsystemen, die auf Zellen basieren, zur Identifizierung von Substanzen ermöglicht, die die Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide modulieren.

Vorzugsweise handelt es sich bei den zu identifizierenden Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen, nicht jedoch um die natürlichen Inhibitoren des Enzyms, wie z.B. Liganden des Enzyms oder Substratanaloga, um anorganische oder unspezifische Inhibitoren, die generell die Aktivität eines Enzyms zerstören oder vermindern, z.B. durch die unspezifische Störung der Proteinstruktur oder die Reaktion mit reaktiven Aminosäuren des Proteins.

Ein Verfahren zum Identifizieren einer Verbindung, die die Aktivität einer IPP-Isomerase aus Pilzen moduliert und die als Fungizid im Pflanzenschutz verwendet werden kann, besteht demnach bevorzugt darin, dass man

- a) ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder eine Wirtszelle enthaltend dieses Polypeptid mit einer chemischen Verbindung oder mit einem Gemisch von chemischen Verbindungen

unter Bedingungen in Kontakt bringt, die die Interaktion einer chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben,

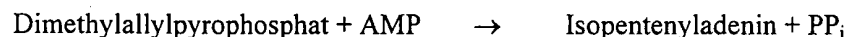
- b) die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids bei Abwesenheit einer chemischen Verbindung mit der Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids bei Anwesenheit einer chemischen Verbindung oder eines Gemisches von chemischen Verbindungen vergleicht, und
- c) die chemische Verbindung auswählt, die die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids spezifisch moduliert, vorzugsweise inhibiert, und gegebenenfalls
- d) die fungizide Wirkung der ausgewählten Verbindung *in vivo* prüft.
- 10 Besonders bevorzugt wird dabei diejenige Verbindung bestimmt, die die Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids spezifisch inhibiert. Der Begriff "Aktivität", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids.

In einer Ausführungsform, die sich an einen bekannten Test zur Bestimmung der IPP-Isomerase anlehnt, wird die von der IPP-Isomerase katalysierte Reaktion mit der Reaktion der Isopentenyl-Transferase gekoppelt. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Dimethylallylpyrophosphat und AMP zu Isopentenyladenin und Pyrophosphat. Das Pyrophosphat wird durch das Enzym Pyrophosphatase weiter abgebaut. Das dabei entstehende Phosphat kann mit einem dem Fachmann bekannten Malachitgrün-Test bestimmt werden. Der Versuchsansatz lässt sich wie folgt schematisch darstellen:

20

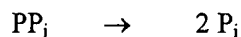


Isopentenyl-Transferase



Pyrophosphatase

25



Die Messung der enzymatischen Aktivität der IPP-Isomerase bzw. die Hemmung dieser enzymatischen Aktivität durch einen Inhibitor erfolgt dann auf Basis der Phosphat-Konzentration. Dabei wird die geringere bzw. inhibierte Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids anhand der

30 geringeren Phosphat-Konzentration relativ zu einem Kontrollansatz verfolgt.

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung überraschenderweise festgestellt, dass das Nachweisreagenz Malachitgrün aus dem Produkt, aber nicht aus dem Substrat der IPP-Isomerase direkt Phosphat freisetzen und nachweisen kann. Daher kann in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des beschriebenen Verfahrens sowohl auf die Isopentyl-Transferase als auch auf
5 die Pyrophosphatase (IPPase) verzichtet werden.

Weitere Möglichkeiten zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der IPP-Isomerase werden unter anderem auch in Ramos-Valdivia (1997) beschrieben und sollen ausdrücklich Teil der vorliegenden Anmeldung sein.

Die Messung kann auch in für HTS- oder UHTS-Assays gängigeren Formaten erfolgen, z.B. in
10 Mikrotiterplatten, in denen z.B. ein Gesamtvolumen von 5 bis 50 µl pro Ansatz bzw. pro Well vorgelegt wird. Dabei wird die zu testende, potentiell die Aktivität des Enzyms inhibierende oder aktivierende Verbindung (Kandidatenmolekül) z.B. in einer geeigneten Konzentration in Testpuffer vorgelegt. Dann wird das erfindungsgemäße Polypeptid im oben genannten Testpuffer zugegeben und die Reaktion damit gestartet. Der Ansatz wird dann bei einer geeigneten
15 Temperatur inkubiert und z.B. die Konzentration des entstehenden Pyrophosphats gemessen.

Eine weitere Messung erfolgt in einem entsprechenden Ansatz, jedoch ohne Zugabe eines Kandidatenmoleküls und ohne Zugabe eines erfindungsgemäßen Polypeptids (Negativkontrolle). Eine weitere Messung erfolgt wiederum bei Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, jedoch bei Anwesenheit des erfindungsgemäßen Polypeptids (Positivkontrolle). Negativ- und Positivkontrolle
20 ergeben damit die Vergleichswerte zu den Ansätzen bei Anwesenheit eines Kandidatenmoleküls.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren konnten auf diese Weise Inhibitoren der IPP-Isomerase identifiziert werden.

