

**Funktionelle Charakterisierung von *PFP1*,
einem mutmaßlichen Pathogenitätsgen
des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Sylvia Siersleben

geb. am 29. März 1980 in Halle (Saale)

Gutachter

1. Prof. Dr. D. Scheel
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. P. Tudzynski

Eingereicht am: 07.02.2011

Verteidigt am: 20.06.2011

MEINEN ELTERN

*„Die Dogmen wechseln, und unser Wissen ist trügerlich; aber die Natur irrt nicht:
Ihr Gang ist sicher, und sie verbirgt ihn nicht.
Jedes ist ganz in ihr, und sie ist ganz in jedem.“*

(Arthur Schopenhauer, Hauptwerke Band I - Die Welt als Wille und Vorstellung)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen, Tabellen und mathematische Formeln	vii
Abkürzungsverzeichnis	xvii
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzen und ihre Umgebung	1
1.2 Phytopathogene Pilze	2
1.3 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr	4
1.4 Das Pathosystem <i>Hordeum vulgare</i> L. – <i>Rhynchosporium commune</i>	7
1.4.1 <i>Hordeum vulgare</i> L.	7
1.4.2 <i>Rhynchosporium commune</i>	8
1.4.3 Betrachtungen zur molekularen Interaktion zwischen <i>Hordeum vulgare</i> L. und <i>Rhynchosporium commune</i>	13
1.4.3.1 Verlauf kompatibler und inkompatibler Interaktionen	13
1.4.3.2 Molekulare Kommunikation – Gegenstand der Forschung	16
1.5 Vorarbeiten	21
1.5.1 Die Insertionsmutagenese zur Identifizierung von Pathogenitätsgenen	21
1.5.2 Die REMI-Mutante LB20 ₅₇	22
1.5.3 Identifizierung eines Kandidatengens	23
1.5.4 Komplementation der REMI-Mutante LB20 ₅₇	25
1.6 Zielstellung	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Saatgut und Pflanzerde	27
2.1.2 Pilzisolat	27
2.1.3 Chemikalien	27
2.1.4 Enzyme und molekularbiologische Kits	28
2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen	29
2.1.6 Bakterienstämme und Vektoren	38
2.1.7 Größenstandards	39

2.1.8	Oligonukleotide und Nukleotide	39
2.2	Geräte, Apparaturen und Verbrauchsmaterial	39
2.3	Methoden	44
2.3.1	Arbeiten mit Organismen	44
2.3.1.1	Pflanzenanzuchtbedingungen	44
2.3.1.2	Kultivierung der <i>Rhynchosporium-commune</i> -Isolate	44
2.3.1.3	Kultivierung der Bakterienstämme	45
2.3.1.4	Pflanzeninokulation	46
2.3.1.5	Ernte des Pflanzenmaterials	46
2.3.1.6	Ernte des Pilzmaterials	47
2.3.1.7	Herstellung von Gefrier- und Dauerkulturen	48
2.3.1.8	Herstellung transformationskompetenter <i>E.-coli</i> -und <i>A.-tumefaciens</i> -Zellen	49
2.3.1.9	Transfektions- und Transformationsmethoden	50
2.3.2	RNA-Analysen	53
2.3.2.1	Isolierung von Gesamt-RNA	53
2.3.2.2	Abbau von Verunreinigungen genomischer DNA aus RNA-Proben	53
2.3.2.3	Herstellung von cDNA	53
2.3.3	DNA-Analysen und Klonierung	54
2.3.3.1	Isolierung von genomischer DNA	54
2.3.3.2	Polymerase-Kettenreaktionen	55
2.3.3.3	Gelelektrophorese	60
2.3.3.4	DNA-Hybridisierungen (<i>Southern</i> -Analysen)	61
2.3.3.5	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	62
2.3.3.6	Isolierung von Plasmid-DNA	63
2.3.3.7	Restriktionsreaktionen	64
2.3.3.8	Ligationsreaktionen	65
2.3.3.9	Klonierung von PCR-Fragmenten	66
2.3.3.10	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	66
2.3.4	Herstellung rekombinanter <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	66
2.3.5	Mikroskopie	68
2.3.5.1	Mikroskopie von <i>Rhynchosporium commune</i> auf Blattproben	68
2.3.5.2	Mikroskopie von <i>Rhynchosporium commune</i> im Flüssigmedium	68
2.3.5.3	Mikroskopie von <i>Rhynchosporium commune</i> auf Limabohnenagar	68
2.3.6	Verwendete Software	69

3. Ergebnisse	71
3.1 Untersuchung der REMI-Mutante LB20 ₅₇ und der REMI-Komplementationsmutante	71
3.1.1 Charakterisierung des REMI-Ereignisses durch DNA-Hybridisierung	71
3.1.2 Untersuchungen zur Expression des <i>PFPI</i> -Gens	80
3.1.2.1 Semiquantitative Expressionsanalysen durch RT-PCR	80
3.1.2.2 Quantitative Expressionsanalysen durch Real-Time-PCR	82
3.2 Charakterisierung des <i>PFPI</i> -Gens	85
3.2.1 Aufklärung der <i>PFPI</i> -Genstruktur	85
3.2.1.1 Identifizierung des 5'-Bereiches	85
3.2.1.2 Identifizierung des 3'-Bereiches	87
3.2.2 Expressionsstudien	90
3.2.2.1 Studien zum pilzlichen Wachstum sowie zur <i>PFPI</i> -Genexpression <i>in planta</i>	90
3.2.2.1.1 Wachstumskinetik	90
3.2.2.1.2 Makroskopische und mikroskopische Analysen	94
3.2.2.1.3 Expressionskinetik	99
3.2.2.2 Studien zur <i>PFPI</i> -Expression <i>ex planta</i>	103
3.3 Charakterisierung des Pfp1-Proteins	111
3.3.1 Charakterisierung der Proteinstruktur	111
3.3.2 Phylogenetische Einordnung von Pfp1	116
3.3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des Pfp1-Proteins	117
3.3.3.1 Amino-terminale Proteinfusionsanalysen	120
3.3.3.2 Carboxy-terminale Proteinfusionsanalysen	123
3.4 Generierung der <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten	126
3.4.1 Agrobakterien-vermittelte Transfektion (ATMT) von <i>Rhynchosporium commune</i>	126
3.4.2 Transfektion von <i>R. commune</i> nach Protoplastierung	134
3.4.2.1 Optimierung der Protoplastierung	134
3.4.2.2 Optimierung der Transfektion	136
3.4.3 Etablierung des Fusions-PCR-Systems	140
3.4.4 Generierung der <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten unter Verwendung der Fusions-PCR-Methode	142
3.4.5 Nachweis der Deletionsereignisse	144
3.4.5.1 PCR-Analysen	144

3.4.5.2 DNA-Hybridisierungen	146
3.4.5.3 Überprüfung der <i>PFPI</i> -Expression in den Deletionsmutanten	153
3.5 Charakterisierung der Deletionsmutanten	157
3.5.1 Analysen der Blattsymptomatik	157
3.5.1.1 Inokulationsversuche mit Konidiosporen des siebten bzw. vierten Transfers	157
3.5.1.2 Reisolierung der Deletionsmutanten	162
3.5.1.3 Inokulationsversuche mit Konidiosporen des zweiten Transfers	166
3.5.2 Mikroskopie der $\Delta PFPI$ -Mutanten	172
3.5.2.1 Mikroskopie <i>in planta</i>	172
3.5.2.2 Mikroskopie <i>ex planta</i>	174
3.5.3 Quantitative Wachstumsanalysen der $\Delta PFPI$ -Mutanten	180
3.5.3.1 Wachstumskinetik <i>in planta</i>	180
3.5.3.2 Untersuchungen zum Wachstum <i>ex planta</i>	183
3.5.4 Untersuchungen zur Konidiosporen-Keimung der $\Delta PFPI$ - Mutanten	188
3.5.4.1 Bestimmung der Sporen-Keimungsrate	188
3.5.4.2 Bestimmung der Anzahl gebildeter Keimhyphen	190
3.5.4.3 Bestimmung der Keimhyphenlänge	191
3.6 Komplementation der $\Delta PFPI$ -Mutanten	193
3.6.1 Generierung der Komplementationsmutanten	193
3.6.2 Charakterisierung der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten	196
3.6.2.1 Verifizierung der $\Delta PFPI$ -Komplementations- mutanten durch PCR	196
3.6.2.2 Untersuchung der <i>PFPI</i> -Expression	198
3.6.2.3 Inokulationsversuche	201
3.6.2.4 Mikroskopische Untersuchung der $\Delta PFPI$ - Komplementationsmutanten	209
3.6.2.4.1 Mikroskopische Untersuchung der Pilz- entwicklung <i>in planta</i>	209
3.6.2.4.2 Mikroskopische Untersuchung der Pilz- entwicklung <i>ex planta</i>	211
4. Diskussion	215
4.1 Insertionsbedingte Beeinträchtigung der <i>PFPI</i> -Expression in der REMI-Mutante LB20 ₅₇	215

4.2 Die konstitutive Expression des <i>PFPI</i> -Gens – erste Hinweise auf eine regulatorische Funktion?	225
4.3 Pfp1 als Protein mit Epc-N-Domäne – Funktionen homologer Proteine	227
4.4 Betrachtungen zum Verhalten der <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten – Hinweise auf mögliche Funktionen des <i>PFPI</i> -Gens	233
4.5 Mögliche Erklärungen für das Verhalten der Komplementationsmutanten	244
4.6 Ausblick	249
5. Zusammenfassung	251
6. Literaturverzeichnis	253
7. Anhang	I
7.1 Verwendete Oligonukleotide	I
7.2 Sequenzen und Sequenzvergleiche	IV
7.2.1 Nukleinsäuresequenzvergleiche	IV
7.2.2 Aminosäuresequenzvergleiche	V
7.2.3 Sequenzen	VI
7.3 Verwendete Vektoren	XXI
7.3.1 Klonierungsvektoren	XXI
7.3.2 Binäre Vektoren	XXI
7.3.3 Expressionsvektoren	XXII
7.4 Klonierungen und Restriktionen	XXVIII
7.4.1 Lokalisierungsstudien	XXVIII
7.4.2 Promotorfusionsstudien	XXIX
7.4.3 Agrobakterium-vermittelte Transfektion (ATMT)	XXIX
7.4.4 Komplementation der Δ <i>PFPI</i> -Mutanten	XXX
7.5 Zusätzliche Abbildungen zum Ergebnisteil	XXXVI
7.5.1 Charakterisierung des REMI-Ereignisses durch DNA-Hybridisierung	XXXVI
7.5.2 Generierung der <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten unter Verwendung der Fusions-PCR-Methode	XXXVI
7.5.3 Verifizierung der Deletionsereignisse durch DNA-Hybridisierung	XXXVII

Eidesstattliche Erklärung

Lebenslauf und Werdegang

Publikationen

Danksagung

Abbildungen, Tabellen und mathematische Formeln

Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Bezeichnung	Seite
Einleitung		
1.1	„Zick-Zack-Modell“ nach Jones und Dangl (2006)	7
1.2	Symptomausbildung auf Blättern der Wintergerste nach Befall mit <i>R. commune</i>	9
1.3	Lebenszyklus des phytopathogenen Pilzes <i>R. commune</i> auf Gerste	10
1.4	Schematische Darstellung des Verlaufs einer kompatiblen und inkompatiblen Interaktion des phytopathogenen Pilzes <i>R. commune</i> und der Wirtspflanze Gerste	14
1.5	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Gerstepathogenen Pilzes <i>R. commune</i> auf der Blattoberfläche	14
1.6	Modell der molekularen Interaktion zwischen <i>R. commune</i> und Gerste (Knogge, 1996)	18
1.7	Schematische Darstellung des Prinzips der Restriktionsenzym-vermittelten Integration (<i>restriction enzyme-mediated integration</i> , REMI)	22
1.8	Vergleich der Phänotypen der REMI-Mutante LB20 ₅₇ und des <i>R.-commune</i> -Wildtyps UK7 21 Tage nach Infektion	23
1.9	Schematische Darstellung der REMI-Integration	24
1.10	Vergleiche der Symptomausbildung durch das Wildtyp-Isolat UK7, die REMI-Mutante LB20 ₅₇ sowie die REMI-Komplementationsmutanten 1 und 2	26
Ergebnisse		
3.1	Ergebnis der DNA-Hybridisierung zur Charakterisierung des REMI-Ereignisses	73-74
3.2	Schematische Darstellungen der pAN7-1-Insertionsstelle im Promotorbereich des <i>PFPI</i> -Gens der REMI-Mutante LB20 ₅₇	76
3.3	Schematische Darstellungen der <i>PFPI</i> -Genstruktur im <i>R.-commune</i> -Wildtyp UK7	77

3.4	Schematische Darstellungen des Plasmids pAN7-1 und des Vektors pCR2.1- <i>PFPI</i> -5'-UTR	78
3.5	Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche der Gene α -Tubulin und <i>PFPI</i> sowie der Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide	81
3.6	Gelelektrophoretische Auftrennung der Multiplex-PCR zur Amplifizierung der cDNA-Fragmente von α - <i>TUB</i> sowie <i>PFPI</i>	81
3.7	Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche von <i>GPD</i> und <i>PFPI</i> sowie der Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide	82-83
3.8	Grafische Darstellung der durch Real-Time-PCR-Experimente ermittelten relativen <i>PFPI</i> -Expressionsraten in der REMI-Mutante LB20 ₅₇ sowie der REMI-Komplementationsmutante im Vergleich zum Wildtyp-Isolat UK7	84
3.9	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR zur Amplifizierung des 5'-Bereiches der <i>PFPI</i> -Gensequenz	87
3.10	Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifizierung des 3'-Bereiches der <i>PFPI</i> -Gensequenz	89
3.11	Schematische Darstellung der <i>PFPI</i> -Genstruktur	89
3.12	Schematische Darstellung des Gerstengens HO05J24 sowie die Positionen der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide	91
3.13	Grafische Darstellung des pilzlichen Wachstums <i>in planta</i>	93
3.14	Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen sowie fotografische Dokumentation der Symptomausbildung nach Infektion der Gerstensorte Ingrid mit dem <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolat UK7	96
3.15	Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen sowie fotografische Dokumentation der Symptomausbildung nach Infektion der Gerstensorte Atlas mit dem <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolat UK7	97
3.16	Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen sowie fotografische Dokumentation der Symptomausbildung nach Infektion der Gerstensorte Atlas 46 mit dem <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolat UK7	98

3.17	Schematische Darstellung des kodierenden Bereiches des <i>NIP1</i> -Gens sowie Bindungsstellen der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide	100
3.18	Grafische Darstellung der relativen Expressionsraten von <i>PFPI</i> und <i>NIP1</i> bezogen auf <i>GPD in planta</i>	101-102
3.19	5'-untranslatierter Bereich der <i>PFPI</i> -Gensequenz mit putativen regulatorischen Elementen	104
3.20	Schematische Darstellungen der <i>PFPI</i> -Genstruktur und der für die Promotorfusion verwendeten Oligonukleotide sowie des Promotorfusionskonstrukts pJET1.2/blunt-P _{PFPI} ::eGfp	106
3.21	Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transformante UK7-pJET1.2/blunt-P _{PFPI} ::eGfp #49 und der Positivkontrolle UK7-P _{gpd} ::eGfp <i>ex planta</i>	107-108
3.22	Grafische Darstellung der GFP-Fluoreszenz der die Promotorfusion exprimierenden Transformaten UK7-pJET1.2/blunt-P _{PFPI} ::eGfp #22, #49 und #67 sowie der Positivkontrolle UK7-P _{gpd} ::eGfp	110
3.23	Hypothetische dreidimensionale Struktur der Epc-N-Domäne (Perry, 2006)	111
3.24	Domänenstruktur verschiedener Proteine mit Epc-N-Domäne (Perry, 2006)	112
3.25	Sequenzvergleich der Epc-N-Domänen von Pfp1 und anderen Vertretern der Proteinfamilie (modifiziert nach Perry, 2006)	114
3.26	Schematische Darstellung der identifizierten Strukturdomänen in der Aminosäuresequenz von Pfp1	115
3.27	Phylogramm auf Basis der Aminosäuresequenzvergleiche verschiedener Proteine bei denen eine Epc-N-Domäne identifiziert werden konnte	116
3.28	Schematische Darstellungen des für die amino-terminale Proteinfusion genutzten <i>PFPI</i> -5'-Fragmentes sowie des binären Vektorkonstrukts pPZPt8.10-Pfp1 _N ::eGfp	120
3.29	Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transformante UK7-Pfp1 _N ::eGfp #37 und der Positivkontrolle UK7-P _{gpd} ::eGfp <i>ex planta</i>	122
3.30	Schematische Darstellungen des für die carboxy-terminale Proteinfusion genutzten <i>PFPI</i> -3'-Fragmentes, sowie des binären Vektorkonstrukts pRcEGFP1-eGfp::Pfp1 _C	123

3.31	Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie DAPI-Färbung der Transformante UK7-eGfp::Pfp1 _C #1 und der Positivkontrolle UK7-P _{gpd} ::eGfp <i>ex planta</i>	125
3.32	Schematische Darstellung des binären Vektorkonstrukts pSS2(ble) (11063 bp)	127
3.33	Schematische Darstellung des binären Deletionsvektors pSS2(ble)- Δ PFPI (13389 bp)	128
3.34	Schematische Darstellungen der beiden möglichen Rekombinationsereignisse der Agrobacterium-vermittelten Transfektion von <i>R. commune</i> unter Verwendung des binären Deletionsvektorkonstrukts pSS2(ble)- Δ PFPI	129
3.35	Schematische Darstellungen der für die Mutanten-Analyse genutzten PCR sowie deren gelelektrophoretische Auftrennung	131
3.36	Grafische Darstellung der Vorversuche A bis C zur Optimierung der Protoplastierung von <i>R. commune</i> -Myzel	135
3.37	Aufnahmen der ersten und zweiten Selektionsplatten vor und nach Optimierung der Protoplasten-Transfektion	138-139
3.38	Schematische Darstellung des Prinzips der Fusions-PCR-Methode zur Konstruktion von Gen-Deletionskonstrukten	141
3.39	Schematische Darstellung der Amplifikationschritte zur Herstellung der PFPI-Deletionskonstrukte	142
3.40	Schematische Darstellungen sowie gelelektrophoretische Auftrennungen der Amplifikationsreaktionen zur Identifizierung der PFPI-Deletionsmutanten	144-145
3.41	Ergebnis der DNA-Hybridisierungen zur Verifizierung der PFPI-Deletionsmutanten	148-149
3.42	Schematische Darstellungen der Bindungsstellen der für die DNA-Hybridisierung verwendeten Sonden 1 und 2 sowie der BstBI-Restriktionsstellen im PFPI-Wildtyp-Gen und den Deletionskonstrukten I und II	150
3.43	Schematische Darstellungen der PCR zur Generierung der Sonde 2 (PFPI-E1) sowie der Vektor-Konstrukte pCR2.1- Δ PFPI-I bzw. -II)	151-152
3.44	Schematische Darstellungen der kodierenden Genabschnitte von α -TUB, PFPI und des Deletionskonstrukts I mit den vorhandenen Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide sowie der gelelektrophoretischen Auftrennung der entsprechenden Multiplex-PCR-Ansätze	154-155

3.45	Schematische Darstellung der Integrationsstelle des Deletionskonstrukts I nach homologer Rekombination der <i>PFPI</i> -Wildtyp-Sequenz	156
3.46	Schematische Darstellungen der kodierenden Genabschnitte von <i>GPD</i> , <i>PFPI</i> und des Deletionskonstrukts II mit den vorhandenen Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide sowie der gelelektrophoretischen Auftrennung der entsprechenden PCR-Ansätze	156-157
3.47	Darstellung des Verlaufs der Kultivierung von <i>R.-commune</i> -Isolaten auf Limabohnenagarplatten nach Reisolierung von suszeptiblen Gerstenpflanzen	158
3.48	Symptomausbildung auf Primärblättern der Gerstensorte Ingrid nach Tropfen-Infektionen mit dem <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolat UK7 sowie der vier Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 und -4	160-161
3.49	Limabohnenagarplatten der $\Delta PFPI$ -Mutanten und des Wildtyps UK7 von der Reisolierung bis zum zweiten Transfer	164-165
3.50	Symptomausbildung auf Primärblättern der Gerstensorte Ingrid nach Sprüh-Inokulation mit dem <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolat UK7 sowie der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 und -4	168-169
3.51	Symptomausbildung auf Gersten-Primärblättern nach Sprüh-Inokulation mit den <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten	170-171
3.52	Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen des <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolats UK7 und der <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten <i>in planta</i>	173-174
3.53	Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 <i>ex planta</i> (FRIES-Medium)	175-177
3.54	Wachstum der Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 auf Objektträgern mit Limabohnenagar	178
3.55	Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 <i>ex planta</i> (Limabohnenagar)	179-180
3.56	Grafische Darstellungen des pilzlichen Wachstums der <i>PFPI</i> -Deletionsmutanten sowie des Wildtyps UK7 <i>in planta</i>	182

3.57	Quantitative Auswertung der im Flüssigmedium durchgeführten Wachstumsversuche	184
3.58	Mikroskopische und fotografische Dokumentationen der mit Konidiosporensuspensionen der Deletionsmutanten und des Wildtyps beimpften Limabohnenagarplatten sowie quantitative Auswertung der jeweils ausgemessenen Myzelflächen	186-187
3.59	Keimende Konidiosporen der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyp-Isolats UK7 auf Limabohnenagar	189
3.60	Keimungsraten der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7	190
3.61	Keimhyphenanzahl der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7	191
3.62	Keimhyphenlängen der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7	192
3.63	Für die Klonierung des Komplementationsvektors amplifizierte Konstrukte	194
3.64	Komplementationsvektor pCR2.1-HPH-PFP1 sowie Kontrollvektor pCR2.1-HPH	195
3.65	Gelelektrophoretische Auftrennungen der PCR-Produkte zum Nachweis der Komplementation der Deletionsmutanten mit der <i>PFP1</i> -Wildtyp-Gensequenz	197-198
3.66	Gelelektrophoretische Auftrennung der semiquantitativen RT-PCR zum Nachweis der <i>PFP1</i> -Genexpression der Komplementationsmutanten	199-200
3.67	Relative <i>PFP1</i> -Expression in den Komplementationsmutanten $\Delta PFPI(-1, -3, \text{ bzw. } -4)-PFP1$	201
3.68	Symptomausprägung der Komplementationsmutanten nach Inokulation der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid	203-208
3.69	Mikroskopische Aufnahmen der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten <i>in planta</i>	210-211
3.70	Entwicklung der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten <i>ex planta</i>	212-213
Diskussion		
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse sowie der daraus resultierenden möglichen Funktionen für Pfp1	248

Anhang		
7.2.1.1	Nukleinsäuresequenzvergleich des durch 5'-RACE-PCR amplifizierten cDNA-Fragments mit der genomischen <i>PFPI</i> -Gensequenz	VII
7.2.1.2	Nukleinsäuresequenzvergleich des durch 3'-RACE-PCR amplifizierten cDNA-Fragments mit der genomischen <i>PFPI</i> -Gensequenz	VIII-XII
7.2.2.1	Aminosäuresequenzvergleich von Pfp1 mit homologen Proteinen anderer pilzlicher Vertreter	XIII-XVI
7.2.2.2	Aminosäuresequenzvergleich von Pfp1 und Pfp2	XVII-XVIII
7.2.2.3	Aminosäuresequenzvergleich der putativen PHD-Zink-Finger-Domäne von Pfp2 mit der Epc-N-Domäne von Pfp1	XIX
7.2.3	Positionen stromaufwärts der proteinkodierenden <i>PFPI</i> -Sequenz gelegener kurzer offener Leserahmen (uORFs)	XX
7.3.1.1	Schematische Darstellung des TA-Klonierungsvektors pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen)	XXIII
7.3.1.2	Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pJET1.2/blunt (MBI Fermentas)	XXIV
7.3.2.1	Schematische Darstellung des binären Vektors pPZP200 (Hajdukiewicz, 1994)	XXIV
7.3.2.2	Schematische Darstellung des binären Vektorkonstrukts pRcEGFP1	XXV
7.3.2.3	Schematische Darstellung des binären Vektors pPZPt8.10 (Gardiner & Howlett, 2004)	XXV
7.3.3.1	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAN7-1 (Punt, 1987)	XXVI
7.3.3.2	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAN8-1 (Mattern, 1988)	XXVI
7.3.3.3	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAB8-1	XXVII
7.3.3.4	Schematische Darstellung des REMI-Komplementationsvektors pAN8-1-WT16bis-WT17	XXVII
7.4.1.1	Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pPZPt8.10-Pfp1 _N ::eGfp sowie dessen Restriktion	XXXI
7.4.1.2	Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pRcEGFP1-eGfp::Pfp1 _C sowie dessen Restriktion	XXXII