Es versteht sich von selbst, dass neben den genannten Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität einer IPP-Isomerase bzw. der Inhibition dieser Aktivität und zum
25 Identifizieren von Fungiziden auch andere, z.B. bereits bekannte, Verfahren bzw. Hemmtests verwendet werden können; solange diese Verfahren es gestatten, die Aktivität einer IPP-Isomerase zu bestimmen und eine Inhibition dieser Aktivität durch eine Kandidatenverbindung zu erkennen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde auch gefunden, dass die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Inhibitoren einer erfindungsgemäßen IPP-Isomerase
30 geeignet sind, in einer geeigneten Formulierung Pilze zu schädigen oder zu töten.

Dazu können z.B. in die Kavitäten von Mikrotiterplatten eine Lösung des zu prüfenden Wirkstoffs pipettiert werden. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft wird, wird zu jeder

Kavität Medium hinzugefügt. Das Medium wird vorher mit einer geeigneten Konzentration von Sporen bzw. Mycel des zu prüfenden Pilzes versetzt. Die resultierenden Konzentrationen des Wirkstoffes betragen z.B. 0,1, 1, 10 und 100 ppm.

Die Platten werden anschließend auf einem Schüttler bei einer Temperatur von 22°C inkubiert, bis
5 in der unbehandelten Kontrolle ein ausreichendes Wachstum feststellbar ist.

Die Auswertung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm. Aus den Messdaten der verschiedenen Konzentrationen kann die Wirkstoffdosis bestimmt werden, die zu einer 50 %igen Hemmung des Pilzwachstums gegenüber der unbehandelten Kontrolle führt (ED₅₀).

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher ebenfalls auf die Verwendung von Modulatoren der
10 IPP-Isomerase aus Pilzen, bevorzugt aus pflanzenpathogenen Pilzen als Fungizide, bzw. auf Verfahren zum Bekämpfen von vorzugsweise pflanzenpathogenen Pilzen, dadurch gekennzeichnet, dass man einen Modulator, bevorzugt einen Inhibitor einer IPP-Isomerase mit dem betreffenden Pilz und/oder seiner Umgebung in einer wirksamen Menge in Kontakt bringt.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf Fungizide, die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen
15 Verfahrens identifiziert wurden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher ebenfalls auf Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden sowie die Verwendung von Inhibitoren der IPP-Isomerase aus Pilzen, bevorzugt aus pflanzenpathogenen Pilzen als Fungizide. Davon sollen jedoch natürliche Inhibitoren wie Analoga des Substrats der IPP-Isomerase bzw. Analoga des Übergangszustandes des Substrats und
20 unspezifische Inhibitoren, die auch bei anderen Enzymen als der IPP-Isomerase eine deutliche inhibitorische Wirkung zeigen oder grundsätzlich durch die Schädigung der Proteinstruktur eine inhibitorische Wirkung haben, sowie anorganische Verbindungen nicht umfasst sein. Ein spezifischer Inhibitor sollte eine zumindest 10fach, bevorzugt 20fach, besonders bevorzugt 50fach und vorzugsweise 100fach stärkere inhibitorische Wirkung gegenüber der IPP-Isomerase
25 aufweisen als gegenüber einem anderen Enzym.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf Fungizide, die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifiziert werden.

Verbindungen, die mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifiziert werden, und die aufgrund der Inhibition der pilzlichen IPP-Isomerase eine fungizide Wirkung aufweisen, können
30 somit zur Herstellung von fungiziden Mitteln verwendet werden.

Die identifizierten Wirkstoffe können in Abhängigkeit von ihren jeweiligen physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Lösungen, Emulsionen, Suspensionen, Pulver, Schäume, Pasten, Granulate, Aerosole, Feinstverkapselungen in polymeren Stoffen und in Hüllmassen für Saatgut, sowie ULV-Kalt- und Warmnebel-Formulierungen.

- Diese Formulierungen werden in bekannter Weise hergestellt, z.B. durch Vermischen der Wirkstoffe mit Streckmitteln, also flüssigen Lösungsmitteln, unter Druck stehenden verflüssigten Gasen und/oder festen Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von oberflächenaktiven Mitteln, also Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln und/oder schaumerzeugenden Mitteln. Im Falle der
- 10 Benutzung von Wasser als Streckmittel können z.B. auch organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden. Als flüssige Lösungsmittel kommen im wesentlichen in Frage: Aromaten, wie Xylol, Toluol oder Alkyl-naphthaline, chlorierte Aromaten oder chlorierte aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Chlorbenzole, Chlorethylene oder Methylenchlorid, aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Cyclohexan oder Paraffine, z.B. Erdölfraktionen, Alkohole, wie Butanol oder Glycol
- 15 sowie deren Ether und Ester, Ketone, wie Aceton, Methylethylketon, Methylisobutylketon oder Cyclohexanon, stark polare Lösungsmittel, wie Dimethylformamid und Dimethylsulfoxid, sowie Wasser. Mit verflüssigten gasförmigen Streckmitteln oder Trägerstoffen sind solche Flüssigkeiten gemeint, welche bei normaler Temperatur und unter Normaldruck gasförmig sind, z.B. Aerosol-Treibgase, wie Halogenkohlenwasserstoffe sowie Butan, Propan, Stickstoff und Kohlendioxid. Als
- 20 feste Trägerstoffe kommen in Frage: z.B. natürliche Gesteinsmehle, wie Kaoline, Tonerden, Talkum, Kreide, Quarz, Attapulgit, Montmorillonit oder Diatomeenerde und synthetische Gesteinsmehle, wie hochdisperse Kieselsäure, Aluminiumoxid und Silikate. Als feste Trägerstoffe für Granulate kommen in Frage: z.B. gebrochene und fraktionierte natürliche Gesteine wie Calcit, Marmor, Bims, Sepiolith, Dolomit sowie synthetische Granulate aus anorganischen und organischen Mehlen sowie Granulate
- 25 aus organischem Material wie Sägemehl, Kokosnussschalen, Maiskolben und Tabakstängel. Als Emulgier und/oder schaumerzeugende Mittel kommen in Frage: z.B. nichtionogene und anionische Emulgatoren, wie Polyoxyethylen-Fettsäureester, Polyoxyethylen-Fettalkoholether, z.B. Alkylaryl-polyglycolether, Alkylsulfonate, Alkylsulfate, Arylsulfonate sowie Eiweißhydrolysate. Als Dispergiermittel kommen in Frage: z.B. Lignin-Sulfitablaugen und Methylcellulose.
- 30 Es können in den Formulierungen Haftmittel wie Carboxymethylcellulose, natürliche und synthetische pulverige, körnige oder latexförmige Polymere verwendet werden, wie Gummiarabicum, Polyvinylalkohol, Polyvinylacetat, sowie natürliche Phospholipide, wie Kephaline und Lecithine, und synthetische Phospholipide. Weitere Additive können mineralische und vegetabile Öle sein.