7.4.2	Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pJET2.1/blunt-P _{PFP1} ::eGfp sowie dessen Restriktion	XXXIII
7.4.3	Schematische Darstellung der Klonierung des binären Vektor-Konstrukts pSS2(ble) sowie dessen Restriktion	XXXIV
7.4.4	Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pCR2.1-HPH-PFP1 sowie dessen Restriktion	XXXV
7.5.1	Gelelektrophoretische Auftrennungen der restrigierten genomischen DNA sowie der Vektor-Kontrollen	XXXVIII
7.5.2.1	Gelelektrophoretische Auftrennungen der Einzelfragmente und des Deletionsfusionskonstruktes I sowie dessen Verifizierung durch PCR	XXXIX-XL
7.5.2.2	Gelelektrophoretische Auftrennungen der Einzelfragmente und des Deletionsfusionskonstruktes II sowie dessen Verifizierung durch Restriktion	XLI-XLII
7.5.3	Gelelektrophoretische Auftrennungen der restrigierten genomischen DNA sowie der Sonden-DNA und Vektor-Kontrollen	XLIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle	Bezeichnung	Seite
Material und Methoden		
2.1	Zusammenstellung der verwendeten Gerstensorten sowie deren Status gegenüber <i>R.-commune</i> -Wildtyp-Isolat UK7	27
2.2	Zusammenstellung der genutzten Geräte, Apparaturen und Verbrauchsgegenstände	39-43
2.3	Konzentrationsangaben der für die Anzuchtmedien verwendeten Antibiotika und anderer Zusätze	46
2.4	Zusammenstellung der verwendeten Analyse-Software	69
Ergebnisse		
3.1	Zusammenstellung und Position der <i>in silico</i> identifizierten putativen Promotorelemente des 5'-untranslatierten Bereiches der <i>PFP1</i> -Gensequenz	105
3.2	Zusammenfassung der durchgeführten <i>in-silico</i> -Analysen zur subzellulären Lokalisierung des Pfp1-Proteins	117

3.3	Zusammenfassung der <i>in-silico</i> -Analysen zur vorhergesagten nukleären bzw. mitochondrialen Lokalisierung des Pfp1-Proteins sowie die schematische Darstellung der Positionen der Lokalisierungssignale	118-119
3.4	Zusammenfassung und Auswertung der Agrobakterium-vermittelten Transfektion von <i>R. commune</i> mit dem binärem Deletionsvektor pSS2(ble)- Δ PFPI	133
3.5	Zusammenstellung der jeweils geänderten Bedingungen der Vorversuche A bis C zur Protoplastierung von <i>R. commune</i> -Myzel	136
3.6	Zusammenfassung und Auswertung des Optimierungsversuchs der Protoplasten-Transfektion	139
3.7	Zusammenfassung und Auswertung der Protoplasten-Transfektion mittels Fusions-PCR-Konstrukt zur Generierung der PFPI-Deletionsmutanten von <i>R. commune</i>	143
Anhang		
7.1	Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide sowie deren Nukleinsäuresequenz	I-IV

Mathematische Formeln

Formel	Bezeichnung	Seite
Material und Methoden		
2.1	Formel zur Berechnung der Sporenkonzentration pro ml	47
2.2	Formel zur Berechnung der für die Ligationsreaktionen einzusetzenden Menge an Plasmid- bzw. <i>Insert</i> -DNA	65

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>ApaI</i>	<i>Acetobacter pasteurianus</i> I
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Avr</i>	Avirulenz
<i>BamHI</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HI
blast	<i>basic local alignment search tool</i> (Online-Programm für Sequenzvergleiche)
bp	<i>base pairs</i> (englisch für „Basenpaare“)
<i>BstBI</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> B225 I
<i>BstEII</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i> ET II
°C	Grad Celsius
cAMP	<i>cyclic AMP</i> (englisch für „zyklisches Adenosinmonophosphat“)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (englisch für „komplementäre DNA“)
cm	<i>centimeter</i> (englisch für „Zentimeter“)
<i>cv.</i>	<i>cultivar</i> (englisch für „Sorte“)
d	<i>days</i> (englisch für „Tage“)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (englisch für „Desoxyribonukleinsäure“)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	<i>days post inoculation</i> (englisch für „Tage nach der Inokulation“)
dT	Desoxythymidin
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RI
eGfp	<i>enhanced green fluorescent protein</i> (verstärkte Version des grün fluoreszierenden Proteins; Thastrup <i>et al.</i> , 1995)
EMS	Ethylmethansulfonat
EST	<i>expressed sequence tag</i> (englisch für „transkribierte Nukleotidsequenzen“)
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lateinisch für „und andere“)
g	Gramm
h	<i>hours</i> (englisch für „Stunden“)
H ⁺	einfach positiv geladenes Wasserstoff-Ion; Proton
J	Joule
K ⁺	einfach positiv geladenes Kalium-Ion
kb	<i>kilo base pairs</i> (englisch für „Kilobasenpaare“)
kDa	Kilodalton

kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
M	Molar
Mg ²⁺	zweifach positiv geladenes Magnesium-Ion
min	<i>minute</i> (englisch für „Minute“)
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MPa	Megapascal
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (englisch für „Boten-RNA“)
ng	Nanogramm
<i>NheI</i>	<i>Neisseria mucosa heidelbergensis I</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD	optische Dichte
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (englisch für „Polymerase-Kettenreaktion“)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHD	<i>plant homeodomain</i> (englische Bezeichnung für eine erstmals in Pflanzen entdeckte Protein-Homöodomäne)
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii I</i>
<i>pv.</i>	<i>pathovar</i> (englisch für Isolat eines Pathogens)
RACE-PCR	<i>rapid amplification of cDNA-ends with PCR</i> (englische Bezeichnung für spezielle PCR-Methode zur Amplifizierung von cDNA-Enden)
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (englisch für Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus; bezeichnet Restriktionsfragmentmuster der unterschiedlichen DNA-Sequenzen homologer Chromosomen)
rpm	<i>rounds per minute</i> (englisch für „Umdrehungen pro Minute“)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (englisch für „Ribonukleinsäure“)
RNase	Ribonuklease
<i>RRS1</i>	<i>resistance to Rhynchosporium secalis</i> (Bezeichnung des Resistenzlokus in Gerste)
RT	Raumtemperatur
<i>SacI</i>	<i>Streptomyces achromogenes I</i>
<i>SacII</i>	<i>Streptomyces achromogenes II</i>
<i>SalI</i>	<i>Streptomyces albus I</i>
sec	<i>second</i> (englisch für „Sekunde“)

<i>SpeI</i>	<i>Sphaerotilus natans</i> I
spp.	<i>Spezies plural</i> (lateinisch für Arten in Mehrzahl; Bezeichnung für mehrere Arten einer Gattung)
TAIL-PCR	<i>thermal asymmetric interlaced PCR</i> (englische Bezeichnung für eine spezielle PCR-Methode zur Identifizierung von DNA-Sequenzen)
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (englisch für „Enzymeinheit“)
UTR	<i>untranslated region</i> (englisch für „untranslatierter Bereich“)
UV	ultraviolett
V	Volt
(v/v)	<i>volume per volume</i> (englisch für „Volumen pro Volumen“)
(w/v)	<i>weight per volume</i> (englisch für „Gewicht pro Volumen“)
<i>XbaI</i>	<i>Xanthomonas campestris pv. badrii</i> I
xg	~faches der Erdbeschleunigung g = relative Zentrifugalbeschleunigung (9,81ms ⁻¹)
<i>XhoI</i>	<i>Xanthomonas holcicola</i> I
μF	Microfarad
μg	Microgramm
μl	Microliter
μm	Micrometer
μM	Micromolar

Anmerkungen

Abkürzungen, die im Text näher erläutert sind, werden nicht in diesem Verzeichnis aufgeführt.

Genbezeichnungen sowie aus dem Englischen und dem Latein übernommene Begriffe werden in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

Die Begriffe „Transformation“ und „Transfektion“ werden in dieser Arbeit ihrer ursprünglichen Definition zufolge verwendet. „Transformation“ bezeichnet dabei das Einbringen von Fremd-DNA in prokaryotische, „Transfektion“ in eukaryotische Organismen.

1. Einleitung

1.1 Pflanzen und ihre Umgebung

Pflanzen ernähren sich autotroph. Die zur Assimilation des Kohlenstoffs erforderliche Energie entnehmen sie allein dem Sonnenlicht (Jacob *et al.*, 1994). Deshalb brauchen sie nicht, wie die tierischen Lebewesen, die sich ihre Nahrung suchen müssen, beweglich zu sein. Pflanzen sind sessil, das heißt ortsfest eingewurzelt. Auf Grund dieser Lebensweise sind sie in ihrer natürlichen Umgebung jedoch vielen Umweltfaktoren ausgesetzt. Diese können abiotischer und biotischer Natur sein. Als abiotische Faktoren bezeichnet man alle Umweltfaktoren, an denen Lebewesen nicht erkennbar beteiligt sind. Beispiele sind Salinität, Trockenheit, hohe Sonneneinstrahlung, Kälte, Wasser oder verändertes Mineralstoffangebot. Biotische Faktoren gehen von anderen Organismen in der Nähe der Pflanze aus. Dies sind zum Beispiel Phytopathogene, Herbivore, Symbionten und benachbarte Pflanzen, die am Standort um vorhandene Nährstoffe und Platz konkurrieren können (Schlee, 1986).

Durch diese Umweltfaktoren wird das Leben der Pflanze nachhaltig beeinflusst. Es kommt zu verändertem Wachstum, beschleunigten oder verlangsamten Reproduktionsphasen und abweichender Organdifferenzierung. Jede Pflanze besitzt ein physiologisches Optimum, in welchem alle Umweltfaktoren in der von der Pflanze tolerierten Norm vorliegen und ihre Lebensprozesse weitgehend unbeeinflusst ablaufen können. Liegen die Faktoren mehr oder weniger außerhalb dieses Toleranzbereiches der Pflanze können sie Stress auslösen. Andauernder Stress kann zunächst eine Destabilisierung des pflanzlichen Organismus bewirken. In gewissem Maße kann sich die Pflanze jedoch den gegebenen Bedingungen anpassen. Die Toleranz der Pflanze nimmt als Reaktion auf die Stressbedingungen zu. Die Pflanze akklimatisiert sich, das heißt sie wird abgehärtet gegenüber einem zuvor auf sie einwirkenden Stressor. Von der Akklimatisierung unterscheidet man den Prozess der Anpassung. Dieser ist genetisch manifestiert und wird durch Selektion über viele Generationen hinweg erworben (Schlee, 1986).

Am ehesten macht sich physiologischer Stress bei unseren Kultur- und Nutzpflanzen bemerkbar. Hier können durch andauernde ungünstige Umweltfaktoren erhebliche Ertragsminderungen entstehen. Dabei spielt vor allem biotischer Stress eine Rolle. Die moderne Landwirtschaft bietet für die Vermehrung von Pflanzenschädlingen große Vorteile. Dies liegt speziell am meist großflächigen Anbau zum Teil nicht-heimischer, genetisch einheitlicher Pflanzen und der damit verbundenen gleichzeitigen Reife aller Pflanzen. Verbesserungsmöglichkeiten in der Landwirtschaft bestehen in einer

Abwechslung der Kulturen und in einer Mischung der angebauten Sorten auf den Feldern. Dies bringt jedoch nicht immer die gewünschten Erfolge, so dass jährlich immer noch erhebliche Mengen an Pestiziden auf unseren Äckern zum Einsatz kommen. Um diesem Umstand entgegenzuwirken, bietet die Grundlagenforschung an pflanzlichen Organismen gute Ansatzmöglichkeiten.

Die Phytopathologie beschäftigt sich mit den Krankheiten und Beschädigungen der höheren Pflanzen und ihren Ursachen (Börner, 1971) sowie den Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und den sie befallenden Mikroorganismen. Immer wichtiger wird dabei das Verständnis der Kommunikation zwischen den beiden interagierenden Partnern auf molekularer Ebene. Dies offenbart neue Erkenntnisse über die genetischen Aspekte, die dazu führen, dass eine Pflanze von Mikroorganismen befallen wird und schließlich abstirbt, oder sich aber erfolgreich gegen den Angriff wehren kann. Versteht man diese Interaktionen richtig, wird es in Zukunft einfacher, Pflanzen resistenter gegenüber bestimmten sie befallenden Mikroorganismen zu machen.

1.2 Phytopathogene Pilze

Die Fähigkeit einer Spezies von Mikroorganismen, in einem Makroorganismus Krankheit zu erzeugen, nennt man Pathogenität (Bhakdi *et al.*, 2009). Die dabei agierenden Mikroorganismen sind Pathogene. Sie sind sowohl im tierischen/menschlichen Bereich als auch im Pflanzenreich weit verbreitet.

Phytopathogene sind z.B. Pilze, Oomyceten, Viren, Nematoden und Bakterien. Während Pilze, Oomyceten und Nematoden die Pflanze meist aktiv penetrieren und sie als Ekto- oder Endoparasiten (inter- oder intrazellulär) besiedeln können, kommen Bakterien und Viren meist passiv oder durch Verwundung in den Organismus und leben vorwiegend als Endoparasiten inter- sowie intrazellulär. Die Verbreitung pathogener Mikroorganismen erfolgt auf unterschiedliche Weisen. Beispielsweise werden Pilzsporen bevorzugt durch Wind und Regentropfen verbreitet und gelangen so von Pflanze zu Pflanze. Viren werden oft durch eine vorher infizierte Pflanze über das Saatgut in die nächste Generation weiterverbreitet oder auch durch saugende Insekten, die als Virenvektoren bezeichnet werden. Die Symptome, die Pathogene an den befallenen Pflanzen auslösen, sind sehr vielfältig. Neben Wurzel- und Fruchtfäule können oft auch Blattwelke, Gallenbildung und Blatt- und Fruchtflecken festgestellt werden. Problematisch ist dabei die Tatsache, dass oftmals verschiedene Krankheitserreger ähnliche Symptome produzieren, so dass es eines geübten Auges bedarf, Pflanzenkrankheit und Erreger eindeutig zu identifizieren (Börner, 1971).

Pilzliche Krankheitserreger sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Wie alle anderen Pflanzenpathogene auch ernähren sich Pilze heterotroph auf Kosten der autotrophen Pflanze (Börner, 1971). Durch die Fähigkeit zur Photosynthese kann die Pflanze die Sonnenenergie nutzen und sie in organischen Kohlenstoffverbindungen speichern. Diese und andere Nährstoffe werden vom Pathogen abgezweigt und in dessen eigenen Ernährungskreislauf eingespeist. Zudem sind viele Pilzarten in der Lage den Metabolismus der Wirtspflanze zu ihren Gunsten zu verändern.

Phytopathogene Pilze können nicht nur die Blätter, sondern auch Sprosse, Wurzeln und Fruchtstände ihrer Wirtspflanzen infizieren. Einen entscheidenden Schritt bei der Besiedelung einer Pflanze stellt die Penetration derselben durch den pilzlichen Erreger dar. Um die natürliche Barriere der pflanzlichen Oberfläche (Kutikula) zu durchbrechen, haben phytopathogene Pilze verschiedene Strategien entwickelt. Ein großer Vorteil vieler Pilzarten ist das sofortige Anheften ihrer Sporen an der pflanzlichen Oberfläche. Dies geschieht zum einen passiv durch hydrophobe Interaktionen zwischen Sporen und Kutikula, zum anderen durch die Sekretion eines den Keimschlauch und Teile der Kutikula umhüllenden Films, der meist Proteine, Glykoproteine und Kohlenhydratverbindungen enthält und für die Adhäsion der pilzlichen Strukturen an der pflanzlichen Oberfläche verantwortlich ist. Nach Ausbildung eines Keimschlauchs durchbrechen einige Pilze die Pflanze durch den Einsatz hydrolytischer Enzyme (Kutinasen, Cellulasen, Polygalakturonasen, Pektin-Lyasen; z.B. *Fusarium* spp., *Ustilago maydis*). Andere penetrieren die pflanzliche Oberfläche durch die Ausbildung spezieller Organe, der sogenannten Appressorien (z.B. *Colletotrichum* spp., *Magnaporthe grisea*). Dabei handelt es sich meist um runde, melanisierte Strukturen, die durch die Einlagerung bestimmter Osmotika und dadurch hervorgerufene Wasser-Einlagerungen einen enormen Turgor-Druck aufbauen können (z.B. *M. grisea* 8 MPa) und somit die pflanzliche Oberfläche durchbrechen können (Mendgen *et al.*, 1996).

Die initialen Schritte des Infektionsprozesses phytopathogener Pilze (Sporen-Adhäsion, enzymatische Lyse der pflanzlichen Oberfläche bzw. Appressorien-Ausbildung und Penetration) unterscheiden sich nur geringfügig zwischen den einzelnen Arten. Große Unterschiede ergeben sich jedoch bei der Ausprägung der Lebens- und Ernährungsweisen der Pflanzenpathogene (Mendgen & Hahn, 2002).

Bei phytopathogenen Pilzen unterscheidet man zwischen Biotrophie, Nekrotrophie und Hemi-Biotrophie. Bei der biotrophen Ernährungsweise gewinnt der Pilz bis zur Vollendung seines Entwicklungszyklus die erforderlichen Nährstoffe aus lebendem Pflanzenmaterial. Er ist somit vollständig von seiner Wirtspflanze abhängig (Divon *et al.*, 2007). Biotrophe Pilze sind obligat (Scott, 1972), zeigen deshalb häufig eine hohe Wirtsspezifität und bilden meist spezielle Infektionsstrukturen (Haustorien) aus, um an die Nährstoffe der Wirtspflanze zu gelangen (Mendgen & Hahn, 2002). Dabei beeinflussen sie den Stoffwechsel der Pflanze zu ihren Gunsten (Panstruga, 2003).

Beispiele biotropher Pilze sind echter und falscher Mehltau und viele Rostpilze wie z.B. *Uromyces* spp.

Bei der Nekrotrophie wird lebendes pflanzliches Gewebe zunächst abgetötet und danach als Nahrungsquelle genutzt. Nekrotrophe Pilze töten ihre Wirtspflanzen durch die Produktion von toxischen Substanzen (Farrar, 1984; Walton, 1996) und lytischen Enzymen (Cooper, 1984; Kolattukudy, 1985; Lewis, 1973; Schafer, 1994). Dabei können die Toxine gegen eine einzige oder nur einige wenige Wirtspflanzen gerichtet sein. Das Pathogen zeigt dabei eine eingeschränkte Wirtsspezifität. Das produzierte Toxin wird als wirtsselektiv bezeichnet (*host-selective toxin*, HST). Viele Pilz-Toxine zeigen jedoch keine Wirtsspezifität, so dass nekrotroph lebende Pilze auch mehrere Pflanzenarten befallen können. Beispiele sind *Sclerotinia sclerotiorum* (Erreger der Weißstängeligkeit z.B. an Raps und Bohne) und *Botrytis cinerea* (Erreger der Grauschimmelfäule z.B. an Wein und Tomate) (van Kan, 2006).

Als hemi-biotrophe Organismen werden Pilze bezeichnet, die bei Infektionsbeginn zunächst eine biotrophe Phase durchleben. Die Wirtszellen bleiben dabei am Leben. Erst nachdem sich der Pilz in der Pflanze ausgebreitet hat, beginnt er sekundäre Hyphen auszubilden, die häufig eine abweichende Morphologie zu den primären Hyphen zeigen (Perfect & Green, 2001). Der Wechsel zur nekrotrophen Phase geht häufig mit der Produktion Zellwand-abbauender Enzyme einher, was schließlich zum Kollaps der befallenen Zellschichten und zum Tod der Wirtspflanze führt. Zu den Beispielen hemi-biotropher Pilze gehören die *Colletotrichum*-Arten (Mendgen & Hahn, 2002).

Neben dieser festen Klassifizierung sind allerdings auch Pilzarten bekannt, die Merkmale mehrerer oder aller Gruppierungen vereinen. So werden z.B. *Cladosporium fulvum* und *Magnaporthe grisea* in der Literatur zugleich als biotroph und hemi-biotroph bzw. hemi-biotroph und nekrotroph bezeichnet (Oliver & Ipcho, 2004).

1.3 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Trotz der zahlreichen bekannten Phytopathogene und der von ihnen ausgelösten Krankheiten, bleibt der Befall und die Besiedelung eines Wirtes eher die Ausnahme (Knogge, 1998). Das bedeutet, dass eine Pflanze nur von einigen wenigen Pathogenen infiziert werden kann. Im Normalfall gelingt es der Pflanze, durch die evolutionäre Entwicklung unterschiedlicher Resistenzmechanismen einer Kolonisierung durch Mikroorganismen erfolgreich entgegenzuwirken (Mysore & Ryu, 2004). Dabei unterscheidet man zwischen der Nichtwirts- und der Wirtsresistenz.

Erstere wird auch als Basis-Inkompatibilität bezeichnet und umfasst sowohl präformierte, passive als auch induzierte Abwehrmechanismen der Pflanze. Unter passiven Mechanismen werden alle physikalischen und biochemischen Eigenschaften

zusammengefasst, die bei gesunden Pflanzen bereits vor der Einwirkung von abiotischem und biotischem Stress ausgebildet sind (Schlösser, 1997). Dazu gehören beispielsweise natürliche Strukturen und Barrieren der pflanzlichen Oberfläche wie Stacheln, Dornen, Haare, die Epidermis mit der hydrophoben Kutikula sowie die Rhizodermis der Wurzel (Sitte & Strasburger, 1999). Präformierte biochemische Barrieren sind in erster Linie Enzyminhibitoren und antimikrobiell wirkende Sekundärmetabolite sowie teilweise deren Vorstufen (Phytoantizipine). Die Inhibitoren umfassen verschiedene pflanzliche Proteine, die gegen die von Phytopathogenen produzierten Zellwand-abbauenden Enzyme gerichtet sind. Sie liegen in der pflanzlichen Zellwand vor, wo sie an das Substrat gebunden sind, zu dessen Schutz sie vorgesehen sind. Auch sind sie immer spezifisch gegen Zellwand-degradierende Enzyme der pathogenen Mikroorganismen gerichtet, niemals gegen die der Pflanze, die sie produziert. Ein bekanntes Beispiel umfasst eine Gruppe Polygalakturonasen-inhibierender Enzyme (PGIPs). Sie wurden bereits vor 40 Jahren identifiziert und sind seitdem ubiquitär im Pflanzenreich gefunden worden. Sie wirken spezifisch gegen pilzliche Polygalakturonasen, inhibieren jedoch nicht diejenigen der Pflanzen oder von Bakterien (Lagaert *et al.*, 2009). Phytoantizipine sind niedermolekulare, antimikrobielle Substanzen, die hauptsächlich in der pflanzlichen Vakuole gespeichert sind und erst durch die Zerstörung der Zellen freigesetzt werden (VanEtten *et al.*, 1994). Sie bilden eine strukturell sehr heterogene Klasse. Bekannte Vertreter dieser Substanzen sind cyanogene Glykoside, Glukosinolate, Phenole und Saponine mit nachgewiesener antimykotischer Wirkung (Osbourn, 1996, 1999).

Die induzierten, aktiven Mechanismen unterscheiden sich von den präformierten, passiven dadurch, dass ihrer Aktivierung der Angriff eines Pathogens vorausgeht. Zwischen Pflanze und Pathogen entwickelt sich ein Erkennungsprozess, der sich auf bestimmte, vom Pathogen freigesetzte Moleküle begründet. Diese werden als PAMPs bzw. MAMPs (*pathogen- / microbe-associated molecular pattern*) bezeichnet. Sie sind meistens Oberflächen-exponiert und hoch konserviert (Nürnberger & Lipka, 2005; Bent & Mackey, 2007; Sanabria *et al.*, 2008). Zu den bekanntesten Beispielen gehören der Elongationsfaktor EF-Tu und das Flagellin Gram-negativer Bakterien sowie pilzliches Chitin. PAMPs werden durch bestimmte Rezeptoren in der pflanzlichen Membran erkannt (PRRs – *pattern recognition receptors*) und lösen so die Abwehrantwort der Pflanze aus (Ingle *et al.*, 2006; de Wit, 2007; Postel & Kemmerling, 2009). Die PAMP-induzierte Abwehr ist sehr vielschichtig und lässt sich zeitlich in frühe und späte Reaktionen unterteilen. Zu den frühen Mechanismen gehören beispielsweise die schnelle extrazelluläre Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (*oxidative burst*) (Wojtaszek, 1997) und die Ausbildung von Zellwand-Auflagerungen aus Kallose (β -1,3-Glukan), Phenolen und Proteinen (Papillen) an Penetrationsstellen des Pathogens (Heitefuß, 1997). Den späten Abwehrreaktionen geht häufig eine Genaktivierung voraus, so dass diese erst Stunden oder Tage nach dem Pathogenbefall greifen. Dazu gehört beispielsweise die Synthese von Phytoalexinen, welche ebenfalls (wie die präformiert

vorliegenden Phytoantizipine) niedermolekulare, antimikrobiell wirkende, strukturell sehr unterschiedliche Substanzen umfassen. Beispiele sind Phenylpropane wie Cumarine und Isoflavone sowie Terpene und zahlreiche Fettsäure-Derivate (Ebel, 1986; Smith, 1996). Ein weiterer Abwehrmechanismus ist die Hypersensitive Reaktion (HR). Sie ist gekennzeichnet durch ein schnelles und lokales Absterben der pflanzlichen Zellen am Infektionsort und ist eine Form des programmierten Zelltodes (*programmed cell death*, PCD) (Greenberg *et al.*, 1994, Greenberg, 1997). Dadurch wird die weitere Ausbreitung der Krankheit in der Pflanze unterbunden. Makroskopisch sind die abgestorbenen Zellen durch braune nekrotische Flecken zu erkennen, die eine oder mehrere Zellen des Wirtes umfassen. Sie sind scharf vom gesunden Gewebe abgegrenzt (Heath, 2000). Ein letzter, sehr interessanter Aspekt der Nichtwirtsresistenz umfasst den Prozess der systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR). Sie ähnelt der Immunisierung bei Tieren und beschreibt einen erhöhten Resistenzzustand, der sich über die gesamte Pflanze nach vorangegangener Infektion eines Teilbereichs derselben manifestiert. Dies wird meistens durch den Transport eines mobilen Signals hervorgerufen (Akkumulation von Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen) und endet in der Stimulation bestimmter Abwehrmechanismen in der gesamten Pflanze (z.B. Akkumulation von Phytoalexinen; Bildung von PR-Proteinen [*pathogenesis-related proteins*]). Damit kann die SAR länger anhaltende Resistenz des pflanzlichen Organismus gegen verschiedene pathogene Organismen bewirken (Grant & Lamb, 2006). Zusammengenommen bilden sämtliche oben erwähnten Mechanismen der induzierten Abwehr eine Basalresistenz der Pflanze gegen ein unspezifisches Pathogen. Sie wird nach neueren Modellen auch als PAMP-vermittelte Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI; Abb. 1.1) bezeichnet.