Es können Farbstoffe wie anorganische Pigmente, z.B. Eisenoxid, Titanoxid, Ferrocyanblau und organische Farbstoffe, wie Alizarin-, Azo- und Metallphthalocyaninfarbstoffe und Spurennährstoffe, wie Salze von Eisen, Mangan, Bor, Kupfer, Kobalt, Molybdän und Zink verwendet werden.

Die Formulierungen enthalten im allgemeinen zwischen 0,1 und 95 Gewichtsprozent Wirkstoff,
5 vorzugsweise zwischen 0,5 und 90 %.

Die erfindungsgemäßen Wirkstoffe können als solche oder in ihren Formulierungen auch in Mischung mit bekannten Fungiziden, Bakteriziden, Akariziden, Nematiziden oder Insektiziden verwendet werden, um so z.B. das Wirkungsspektrum zu verbreitern oder Resistenzentwicklungen vorzubeugen. In vielen Fällen erhält man dabei synergistische Effekte, d.h. die Wirksamkeit der
10 Mischung ist größer als die Wirksamkeit der Einzelkomponenten.

Beim Einsatz der erfindungsgemäßen Verbindungen als Fungizide können die Aufwandmengen je nach Applikation innerhalb größerer Bereiche variiert werden.

Erfindungsgemäß können alle Pflanzen und Pflanzenteile behandelt werden. Unter Pflanzen werden hierbei alle Pflanzen und Pflanzenpopulationen verstanden, wie erwünschte und
15 unerwünschte Wildpflanzen oder Kulturpflanzen (einschließlich natürlich vorkommender Kulturpflanzen). Kulturpflanzen können Pflanzen sein, die durch konventionelle Züchtungs- und Optimierungsmethoden oder durch biotechnologische und gentechnologische Methoden oder Kombinationen dieser Methoden erhalten werden können, einschließlich der transgenen Pflanzen und einschließlich der durch Sortenschutzrechte schützbaeren oder nicht schützbaeren Pflanzen-
20 sorten. Unter Pflanzenteilen sollen alle oberirdischen und unterirdischen Teile und Organe der Pflanzen, wie Spross, Blatt, Blüte und Wurzel verstanden werden, wobei beispielhaft Blätter, Nadeln, Stängel, Stämme, Blüten, Fruchtkörper, Früchte und Samen sowie Wurzeln, Knollen und Rhizome aufgeführt werden. Zu den Pflanzenteilen gehört auch Erntegut sowie vegetatives und generatives Vermehrungsmaterial, beispielsweise Stecklinge, Knollen, Rhizome, Ableger und
25 Samen.

Die erfindungsgemäße Behandlung der Pflanzen und Pflanzenteile mit den Wirkstoffen erfolgt direkt oder durch Einwirkung auf deren Umgebung, Lebensraum oder Lagerraum nach den üblichen Behandlungsmethoden, z.B. durch Tauchen, Sprühen, Verdampfen, Vernebeln, Streuen, Aufstreichen und bei Vermehrungsmaterial, insbesondere bei Samen, weiterhin durch ein- oder
30 mehrschichtiges Umhüllen.

Die nachfolgenden Beispiele illustrieren verschiedene Aspekte der vorliegenden Erfindung und sind nicht limitierend auszulegen.

Beispiele

Beispiel 1

Klonierung, Expression und Reinigung der IPI1 aus *U. maydis*

Für die heterologe Expression des *ipil*-Gens wurde das Gen mit den genspezifischen
5 Oligonucleotiden Idi-c (5'-CTCGAGGATCCAGGAGGCGGTGAATG-3') und Idi-n (5'-CTCGCATATGTCGACCGCCACCGTCAC-3') mittels PCR amplifiziert und über die eingeführte *Nde*I- und *Bam*HI-Schnittstelle in den Vektor pET21b (Novagen) eingebracht. Die erhaltenen Plasmide wurden in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert.