Eine Pflanze wird zum Wirt für ein Pathogen, wenn dieses die pflanzlichen Abwehrmechanismen umgehen kann. Dies geschah vermutlich im Laufe der gemeinsamen Evolution der Pflanzen und pathogenen Mikroorganismen durch die Entwicklung von bestimmten Effektor-Proteinen seitens der Pathogene. Diese greifen in die basalen Abwehrmechanismen der Pflanze ein und schwächen oder unterdrücken sie soweit, dass die Basis-Inkompatibilität durchbrochen wird und eine kompatible Interaktion zwischen Wirt und Pathogen stattfinden kann. Mit anderen Worten: die Pflanze erkrankt. Man bezeichnet diese Entwicklung als Effektor-vermittelte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS; Abb. 1.1). Sie manifestiert sich auf der taxonomischen Ebene der Art. Um dieser Basis-Kompatibilität zu entgehen, entwickelten bestimmte Ökotypen unter den Wirtspflanzen sogenannte Resistenzgene (R-Gene). Die Produkte dieser Gene „erkennen“ spezifisch die vom Pathogen gebildeten Effektor-Proteine. Dies führt zu einer Rassen/Sorten-spezifischen Resistenz, auch Wirtsresistenz genannt. Die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen wird somit inkompatibel. Man bezeichnet diesen Vorgang als Effektor-vermittelte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI; Abb. 1.1). Die genetische Grundlage dieser Betrachtung bildet die Gen-für-Gen-Hypothese (Flor, 1955, 1971). Harold H. Flor

postulierte seinerzeit, dass die Ausbildung einer inkompatiblen Interaktion zwischen Wirtspflanze und Pathogen durch das Vorhandensein eines sich ergänzenden Genpaares vermittelt wird. Eine Pflanze ist demzufolge nur dann in der Lage wirtsspezifische Resistenz zu entwickeln, wenn sie Träger eines Resistenzgens (R-Gen) ist, dessen Produkt das des korrespondierenden Avirulenzgens (Avr-Gen) im Pathogen erkennt. Bis heute wird intensiv an den molekularen Mechanismen geforscht, die dieser Interaktion zugrunde liegen. Aus Bakterien, Pilzen und Viren konnten eine Reihe von Avirulenz-Proteinen isoliert werden, welche nicht sehr homolog sind und unterschiedlichste biochemische Funktionen besitzen (Nimchuk *et al.*, 2001). Besonders im Bereich pilzlicher Pathogene konnten eine Vielzahl solcher Effektor-Proteine charakterisiert werden. Bekannte und gut untersuchte Beispiele der Pflanze-Pathogen-Interaktionen sind die Systeme *Cladosporium fulvum*-Tomate und *Magnaporthe grisea*-Reis (Knogge, 1996).

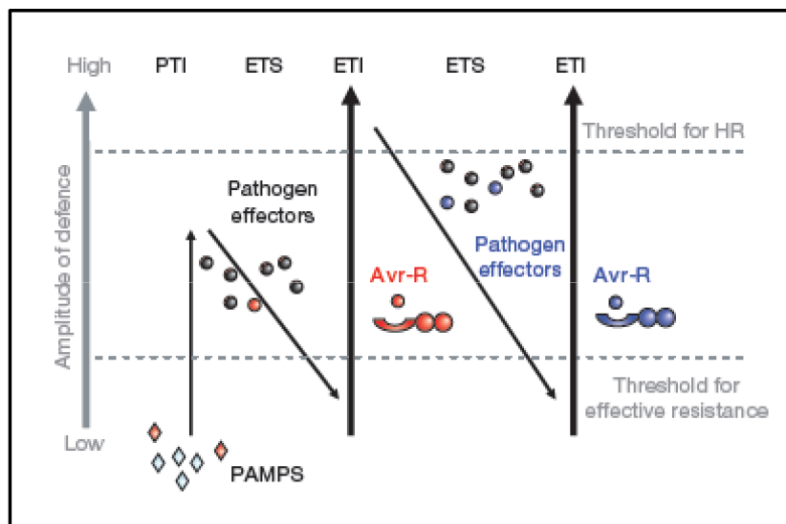


Abbildung 1.1: „Zick-Zack-Modell“ nach Jones und Dangl (2006). Die Abbildung gibt die evolutionäre Entwicklung des pflanzlichen Immunsystems im Zusammenhang mit Pathogen-Effektoren wieder. Nähere Erklärungen siehe Text.

1.4 Das Pathosystem *Hordeum vulgare* L. – *Rhynchosporium commune*

1.4.1 *Hordeum vulgare* L.

Die Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist eine unserer ältesten und wichtigsten Kulturpflanzen. Erste Nachweise zum Gerstenanbau lassen sich bis 10500 v. Chr. zurückdatieren. Ihre Ursprungsgebiete sind der Vordere Orient und die östliche Balkanregion. Bereits 7000 v. Chr. begann man hier mit der gezielten Zuchtauswahl. In Mitteleuropa wird sie seit der Jungsteinzeit (5500 v. Chr.) angebaut (i.m.a e.V., 2004; www.ima-agrar.de).

Gerste ist einjährig und gehört zur Familie der Süßgräser (*Poaceae*). Ihr wichtigstes Merkmal sind die mit langen Grannen versehenen ährigen Gesamtblütenstände, die zwei- oder mehrzeilig ausgebildet sein können. Zweizeilige Gerstensorten sind überwiegend Sommergersten. Sie werden im Frühjahr gesät und benötigen ca. 100 Tage bis zur Reife. Mehrzeilige Gerstensorten (vier- und sechszeilig) sind Wintergersten und benötigen eine Vernalisation zum Schossen. Sie werden deshalb im September gesät. Die feuchte Witterung im Winterhalbjahr und die längere Zeitspanne auf dem Feld (ca. 270 bis 300 Tage) begünstigen das Wachstum. Die Erträge und Nährstoffgehalte sind somit höher als bei den Sommergerstensorten.

Weltweit ist Gerste neben Reis, Weizen und Mais die wichtigste Getreideart. Auf über 30 Prozent der landwirtschaftlichen Nutzflächen in Deutschland wird derzeit Gerste angebaut. Mit durchschnittlich 12 Mio. Tonnen pro Jahr gehört Deutschland zu den größten Gerstenproduzenten (FAO - FAOSTAT, 2009; www.fao.org).

Der hohe Stellenwert der Gerste als Nutzpflanze wird zum einen durch die vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten für dieses Getreide begründet. Gerstenkörner werden zu Brot verbacken oder als Graupen (polierte Gerstenkörner) in Suppen und anderen Gerichten benutzt. Eiweißreiche Sorten (Wintergersten) werden als Viehfutter genutzt, Heu und Stroh in der Tierhaltung. Nicht zuletzt wird Gerste zur Malzherstellung verwendet, welches man zum Bierbrauen sowie zu Herstellung von Malzkaffee benötigt.

Zum anderen ist Gerste ein sehr widerstandsfähiges Getreide, das sich gut an veränderte Umweltbedingungen wie Trockenheit, Frost und Salinität des Bodens anpassen kann. Deshalb ist Gerstenanbau auch noch in Gegenden mit extremen Bedingungen möglich und bietet ausreichende Erträge.

1.4.2 *Rhynchosporium commune*

Der phytopathogene Pilz *Rhynchosporium* ist der Erreger der Blattfleckenkrankheit oder Rhynchosporiose mehrerer Getreide- und Grasarten. Die Krankheit ist weltweit verbreitet (Anon, 1962), tritt aber bevorzugt in kühleren Gebieten mit feuchten Wintern auf (Linde *et al.*, 2003). Bisher wurden generell zwei Arten des Pilzes unterschieden, zum einen die Spezies *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis, die Gerste, Roggen, Triticale und andere Süßgräser der Gattungen *Hordeum*, *Agropyron*, *Bromus* und *Lolium* infiziert (Caldwell, 1937; Shipton, 1974; Welty & Metzger, 1996), zum anderen *Rhynchosporium orthosporum*, welche von der Süßgrasart *Dactylis glomerata* isoliert wurde und sich morphologisch von *R. secalis* durch das Fehlen der typischen gebogenen Form der Sporen unterscheidet (Caldwell, 1937).

Jüngste Untersuchungen mehrerer *R.-secalis*-Isolate von Roggen, Gerste und Triticale sowie einiger Grasarten (*Agropyron* spp., *Bromus diandrus* und *Hordeum* spp.) ergaben jedoch eine Aufspaltung der monophyletischen Gruppen in drei verschiedene Arten bezüglich ihrer Wirtspflanzen. Phylogenetische Analysen von DNA-Sequenzen sowie

PCR-RFLP-Methoden zeigten, dass neben dem Roggen-Isolat *Rhynchosporium secalis* noch zwei andere, eigene *Rhynchosporium*-Arten unterschieden werden müssen. Dabei infiziert *Rhynchosporium commune* ausschließlich Kulturgerste und andere *Hordeum*-Arten sowie *Bromus diandrus*. *Rhynchosporium agropyri* infiziert verschiedene Arten des Süßgrases *Agropyron* (Zaffarano *et al.*, 2010). Die Gattung *Rhynchosporium* umfasst damit also vier, statt der zuvor bekannten zwei Arten.

Der Befall der Gerste durch *R. commune* ist von besonderer ökonomischer Bedeutung. Jährlich können ein bis zehn Prozent, in Abhängigkeit von den Witterungsbedingungen aber auch bis zu 40 Prozent, der Ernteausfälle auf die Ausbreitung der Blattfleckenkrankheit zurückgeführt werden (James *et al.*, 1968; Shipton *et al.*, 1974).

Symptomatisch ist eine Infektion mit *R. commune* gut an den Blättern der befallenen Pflanzen zu erkennen. Dabei bilden sich zunächst graue, wässrige Läsionen auf den Blattspreiten aus, die zunehmend austrocknen. Vereinzelt behalten sie in diesem Stadium ihre grüne Farbe, während sich der Rest des Blattes gelblich verfärbt. Häufiger entwickeln sich die Flecken jedoch zu langgestreckten, ovalen nekrotischen Läsionen, die von der Mitte her austrocknen und durch dunkelbraune Ränder abgegrenzt sind (Ayesu-Offei & Clare, 1971; Abb. 1.2). Außer auf den Blattspreiten können Symptome auch in den Blattachseln, an den Sprossen und den Ähren der Gerstenpflanzen beobachtet werden.



Abbildung 1.2: Symptomausbildung auf Blättern der Wintergerste nach Befall mit *R. commune*.

Typische Blattsymptome, die sich ca. 8-14 Tage nach Infektion mit *R. commune* auf den Blattspreiten entwickeln. Auffällig sind die hellen nekrotischen Läsionen mit dunkelbraunen Umrandungen (Zhan *et al.* 2007).