5 ml Selektionsmedium (dYT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) wurde mit einer Einzelkolonie
10 angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Eine Glycerindauerkultur wurde wie folgt hergestellt: 900 µl Kultur und 100 µl steriles Glycerin mischen und bei -70°C einfrieren. Als Vorkultur wurde 12 ml dYT Medium mit 25 µl aus der Dauerkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht im Schüttler inkubiert. Die Hauptkultur wurde 1:40 angeimpft, d.h. 12 ml Vorkultur und 500 ml dYT-Medium + 100 µg/ml Ampicillin. Das Wachstum der Kultur erfolgte bei 37°C unter
15 Schütteln und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Kultur durch Zugabe von 1mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach einer Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und das Pellet bei -70°C eingefroren.

Das Zellpellet einer 500 ml Expressionskultur wurde in 35 ml Aufschlusspuffer resuspendiert (50 mM Tris, 1 % Glycerin, 1mM DTT, 300 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,5). Der Aufschluss
20 der Zellen erfolgte mit einem Sonifizierstab auf Eis. Es wurde 8 mal 45 Sekunden mit jeweils 45 Sekunden Pause sonifiziert. Die löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden durch Abzentrifugieren (30 min. bei 4°C und 10 000 rpm) getrennt. Der Überstand wurde an eine 50%ige Ni-NTA-Agarose Matrix von Qiagen für 60 Minuten bei 4°C gebunden und in eine Leersäule überführt. Die Bindekapazität der Ni-NTA Matrix liegt bei 9 mg Protein pro 1 ml Agarose. Die
25 Säule wurde zweimal mit je 44 ml Aufschlusspuffer + 10 mM Imidazol gewaschen. Die Elution erfolgte in 2 ml Fraktionsschritten mit Aufschlusspuffer + 250 mM Imidazol. Die das gereinigte Enzym enthaltenden Fraktionen wurden danach gepoolt und auf 1mg/ml verdünnt. Es erfolgte eine Zugabe von Glycerin in einer Endkonzentration von 10 %. Die Lagerung des Enzyms erfolgt bei -70°C.

Beispiel 2

Identifizierung von Modulatoren der IPP-Isomerase in einem Hemmtest

- Die Test wurden in 384er MTPs von Greiner (transparent) durchgeführt. Die Negativkontrolle erfolgte durch Weglassen des Enzyms. 5 µl R1-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM MgCl₂, 10 % Glycerin) bzw. die zu prüfende Substanz (1/10 des Assayvolumens) wurden zusammen mit 20 µl Substratlösung (0,15 mM IPP in Reaktionspuffer R1), 25 µl Enzymmix (0,59 µg/ml gereinigtes Protein (IPP-Isomerase) in Reaktionspuffer R1) bei 37°C für 25 Minuten inkubiert. Es wurden 50 µl Malachitgrün-Färbelösung zugegeben und bei RT für 90 Minuten inkubiert. Die Detektion einer Änderung der Absorption erfolgte bei 620 nm.

10 Beispiel 3

Nachweis der fungiziden Wirkung der identifizierten Inhibitoren der IPP-Isomerase

- In die Kavitäten von Mikrotiterplatten werden eine methanolische Lösung des anhand eines erfindungsgemäßen Verfahrens identifizierten Wirkstoffs (Bsp. 3), versetzt mit einem Emulgator, pipettiert. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft ist, werden je Kavität 200 µl Potatoe-Dextrose-Medium hinzugefügt. Das Medium wird vorher mit geeigneten Konzentrationen von Sporen bzw. Mycelen des zu prüfenden Pilzes versetzt.

Die resultierenden Konzentrationen des Wirkstoffs beträgt 0,1, 1, 10 und 100 ppm. Die resultierende Konzentration des Emulgators beträgt 300 ppm.

- Die Platten werden anschließend auf einem Schüttler bei einer Temperatur von 22°C inkubiert, bis in der unbehandelten Kontrolle ein ausreichendes Wachstum feststellbar ist. Die Auswertung erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 620 nm. Aus den Messdaten der verschiedenen Konzentrationen wird die Wirkstoffdosis, die zu einer 50 %igen Hemmung des Pilzwachstums gegenüber der unbehandelten Kontrolle führt (ED₅₀), berechnet.

Literatur

- Cheng, F. und Oldfield, E. (2004): Inhibition of Isoprene Biosynthesis Pathway Enzymes by Phosphonates, Bisphosphonates, and Diphosphonates. *J. Med. Chem.* 47, 5149-5158.
- Mayer, M. P., F. M. Hahn, D. J. Stillman & C. D. Poulter (1992): Disruption and mapping of IDI,
5 the gene for the isopentenyl diphosphate isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8, 743-748.
- Ramos-Valdivia A., van der Heijden, R. und Verpoorte, R. (1997): Isopentenyl diphosphate isomerase: a core enzyme in isoprenoid biosynthesis. A review of its biochemistry and function. *Nat. Prod. Rep.* 14, 591-603.
- 10 Rohdich F., Bacher A. und Eisenreich W. (2004): Perspectives in anti-infective drug design. *Bioorganic Chemistry* 32, 292-308.
- Street et al. (1994): Identification of Cys139 and Glu207 as catalytically important groups in the active site of isopentenyl diphosphate:dimethylallyl diphosphate isomerase. *Biochemistry* 33, 4212-4217.
- 15 Thompson K., Dunford J.E., Ebetino F.H., Rogers M.J. (2002): Identification of a bisphosphonate that inhibits isopentenyl diphosphate isomerase and farnesyl diphosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290, 869-873.
- Wouters J., Oudjama Y., Barkley S.J., Tricot C., Stalon V., Droogmans L., Poulter C.D. (2003) :
Catalytic mechanism of *Escherichia coli* isopentenyl diphosphate isomerase involves Cys-67, Glu-
20 116, and Tyr-104 as suggested by crystal structures of complexes with transition state analogues and irreversible inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278, 11903-11908.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden, dadurch gekennzeichnet, dass man
 - (a) ein pilzliches Polypeptid mit der enzymatischen Aktivität einer IPP-Isomerase mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion der chemischen Verbindung mit dem Polypeptid erlauben, in Kontakt bringt,
 - (b) die Aktivität der IPP-Isomerase bei Abwesenheit einer chemischen Verbindung mit der Aktivität der IPP-Isomerase bei Anwesenheit einer chemischen Verbindung oder eines Gemisches von chemischen Verbindungen vergleicht, und
 - (c) die chemische Verbindung, die die IPP-Isomerase spezifisch inhibiert, auswählt.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Aktivität der IPP-Isomerase bestimmt, indem man die Entstehung von Phosphat aus dem Produkt der von der IPP-Isomerase katalysierten Reaktion misst.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man eine Hemmung der enzymatischen Aktivität der IPP-Isomerase bei Anwesenheit einer chemischen Verbindung anhand einer abnehmenden Menge an Phosphat bestimmt.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man die Reaktion der IPP-Isomerase direkt mittels eines Malachitgrün-Tests bestimmt.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in einem weiteren Schritt (d) die fungizide Wirkung der identifizierten Verbindung testet, indem man sie mit einem Pilz in Kontakt bringt.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man eine IPP-Isomerase aus einem pflanzenpathogenen Pilz verwendet.
7. Verwendung von Polypeptiden mit der Aktivität einer IPP-Isomerase zum Identifizieren von Fungiziden.
8. Verwendung von Inhibitoren von Polypeptiden mit der Aktivität einer IPP-Isomerase als Fungizide.
9. Verfahren zur Kontrolle von pflanzenpathogenen Pilzen, dadurch gekennzeichnet, dass man

- (a) eine fungizid wirksame Verbindung in einem Verfahren gemäß Anspruch 1 identifiziert,
 - (b) die identifizierte Verbindung in geeigneter Weise formuliert, und
 - (c) mit dem pflanzenpathogenen Pilz und/oder seiner Umgebung in Kontakt bringt.
- 5 10. Verwendung von fungiziden Verbindungen, die in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 gefunden werden, zum Herstellen von fungiziden Mitteln.
11. Nukleinsäure gemäß Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Sequenz umfasst, die ausgewählt ist aus:
- (a) einer Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
 - 10 (b) Sequenzen, die für ein Polypeptid kodieren, welches die Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst,
 - (c) Sequenzen, welche an die unter a) definierten Sequenzen bei einer Hybridisierungstemperatur von 42-65°C hybridisieren, und
 - (d) Sequenzen, welche eine zumindest 80 %ige, bevorzugt eine zumindest 85 %ige
15 und besonders bevorzugt eine zumindest 90 %ige Identität mit den unter a) und b) definierten Sequenzen aufweisen.
12. DNA-Konstrukt umfassend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 10 oder 11 und einen heterologen Promotor.
13. Vektor umfassend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 11 oder 12, oder ein DNA-
20 Konstrukt gemäß Anspruch 12.
14. Vektor gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäure funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.
15. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 11 oder 12, ein DNA-Konstrukt
25 gemäß Anspruch 13 oder einen Vektor gemäß Anspruch 14 oder 15.
16. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer IPP-Isomerase, welches von einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 11 oder 12 kodiert wird.

17. Polypeptid mit der biologischen Aktivität einer IPP-Isomerase, welches eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 2 umfasst.