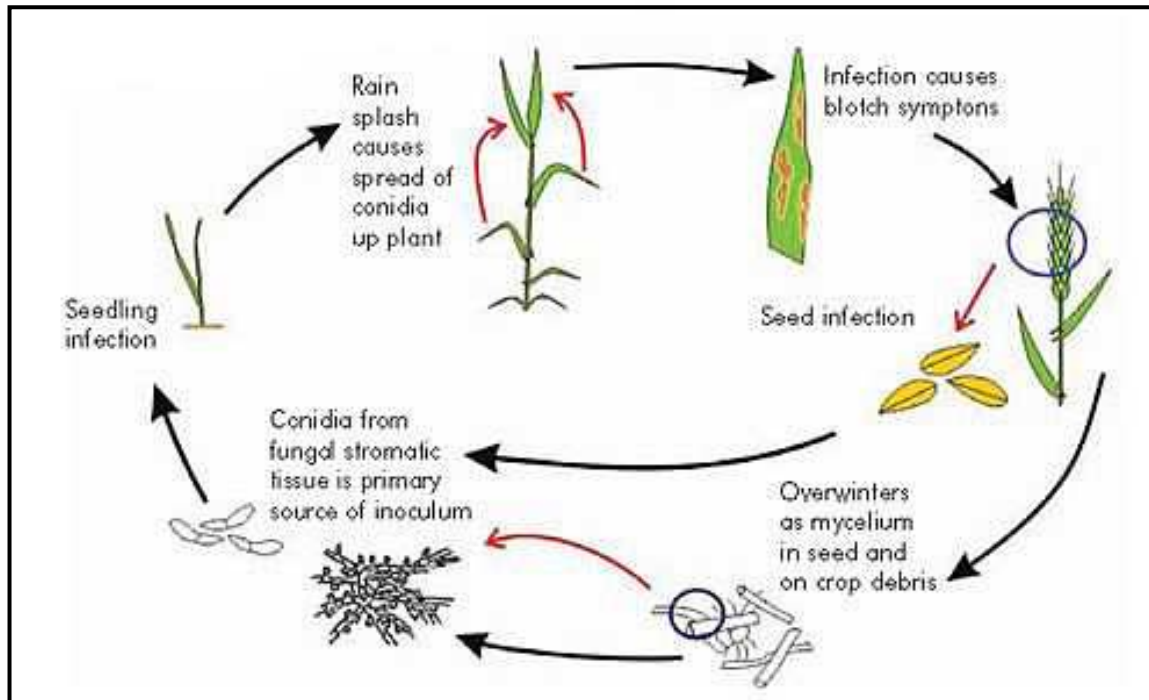


Abbildung 1.3: Lebenszyklus des phytopathogenen Pilzes *R. commune* auf Gerste. (Cereal Disease Encyclopedia, HGCA – Home-Grown Cereals Authority; www.hgca.com)

Der Pilz gehört zu den polyzyklischen Krankheitserregern. Er kann während der Lebensdauer der Gerstenpflanze mehr als einen Lebenszyklus durchlaufen und ist in der Lage, sekundäre epidemiologische Krankheitsverläufe auszulösen (Zhan *et al.* 2007). Die Überwinterung des Pilzes erfolgt meist als Myzel in Ernterückständen. Eine Übertragung durch infiziertes Saatgut ist ebenfalls möglich, spielt aber eher eine untergeordnete Rolle. Die Infektion der Sämlinge erfolgt durch asexuelle Konidien, die vom auskeimenden Myzel bevorzugt bei feuchten, kühlen Temperaturen produziert und durch Regentropfen übertragen werden. Die Phase, die auf der Wirtspflanze von der Infektion bis zur erneuten Produktion von Konidiosporen führt (Latenzphase), umfasst mindestens zehn Tage. Die Sporen können durch Regenwasser auf noch uninfizierte Blätter derselben oder auf die anderer Pflanzen übertragen werden und diese erneut infizieren. Die Ausbildung der typischen Symptome erfolgt nach ca. 8-14 Tagen. Über die Infektion der Ähren gelangt der Pilz schließlich in das Saatgut (Abb. 1.3).

R. commune gehört zu den Deuteromyceten oder Imperfekten Pilzen. Diese Abteilung bildet keine einheitliche Verwandtschaftsgruppe. Es handelt sich hierbei vielmehr um eine künstliche Einteilung, die alle Pilze umfasst, von denen bisher nur die vegetative (haploide) Vermehrungsform bekannt ist, also die sexuelle (diploide) Lebensphase (wie bei anderen höheren Pilzen) nicht beschrieben ist. Eine exakte Zuordnung der einzelnen Arten ist daher nur selten möglich, da hierfür die Morphologie des sexuellen Fruchtkörpers (Teleomorph) entscheidend ist. *R. commune* ist anamorph, wird jedoch,

wie viele andere Vertreter dieser Gruppe, auch häufig zu den Ascomyceten gezählt. Untersuchungen zum Verwandtschaftsgrad von *Rhynchosporium* ergaben die größte phylogenetische Nähe zu den Ascomyceten der Gattungen *Tapesia* und *Pyrenopeziza* (Goodwin, 2002). Ob *Rhynchosporium* die Fähigkeit zur sexuellen Vermehrung im Laufe seiner Evolution verloren hat, sie also nicht mehr besitzt, oder sie noch nicht identifiziert werden konnte, ist noch unentschieden. Im Vergleich zu anderen anamorphen Pilzen zeigt *R. commune* jedoch einen hohen Grad an genetischer Diversität der einzelnen existierenden Populationen, welche im Gegensatz zum nachgewiesenen asexuellen Status des Pilzes steht. Im Jahr 2003 konnten Linde *et al.* sowie Foster und Fitt (2004) unabhängig voneinander die Loci der beiden Kreuzungstypen (*mating type (MAT) loci*) *MAT1-1* und *MAT1-2* als Idiomorphe identifizieren. Dabei konnten in den untersuchten Isolaten entweder das eine oder das andere Idiomorph isoliert werden, was als ein Beweis für einen heterothallischen Status des Pilzes diskutiert wird. Diese These wird dadurch untermauert, dass Linde *et al.* (2003) eine nahezu gleiche Verteilung beider Kreuzungstypen in über 1000 untersuchten *Rhynchosporium*-Isolaten nachweisen konnten. Eine teleomorphe Form des Pilzes konnte dennoch bis heute nicht nachgewiesen werden. Es kann demnach nicht ausgeschlossen werden, dass *R. commune* die Fähigkeit zur sexuellen Vermehrung verloren hat, da neben den *MAT*-Genen auch andere Faktoren für eine sexuelle Reproduktion von Bedeutung sind (Sharon *et al.*, 1996; Arie *et al.*, 2000; Yun *et al.*, 2000). Als weitere Erklärung für die hohe genetische Variabilität der *R. commune*-Populationen, insbesondere in Bezug auf ihre Pathogenität, werden deshalb derzeit auch zunehmend Mechanismen des asexuellen Genaustauschs diskutiert (parasexuelle somatische Rekombination; Forgan *et al.*, 2007).

R. commune wird in der Literatur als nekrotropher Pilz beschrieben. Er tötet die pflanzlichen Zellen ab, um deren Abbauprodukte in seinen eigenen Stoffwechsel einzuschleusen. Wie oben bereits erwähnt, sezernieren die meisten phytopathogenen Pilze zu diesem Zweck Toxine. Bereits Ende der 70er, Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden hierzu Forschungen an *R. commune* durchgeführt. Dabei konnte eine Familie von β -1-4-Glucosidverbindungen aus dem Kulturfiltrat des Pilzes identifiziert werden, die als Aglykon 1,2-Propandiol enthalten und phytotoxische Eigenschaften besitzen. Die erste nachgewiesene Verbindung der Gruppe war ein 1-Hydroxy-2-Propyl- α -Cellobiosid, welches die typischen Symptome der Blattfleckenkrankheit auf Gerstenpflanzen hervorrief, und folglich mit dem Trivialnamen Rhynchosporosid bezeichnet wurde (Auriol *et al.*, 1978). Da jedoch auch andere Pflanzen neben Gerste auf das Phytotoxin reagieren, und auch apathogene *Rhynchosporium*-Isolate noch nachweisbare Mengen davon sezernieren, kann es nicht als wirtsspezifisches Toxin bezeichnet werden. Allerdings konnten variable Affinitäten der Rhynchosporoside zu bestimmten Membran-Rezeptoren in Gerstenpflanzen nachgewiesen werden (Beltran & Strobel, 1978; Mazars *et al.*, 1983a).

Ein weiteres wichtiges Merkmal von *R. commune* ist seine subkutikuläre Lebensweise. Nur wenige Vertreter der phytopathogenen Pilze sind in der Lage, ein subkutikuläres Myzel auszubilden. Beispielsweise wächst *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hughes in der äußeren epidermalen Zellschicht (Graniti, 1962). Auch *Diplocarpon rosae* Wolf. (Aronescu, 1934) und *Venturia inaequalis* (Cooke) Wint (Tarr, 1972) breiten sich zunächst zwischen Kutikula und der äußeren Epidermis aus (Jones & Ayres, 1973). *R. commune* verbleibt fast über seinen gesamten Lebenszyklus zwischen Kutikula und äußerer epidermaler Zellschicht. Erst in einem sehr späten Stadium des Infektionszyklus sind Hyphen in geringer Zahl auch zwischen den Mesophyll-Zellen nachzuweisen (Jørgensen *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den oben genannten Beispielen subkutikulär wachsender Phytopathogene bildet *R. commune* keine Haustorien aus, um an die Nährstoffe der Pflanze zu gelangen. Er dringt nicht in die pflanzlichen Zellen ein, sondern wächst während seines gesamten Lebenszyklus interzellulär. Interessanterweise bleibt *R. commune* zudem während der ersten sieben Tage seiner Lebensphase auf der Wirtspflanze makroskopisch „unsichtbar“. Mikroskopische Untersuchungen belegen, dass der Pilz in diesem Stadium bereits in die Pflanze eingedrungen ist und beginnt, sich unter der Kutikula auszubreiten. Die pflanzlichen Zellen bleiben jedoch zunächst am Leben. Erst nach zehn bis zwölf Tagen beginnt der Kollaps der Epidermis- und später der Mesophyll-Zellen, was mit der Ausbildung der Blattsymptome einher geht. Dieses Verhalten des Pilzes steht im Gegensatz zur Lebensweise anderer nekrotropher Pilze, da diese ihre Wirtspflanzen meist sehr zeitnah nach der Penetration mit Hilfe von Phytotoxinen abtöten, um sie metabolisieren zu können. Bereits 1972 diskutierten Jones und Ayres eine nach Befall von *R. commune* ausgelöste erhöhte Permeabilität der pflanzlichen Zellmembranen, die es dem Pilz ermöglicht, intrazelluläre Nährstoffe ohne den Einsatz oben beschriebener phytotoxischer Substanzen aus dem sonst nährstoffarmen Raum zwischen Kutikula und Epidermis zu beziehen. Des Weiteren konnten Jørgensen *et al.* 1993 durch rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen die Entwicklung zweier Hyphenarten in *Rhynchosporium* feststellen. Zunächst bildeten sich dünne, reich verzweigte Hyphen zwischen Kutikula und äußerer epidermaler Zellschicht aus. Später wuchsen dickere Hyphen, die sich in der epidermalen Zellschicht ausbreiten und vereinzelt bis ins Mesophyll reichten. Die Ausbildung zweier verschiedener Hyphenarten ist ein Merkmal hemi-biotropher Pilze, wie z.B. den *Colletotrichum*-Arten (Perfect & Green, 2001). Die Ausbildung einer zweiten Hyphenart während des Infektionszyklus, die mit dem nachfolgenden Zelltod der Wirtspflanze einhergeht, spricht für eine nekrotrophe Lebensphase des Pilzes, die von der vorherigen biotrophen Phase abgegrenzt ist. Ein eventueller hemi-biotropher Status von *R. commune* wird deshalb derzeit diskutiert. Bislang wird er in der Literatur jedoch häufiger der Gruppe der nekrotrophen Pilze zugeordnet.

1.4.3 Betrachtungen zur molekularen Interaktion zwischen *Hordeum vulgare* L. und *Rhynchosporium commune*

1.4.3.1 Verlauf kompatibler und inkompatibler Interaktionen

In den letzten Jahrzehnten trugen mehrere mikroskopische Studien zu einem verbesserten Verständnis der Entwicklung des Pilzes *R. commune* auf der Wirtspflanze Gerste bei. Dabei wurden sowohl der Verlauf kompatibler (auf suszeptiblen Gerstensorten) als auch inkompatibler Interaktionen (auf resistenten Sorten) des Pilzes mit der Pflanze untersucht. Abbildung 1.4 zeigt schematisch und vereinfacht den Ablauf beider Vorgänge.

Die Konidiosporen von *R. commune* haben eine charakteristische längliche, gebogene Form und sind zweizellig. Landet eine Spore auf der Blattoberfläche einer anfälligen Gerstensorte, keimt sie innerhalb der ersten zwölf Stunden aus (Ayesu-Offei & Clare, 1970; Abb. 1.5).

Sie bildet einen oder mehrere Keimschläuche, welche an ihren Enden meist charakteristische Verdickungen ausbilden. In der Literatur wurden diese bisher oft als Appressorien bezeichnet (Ayesu-Offei & Clare, 1970; Jones & Ayres, 1974; Jørgensen *et al.*, 1993; Xi *et al.* 2000), doch ist ihre Funktion in dieser Hinsicht noch nicht eindeutig nachgewiesen worden. Die Struktur erscheint kleiner als die Appressorien anderer phytopathogener Pilze (z.B. *Magnaporthe grisea*). Auch ist sie nicht melanisiert, was als häufiges Merkmal für diese Infektionsstrukturen gilt. Des Weiteren penetriert *R. commune* seinen Wirt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht über die Ausübung von Turgordruck, sondern durch enzymatische Lyse (Kutinasen). Dennoch beginnt der Pilz mit Ausbildung dieser Hyphen-Verdickungen, die Kutikula des Blattes direkt zu penetrieren. Dies geschieht ca. 24 Stunden nach dem ersten Kontakt der Spore mit der pflanzlichen Oberfläche. Ein Eindringen von Penetrationshyphen durch die Stomata der Pflanze wurde zwar in älteren Studien beschrieben (Bartels, 1928; Mackie, 1929), konnte aber durch nachfolgende Untersuchungen nicht bestätigt werden (Caldwell, 1937; Ayesu-Offei & Clare, 1970; Lehnackers & Knogge, 1990; Jørgensen *et al.*, 1993).

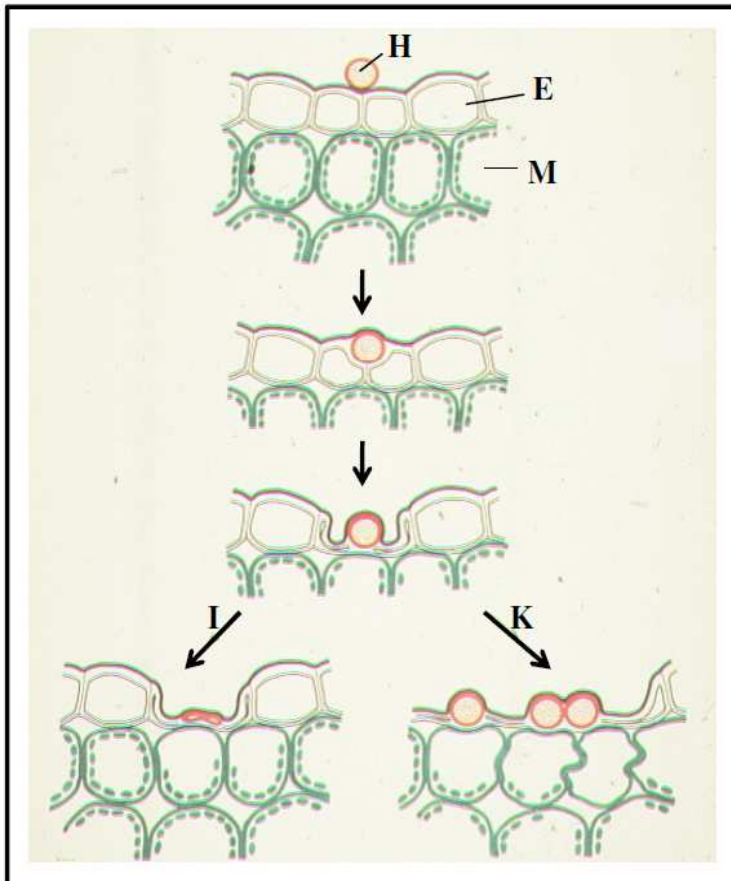


Abbildung 1.4:

Schematische Darstellung des Verlaufs einer kompatiblen (K) und inkompatiblen (I) Interaktion des phytopathogenen Pilzes *R. commune* und der Wirtspflanze Gerste.

Eine Keimhyphe (H) penetriert die Blattoberfläche und wächst zwischen Kutikula den Epidermiszellen (E). Im weiteren Verlauf der Infektion kollabieren zunächst die epidermalen Zellen. Bei einer kompatiblen Interaktion folgen schließlich auch die Mesophyll-Zellen (M). Ist die Pflanze gegenüber *R. commune* resistent, wird das Wachstum des Pilzes bereits in der Epidermis gestoppt. (Steiner-Lange *et al.*, 2003).

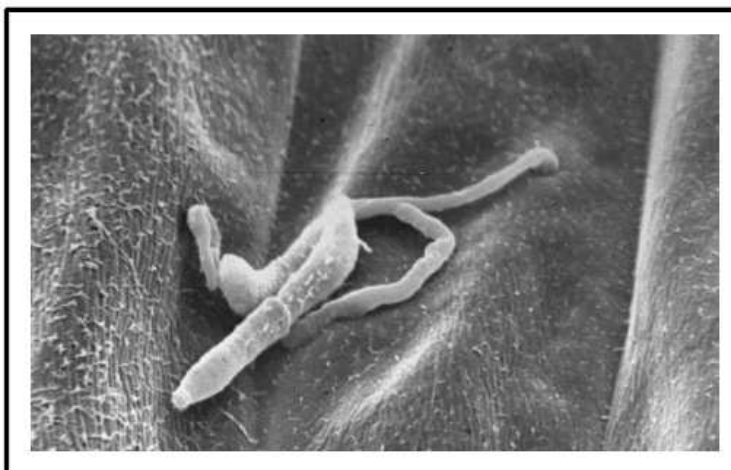


Abbildung 1.5:

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Gerste-pathogenen Pilzes *R. commune* auf der Blattoberfläche.

Dargestellt sind zwei zweizellige Konidiosporen, die auf der Blattoberfläche auskeimen und die Kutikula penetrieren. (Lehnackers & Knogge, 1990).

Oft können autofluoreszierende Höfe sowie die Ausbildung von Zellwand-Auflagerungen (Papillen) um die Penetrationsstellen beobachtet werden (Aseyu-Offei & Clare, 1970; Lehnackers & Knogge, 1990; Jørgensen *et al.* 1993). Bei einer kompatiblen Interaktion des Pilzes mit der suszeptiblen Pflanze breiten sich die Hyphen schnell zwischen der Kutikula und der epidermalen Zellschicht aus. Sie wachsen zunächst bevorzugt auf den antiklinen Zellwänden zwischen benachbarten Epidermiszellen (Lehnackers & Knogge, 1990). Dabei bildet der Pilz zunächst dünne, reich verzweigte Hyphen aus. Später (ca. vier Tage nach Infektionsbeginn) sind dickere Hyphen zu beobachten, welche weniger Verzweigungen zeigen. Sie breiten sich über die inneren periklinen Zellwände der Epidermis bis in den Interzellularraum des Mesophylls aus (ca. acht bis zwölf Tage nach Infektion). Begleitend zur Ausbildung der dicken Hyphen entsteht ein subkutikuläres Prosenchym (ca. zehn Tage nach Infektion), welches sich zu einem dicht gepackten Pilz-Stroma entwickelt (Jørgensen *et al.*, 1993). In dieser Zeit werden auch die ersten Symptome auf der Pflanze sichtbar, ausgelöst durch den Kollaps der epidermalen Zellschicht sowie anschließend des Mesophylls (Ayesu-Offei & Clare, 1970). Auf dem Stroma entstehen schließlich an kurzen Konidiophoren neue Sporen, die durch die zerstörte, jedoch zum Teil auch noch intakte Kutikula brechen und auf der Blattoberfläche mikroskopisch zu erkennen sind (Jørgensen *et al.*, 1993).

Im Gegensatz zur kompatiblen Interaktion, bei der der Pilz die Pflanze infiziert, verläuft der Befall resistenter Gerstensorten für den Pilz erfolglos. Lehnackers & Knogge (1990) beschrieben eine stark verzögerte Entwicklung des *R.-commune*-Isolats US238.1 auf der resistenten Gerstensorte Atlas 46. Nach sechs Tagen zeigten 70% der Sporen keine Keimung, die übrigen 30% hatten nur kurze Keimschläuche ausgebildet, die die Kutikula nicht penetrierten. Diese Beobachtung konnte jedoch nicht bei allen als resistent eingestuften Gerstensorten gemacht werden. So zeigte das *R.-commune*-Isolat CP 1938-70 auf der Gerstensorte Digger keine verzögerte oder gehemmte Sporenkeimung (Jørgensen *et al.* 1993). Ist der Pilz in der Lage die Kutikula der resistenten Pflanzensorte zu durchbrechen, bilden sich an den Penetrationsstellen die bereits oben erwähnten Höfe und Papillen-artigen Zellwand-Auflagerungen aus. Diese verhindern meist erfolgreich eine subkutikuläre Ausbreitung des Pilzes. Zwar wurden diese Zellwand-Strukturen auch bei der Penetration suszeptibler Pflanzen beobachtet, der Durchmesser der Höfe sowie die Dicke der Papillen waren jedoch geringer als bei den resistenten Sorten (Jørgensen *et al.* 1993). Zudem wurde eine eindeutige negative Korrelation zwischen Zellwand-Auflagerungen und der erfolgreichen Penetration der pflanzlichen Kutikula beobachtet (Xi *et al.*, 2000). Ein totaler Kollaps der epidermalen Zellschicht sowie des Mesophylls wie bei einer kompatiblen Interaktion ist bei der Infektion resistenter Pflanzensorten nicht zu beobachten. Subkutikuläre Hyphen sind nur in geringer Zahl zu finden. Zudem konnte auf der resistenten Gerstensorte Atlas 46 ein Abbau pilzlicher Strukturen auf der Blattoberfläche beobachtet werden (Lehnackers & Knogge, 1990). Dies kann zum einen durch den Pilz selbst ausgelöst werden, welcher sich aufgrund der inkompatiblen

Interaktion in einem Hungerzustand befindet (Rotem *et al.* 1976). Zum anderen kann die Pflanze zu ihrem eigenen Schutz Chitinasen oder andere für den Pilz destruktive Hydrolasen mobilisieren (Lehnackers & Knogge, 1990). *R. commune* kann schlussendlich keinen vollständigen Lebenszyklus auf resistenten Gerstensorten durchlaufen. Dies führt schließlich zum Tod des Pathogens und zur erfolgreichen Abwehr des Angriffs auf Pflanzenseite.

1.4.3.2 Molekulare Kommunikation – Gegenstand der Forschung

Virulenz- und Avirulenzfaktoren

Besonders die vergangenen beiden Jahrzehnte wurden durch intensive Forschungsarbeit auf molekularer Ebene geprägt. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag dabei zunehmend auf der Untersuchung der Interaktion beider Partner innerhalb des Pathosystems *R. commune*-Gerste. Als ein wichtiger Aspekt galten die molekularen Mechanismen, die der Ausprägung von Suszeptibilität und Resistenz, insbesondere der Wirtsresistenz, zugrunde liegen. Wie in Kapitel 1.3 bereits beschrieben, wird die Ausbildung des einen oder des anderen Zustandes durch eine „Erkennung“ oder „Nicht-Erkennung“ des Pathogens durch den Wirt auf molekularer Ebene geregelt (Jones & Dangl, 2006). Ein essentieller Schritt für das Verständnis dieser molekularen Interaktion ist die Identifizierung der dabei agierenden Faktoren, also der vom Pathogen produzierten Effektor-Moleküle sowie deren korrespondierender Resistenz-Gene auf Pflanzenseite. *R. commune* stellt dabei aufgrund seiner Lebensweise eine Besonderheit dar. Da der Pilz während seines gesamten Lebenszyklus keinen direkten Kontakt zu den pflanzlichen Zellen ausbildet, sondern sich ausschließlich zwischen der Kutikula und den Zellwänden der epidermalen Zellschicht ausbreitet, kann er mit der Pflanze nur über die Ausbildung diffundierender, in den Interzellularraum der Pflanze sezernierter Moleküle kommunizieren. Wevelsiep *et al.* (1991) isolierten aus dem Kulturfiltrat des Isolats US238.1 einen zu diesem Zeitpunkt neuen Typus von Nekrosen-induzierenden Proteinen (NIPs). Die drei Peptide (Nip1, 2 und 3) haben eine Größe von weniger als 10 kDa und sind sehr cysteinreich. Alle drei lösen nekrotische Symptome auf Blättern der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas und der resistenten Sorte Atlas 46 sowie auch auf Nichtwirtspflanzen (z.B. *Phaseolus vulgaris*) aus, was ihren Status als nichtwirtsspezifische Phytotoxine untermauert. Nip3 ist mit 115 Aminosäuren das größte der drei Proteine, wovon die ersten 17 Aminosäuren des N-Terminus das Signalpeptid umfassen. Nach Abspaltung der Signalsequenz enthält das reife Protein acht Cysteine, zudem besitzt es eine N-glykosidisch gebundene Kohlenhydrat-Seitenkette. Sowohl Nip3 als auch Nip2 konnten in mehreren untersuchten *Rhynchosporium*-Isolaten nachgewiesen werden, während Nip1 zunächst nur im Kulturfiltrat von US238.1 gefunden wurde (Wevelsiep *et al.*, 1991). In weiteren Untersuchungen zur Funktion der drei NIPs konnte man zudem eine durch Nip1 und Nip3

ausgelöste Stimulation der Mg^{2+} -abhängigen, K^+ -stimulierten H^+ -ATPase in der Plasmalemma-Membran der pflanzlichen Zellen feststellen. Dies konnte sowohl in suszeptiblen als auch in Geweben resistenter Gerstenpflanzen gezeigt werden und gilt als eine Ursache der Phytotoxizität dieser Proteine. Nip2 stimuliert die H^+ -ATPase nicht. Für die Toxizität desselben in pflanzlichen Geweben wurde seinerzeit ein anderer, allerdings unbekannter Mechanismus angenommen (Wevelsiep *et al.*, 1993).