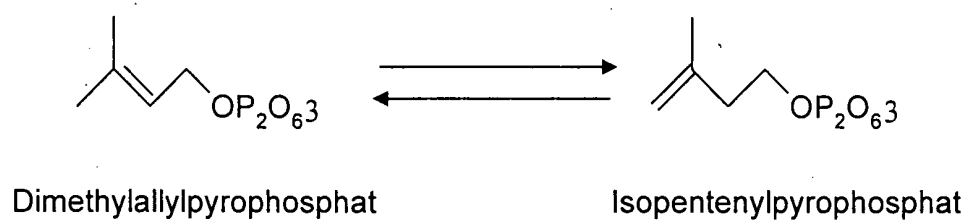


Abbildung 1

IDI1_s.cer : KLDDK-----IKGAI~~TA~~AV~~AK~~IK~~HE~~LGI~~PE~~DE~~TK~~RG~~TH~~LN~~RH~~MA-----PSNEP-----WGEHEIDYIIFFYK : 215
 ADL268C.1 : TLEAK-----VOGA~~TA~~AV~~AK~~IK~~HE~~LGI~~PP~~ACT~~LK~~RG~~TH~~LN~~RH~~MA-----PSNGP-----WGEHEIDYIIFFYR : 221
 IDI1_s.pom : TLPEA-----VEGV~~NA~~AOR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~QA~~KY~~IP~~KDK-FO~~LT~~RU~~TH~~LA-----PSTGA-----WGEHEIDYIIFFFK : 160
 MG07125.4 : NLPDS-----IMGV~~RA~~AOR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~KK~~EQ~~VP~~LEN-FH~~EL~~TR~~TH~~KA-----PSDGK-----WGEHEVDYIIFFIK : 184
 CA4116.6 : SLEGS~~KV~~N~~LN~~TA~~VK~~GA~~VA~~AOR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~PP~~E~~DA~~PIEN-FT~~LT~~RU~~TH~~KS-----PSGDESSKWGEHEIDYIIILK : 214
 AN0579.1 : QLDAA-----ILGV~~RA~~AOR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~KK~~EQ~~VP~~IEK-FE~~LT~~RU~~TH~~KA-----PSDGK-----WGEHEIDYIIIFIQ : 198
 FG09722.1 : TLEDS-----IAGV~~RA~~AOR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~KK~~EQ~~VP~~ED-FH~~EL~~TR~~TH~~KA-----PSDGM-----WGEHEIDYIIIFIK : 184
 NCU07719.3 : TLPDA-----IAGV~~NA~~AAR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~KK~~EQ~~VP~~ED-FH~~EL~~TR~~TH~~KA-----PSDGK-----WGEHEIDYIIIFIK : 185
 PHYTSO_123 : ELEDG-----FGV~~KRA~~AIR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~PT~~ST~~FA~~ED-LA~~VT~~ST~~VM~~KA-----ASDAN~~WT~~EYEMDHIIFAR : 180
 PHYTRA_812 : ELEDG-----VG~~VKRA~~AIR~~KI~~IK~~HE~~LGI~~PT~~TT~~FA~~IED-LA~~VT~~ST~~VM~~KA~~RC~~L~~WL~~N~~PR~~AASDEN~~WT~~EYEMDHIIFAR : 189

* 260 * 280 * 300 * 320

UM04838.1 : ADV-----TLKP~~N~~LN~~EV~~CD~~TK~~V~~SP~~E~~K~~KAL~~M~~TE~~LD~~PAS~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~V~~HK~~FP~~FW~~SE~~L~~LARRGADHSKPFDAKSLSLTD : 255
 PC.77.14.1 : ADV-----DVTP~~N~~LN~~EV~~IR~~DY~~K~~V~~SK~~ET~~OK~~M~~F~~ED~~PS-NS~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~ARD~~FT~~FG~~WW~~DE~~L~~LKRK--DASGKVDAKSLAGVAD : 246
 IDI1_s.cer : INAKEN~~LT~~VN~~PN~~V~~NE~~VR~~DE~~K~~V~~SP~~ND~~E~~K~~TM~~F~~ADPS-YK~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~CEN~~V~~FN~~WE~~EQ~~DD~~-----LSEVEN : 280
 ADL268C.1 : VSDGCT~~LT~~VD~~PN~~PN~~EV~~RNSR~~VT~~QHE~~K~~EM~~F~~ANPE-LK~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~COSY~~IF~~FE~~WW~~GQ~~IS~~D-----LSRVEN : 286
 IDI1_s.pom : GKV-----ELD-IN~~PN~~EV~~QA~~YK~~VT~~ME~~E~~KEM~~F~~SDPQ-YG~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~CEH~~FT~~FK~~WW~~QD~~YD~~H-----ASKFQ- : 220
 MG07125.4 : ANV-----DLD-IN~~KN~~EV~~QA~~TO~~TS~~ADG~~E~~KAF~~F~~KDPA-AK~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~CESM~~ET~~FE~~WW~~QH~~DS~~-G-----LEKYTN : 246
 CA4116.6 : TKN-----DITV~~NA~~Y~~NE~~V~~K~~DF~~K~~V~~SA~~DE~~K~~KV~~M~~F~~ED~~DS-LV~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~COS~~FT~~FK~~WW~~DN~~ED~~N-----LDQFK- : 276
 AN0579.1 : ADV-----VLE-PN~~LN~~EV~~RD~~TR~~V~~SADE~~K~~KEM~~F~~KQTN-LK~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~CNSM~~ET~~FE~~WW~~SH~~GS~~SPS-----LDQYKG : 261
 FG09722.1 : ANV-----DLD-IN~~KN~~EV~~RD~~TO~~VT~~PE~~S~~KQO~~F~~DDPS-LV~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~CNSM~~ET~~FE~~WW~~ON~~DS~~-G-----LDKYLN : 246
 NCU07719.3 : ANP-----EVN-AN~~LN~~EV~~QA~~TO~~QV~~SAEK~~E~~KEM~~F~~KDPS-LK~~FT~~PE~~WE~~K~~LE~~CESM~~ET~~FE~~WW~~AS~~DN~~-G-----LEKYTD : 247
 PHYTSO_123 : GDVS-----LDNV~~KN~~EV~~EQ~~VE~~VT~~RE~~N~~EPAL~~LD~~ST-RK~~LS~~SP~~WE~~K~~LE~~GSN~~L~~E~~PK~~WW~~DN~~EDT-----VLAKDNA : 243
 PHYTRA_812 : GEVS-----LDNV~~NE~~NE~~VE~~QVE~~ET~~ARE~~N~~EPAL~~LD~~NTT-RK~~LS~~SP~~WE~~K~~LE~~GSN~~L~~E~~PH~~WW~~DN~~EDT-----VLVKDSA : 252

UM04838.1 : HS-IHRL : 262
 PC.77.14.1 : GSKVVKM : 254
 IDI1_s.cer : DRQIHRML : 288
 ADL268C.1 : DTQIHRMV : 294
 IDI1_s.pom : DTLIHRC- : 227
 MG07125.4 : EQGIRML : 254
 CA4116.6 : DEEIHRL : 284

AN0579.1 : ETQIRRM- : 268
FG09722.1 : EQEIRRM- : 253
NCU07719.3 : EQEIRRMML : 255
PHYTSO_123 : D----- : 244
PHYTRA_812 : DHQIHDFR : 260

Abbildung 2



Abbildung 3

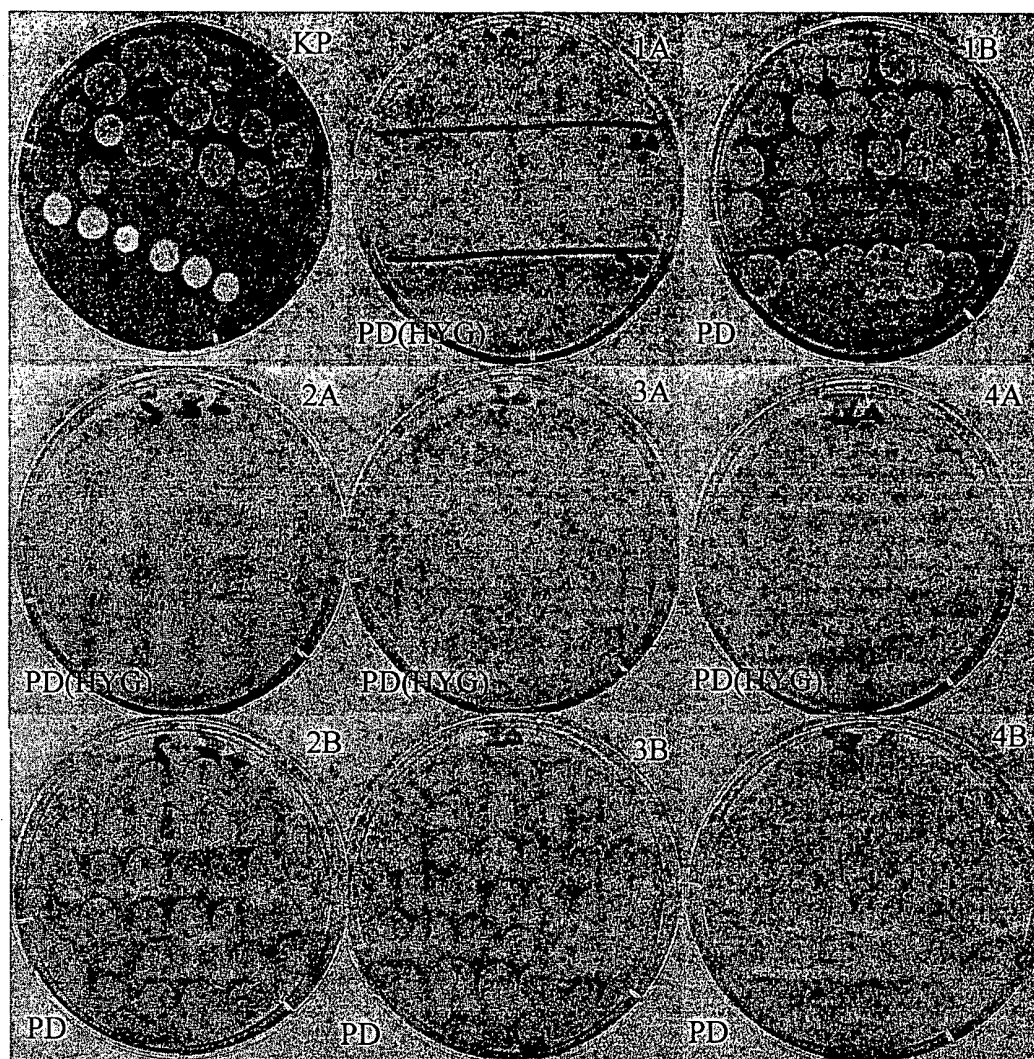


Abbildung 4

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer CropScience AG

<120> Verfahren zum Identifizieren von Fungiziden basierend auf
Isopentenylpyrophosphat-Isomerasen

<130> BCS 03-3042

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 789

<212> DNA

<213> Ustilago maydis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<400> 1

atg tcg acc gcc acc gtc acc gag aca gcg aca cat cgc acc tcg tcc 48

Met Ser Thr Ala Thr Val Thr Glu Thr Ala Thr His Arg Thr Ser Ser

1 5 10 15

acc atc acg cta gac tca gcg oca ctc acc ggc tat gat gag gag cag 96

Thr Ile Thr Leu Asp Ser Ala Pro Leu Thr Gly Tyr Asp Glu Glu Gln

20 25 30

atc cgt ctc atg gaa gag cga tgt atc gtg ctc gac aat gac gac aag 144

Ile Arg Leu Met Glu Glu Arg Cys Ile Val Leu Asp Asn Asp Asp Lys

35 40 45

tac gtc cgc gat ggc agt aag aag gaa tgc cat ctc atg acc aac atc 192

Tyr Val Arg Asp Gly Ser Lys Lys Glu Cys His Leu Met Thr Asn Ile

50 55 60

aac aag ggt ctc ttg cat cgt gct ttc tcc gtg ttc ctc ttt gat cct	240
Asn Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Pro	
65 70 75 80	
act acg gga aag ctg ttg ctt cag cga agg gcg ctc gaa aag atc act	288
Thr Thr Gly Lys Leu Leu Leu Gln Arg Arg Ala Leu Glu Lys Ile Thr	
85 90 95	
ttc ccc aac atg tgg acc aac act tgc tgc tct cat ccg ttg gcg atc	336
Phe Pro Asn Met Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Ala Ile	
100 105 110	
aag gga gag ctc gag gaa gca gag cag atc ggt gta cgc cgt gca gcg	384
Lys Gly Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gln Ile Gly Val Arg Arg Ala Ala	
115 120 125	
cag cgc aag ctc gat cac gaa ctc ggc atc cgc gcc gaa caa gtg cca	432
Gln Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly Ile Arg Ala Glu Gln Val Pro	
130 135 140	
ttg gat gaa ttc cag tac ctc acc cga atc cac tac ctc gct ccc aac	480
Leu Asp Glu Phe Gln Tyr Leu Thr Arg Ile His Tyr Leu Ala Pro Asn	
145 150 155 160	
aac gac gcc aat aac atg tgg ggc gaa cac gaa atc gac tac atc ctc	528
Asn Asp Ala Asn Asn Met Trp Gly Glu His Glu Ile Asp Tyr Ile Leu	
165 170 175	
ttc atc act gcc gac gtc acg ttg aaa ccc aac ctg aac gag gtc tgc	576
Phe Ile Thr Ala Asp Val Thr Leu Lys Pro Asn Leu Asn Glu Val Cys	
180 185 190	
gat acc aaa tgg gtt tcg ccc gaa gag ttg aag gcg ctc atg acc gag	624
Asp Thr Lys Trp Val Ser Pro Glu Glu Leu Lys Ala Leu Met Thr Glu	
195 200 205	
ttg gac cct gcg tca ttt acg cca tgg ttc aag ttg att gtg cac aag	672
Leu Asp Pro Ala Ser Phe Thr Pro Trp Phe Lys Leu Ile Val His Lys	
210 215 220	

- 3 -

ttt ctc ttc ccc tgg tgg agc gag ttg ctc gca agg aga ggc gcg gat 720
 Phe Leu Phe Pro Trp Trp Ser Glu Leu Leu Ala Arg Arg Gly Ala Asp
 225 230 235 240

cac agc aaa cca ttt gac gcc aag tcg ctg tcg gat ctt aca gat cac 768
 His Ser Lys Pro Phe Asp Ala Lys Ser Leu Ser Asp Leu Thr Asp His
 245 250 255

agc att cac cgc ctc ctc tga 789
 Ser Ile His Arg Leu Leu
 260

<210> 2

<211> 262

<212> PRT

<213> Ustilago maydis

<400> 2

Met Ser Thr Ala Thr Val Thr Glu Thr Ala Thr His Arg Thr Ser Ser
 1 5 10 15

Thr Ile Thr Leu Asp Ser Ala Pro Leu Thr Gly Tyr Asp Glu Glu Gln
 20 25 30

Ile Arg Leu Met Glu Glu Arg Cys Ile Val Leu Asp Asn Asp Asp Lys
 35 40 45

Tyr Val Arg Asp Gly Ser Lys Lys Glu Cys His Leu Met Thr Asn Ile
 50 55 60

Asn Lys Gly Leu Leu His Arg Ala Phe Ser Val Phe Leu Phe Asp Pro
 65 70 75 80

Thr Thr Gly Lys Leu Leu Leu Gln Arg Arg Ala Leu Glu Lys Ile Thr
 85 90 95

- 4 -

Phe Pro Asn Met Trp Thr Asn Thr Cys Cys Ser His Pro Leu Ala Ile
 100 105 110

Lys Gly Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gln Ile Gly Val Arg Arg Ala Ala
 115 120 125

Gln Arg Lys Leu Asp His Glu Leu Gly Ile Arg Ala Glu Gln Val Pro
 130 135 140

Leu Asp Glu Phe Gln Tyr Leu Thr Arg Ile His Tyr Leu Ala Pro Asn
 145 150 155 160

Asn Asp Ala Asn Asn Met Trp Gly Glu His Glu Ile Asp Tyr Ile Leu
 165 170 175

Phe Ile Thr Ala Asp Val Thr Leu Lys Pro Asn Leu Asn Glu Val Cys
 180 185 190

Asp Thr Lys Trp Val Ser Pro Glu Glu Leu Lys Ala Leu Met Thr Glu
 195 200 205

Leu Asp Pro Ala Ser Phe Thr Pro Trp Phe Lys Leu Ile Val His Lys
 210 215 220

Phe Leu Phe Pro Trp Trp Ser Glu Leu Leu Ala Arg Arg Gly Ala Asp
 225 230 235 240

His Ser Lys Pro Phe Asp Ala Lys Ser Leu Ser Asp Leu Thr Asp His
 245 250 255

Ser Ile His Arg Leu Leu
 260