NIP1 kodiert für ein 82 Aminosäuren umfassendes Präprotein, welches durch spätere Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides (22 AS) zu einem 60 Aminosäuren langen Protein prozessiert wird. Das reife Protein enthält zehn Cysteinreste. Die Detektion von Nip1 in vorerst nur einem *Rhynchosporium*-Isolat (US238.1) verlieh diesem Protein einen besonderen Status gegenüber den anderen beiden NIPs und gab Anlass zu intensiveren Untersuchungen. US238.1 löst auf der Gerstensorte Atlas 46 keine Infektion aus, wohl aber auf dem nahezu isogenen Sorte Atlas. Atlas 46 ist Träger des Resistenzlocus *RRS1*, welcher durch Einkreuzung der ebenfalls resistenten Sorte Turk (*RRS1*) mit Atlas (*rrs1*) segregierte (Habgood & Hayes, 1971). Das Gen *HvRRS1* wurde in Gerste auf Chromosom 3 lokalisiert, wo es Teil mehrerer eng verbundener Resistenzloci ist (*RRS1-RRS3-RRS4*) (Dyck & Schaller, 1961a, 1961b). *RRS1* löst jedoch nur Resistenz gegen solche *Rhynchosporium*-Isolate aus, die Träger des *NIP1*-Gens sind. Rohe *et al.* (1995) veröffentlichten eine Arbeit, in der sie eine Funktion des Nip1 als Rassen-spezifisches Elicitor-Protein nachwiesen. Ko-Inokulationsexperimente, bei denen Sporen eines virulenten Pilz-Isolats mit dem Nip1-Protein gemischt wurden, wandelten zuvor kompatible Interaktionen in inkompatible um, dies jedoch nur auf Gerstenpflanzen die den *RRS1*-Resistenzlocus trugen. Zudem zeigten virulente Pilz-Isolate, die mit der *NIP1*-Gensequenz transfiziert wurden anschließend einen avirulenten Status auf Atlas 46. Alle untersuchten natürlichen Isolate, die Träger des *NIP1*-Gens waren, wurden als avirulent auf resistenten Gerstensorten eingestuft. Während solche, die das Gen nicht besaßen bzw. *NIP1*-Allele trugen, die einzelne Nukleotidaustausche aufwiesen, virulent waren. *NIP1* konnte somit als eines der ersten Avirulenzgene in einem pilzlichen Pathogen identifiziert werden (*RcAvrRRS1*), welches durch ein Resistenzgen auf Pflanzenseite (*HvRRS1*) erkannt wird, und damit die Gen-für-Gen-Hypothese belegt (Abb. 1.6).

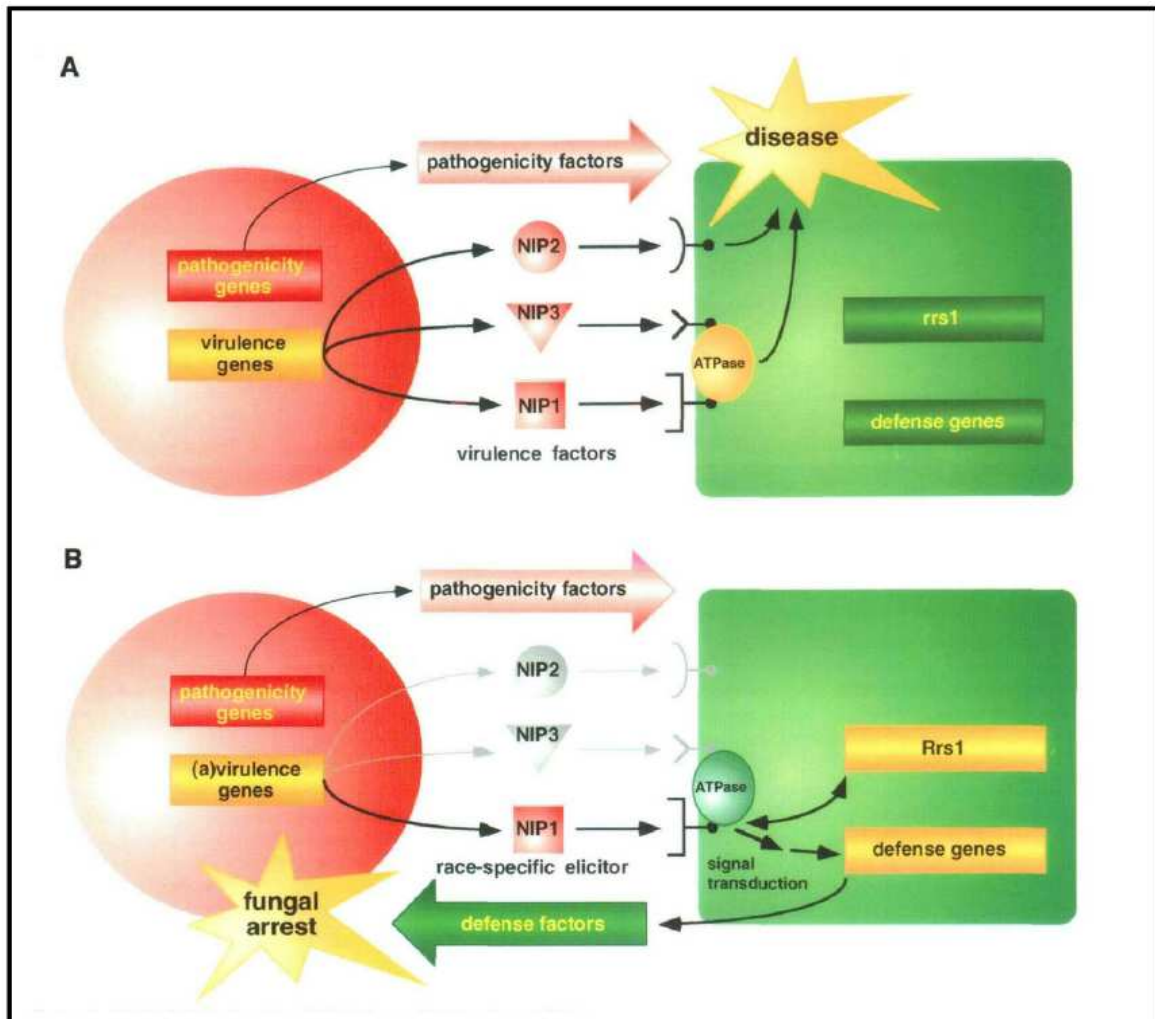


Abbildung 1.6: Modell der molekularen Interaktion zwischen *R. commune* und Gerste (Knogge, 1996).

Teilabbildung A zeigt den Vorgang einer kompatiblen Interaktion nach Infektion einer suszeptiblen Gerstensorte (z.B. Atlas, *rrs1*), die das Resistenzgen *RRS1* nicht besitzt. Neben Faktoren, die für die Ausbildung der Pathogenität wichtig sind, sekretiert der Pilz eine Reihe von Virulenzfaktoren (Nip1, Nip2, Nip3), die über die Stimulierung der H^+ -ATPase der pflanzlichen Zellmembran (Nip1 und Nip3) sowie durch Supprimierung pflanzlicher Abwehrmechanismen (Nip2) toxisch wirken und schließlich den Zelltod verursachen.

Teilabbildung B illustriert den Verlauf einer inkompatiblen Interaktion. Einige Gerstensorten tragen den Resistenzlocus *RRS1*. Dessen Präsenz löst durch spezifische Interaktion mit dem Avirulenzfaktor Nip1 eine Reihe pflanzlicher Abwehrmechanismen aus, die schließlich das pilzliche Wachstum stoppen.

Im Gegensatz zu Nip1 und Nip3, ist die Funktion des dritten Virulenzfaktors (Nip2) noch wenig erforscht. Die Gensequenz *NIP2* kodiert für ein 109 Aminosäuren langes Präprotein. Die Signalsequenz umfasst 16 AS. Nach deren Abspaltung enthält das reife Protein noch sechs Cysteinreste. Zuvor angenommene Prozessierungen des C-Terminus konnten nicht bestätigt werden (Penselin, 2010). Zur Funktion des Proteins ist bisher wenig bekannt. Makroarray-Analysen des Transkriptom der resistenten Gerstensorte

Atlas 46, welche zuvor mit einer *NIP2*-Deletionsmutante inokuliert wurde, zeigten eine stark erhöhte Expression verschiedener pflanzlicher Gene, die in Interaktionen mit dem Wildtyp-*Rhynchosporium*-Isolat nicht beobachtet werden konnten (Basak & Knogge, unveröffentlichte Daten). Deshalb wurde zunächst eine Funktion des Proteins als Suppressor pflanzlicher Abwehrmechanismen angenommen. Diese Daten konnten jedoch in neuerer Zeit widerlegt bzw. nicht bestätigt werden (Penselin & Knogge, unveröffentlichte Daten). Erst kürzlich konnten aufgrund der neu verfügbaren Genomdaten von *Rhynchosporium* weitere *NIP2*-Allele in den Gerste-Isolaten UK7 (Rc*NIP2.1* – 4_{UK7}) und AU2 (Rc*NIP2.1* – 2_{AU2}) sowie im Roggen-Isolat O2CH4-6a (Rs*NIP2.1* – 4_{CH4-6a}) identifiziert werden. Die jeweiligen Proteinsequenzen zeigen Homologien zum bisher bekannten Nip2 sowie untereinander (Wolfgang Knogge, pers. Kommunikation).

Pathogenitätsfaktoren

Die oben beschriebenen Virulenz- bzw. Avirulenzfaktoren werden in der neueren Fachliteratur als Gruppe der Effektoren zusammengefasst. Diese erfreuen sich seit ca. zwei Jahrzehnten regen Forschungsinteresses und sind in einer Vielzahl pilzlicher Pathogene nachgewiesen worden. Die meisten dieser Proteine sind sehr cysteinreich. Sie werden vom jeweiligen Pathogen sezerniert und in der Wirtspflanze entweder direkt oder indirekt von bestimmten Rezeptoren erkannt (Stergiopoulos & de Wit, 2009). Dabei stellen sie die agierenden Faktoren der Gen-für-Gen-Hypothese dar. Die Effektorproteine sind somit entscheidend an der Etablierung einer kompatiblen oder einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pathogen und Wirt beteiligt. Werden sie von der Wirtspflanze nicht durch das Vorhandensein eines korrespondierenden Resistenzproteins erkannt, können sie zum Teil als Virulenzfaktoren die PAMP-vermittelte Immunität (PTI) supprimieren. Ist ein Resistenzprotein vorhanden, induzieren sie Effektor-vermittelte Immunität (ETI), in diesem Fall als Avirulenzproteine (de Wit *et al.*, 2009).

Die Virulenz bzw. Avirulenz eines Pathogens sowie die dabei agierenden Effektor-Moleküle, deren korrespondierende Resistenz-Proteine und die Vorgänge der molekularen Interaktionen beider Faktoren umfassen ein eigenes Kapitel der phytopathologischen Forschung. Die grundlegende Fähigkeit eines Mikroorganismus zur Pathogenität, also die Fähigkeit eine Pflanze zu infizieren, wird davon abgegrenzt betrachtet. Die dabei bestimmenden Faktoren werden als Determinanten der Pathogenität oder einfach als Pathogenitätsfaktoren bezeichnet (Abb. 1.6). *Per definitionem* umfassen sie im Allgemeinen alle Faktoren eines Pathogens, die für die Ausbildung der Krankheit *in planta* essentiell, jedoch für ein Wachstum des Organismus *in vitro* verzichtbar sind (Oliver & Osbourn, 1995). Sie werden in einem genauen Zeitmuster während der Pathogenese benötigt und exprimiert. Defekte wie Deletionen oder veränderte

Expressionsmuster der Pathogenitätsgene führen zu einer reduzierten Virulenz oder zu vollständigem Verlust der Pathogenität (Idnurm & Howlett, 2001).

Die Phasen der pilzlichen Pathogenese umfassen Sporenadhäsion, Appressorien-Bildung, Produktion Kutikula- oder Zellwand-abbauender Enzyme, Penetration der pflanzlichen Oberfläche, Haustorien-Ausbildung bei biotrophen Pilzen und Produktion von Toxinen in nekrotrophen Organismen, Umprogrammierung des pflanzlichen Metabolismus zum eigenen Nutzen und schließlich der Abschluss des Lebenszyklus durch erneute Sporulation. Die Faktoren und besonders die sie kodierenden Gene, die während dieser Prozesse eine Rolle spielen, standen in den letzten beiden Jahrzehnten im Fokus der Forschung. Erste Vorgehensweisen zur Identifizierung neuer Pathogenitätsgene wurden als *black boxes* bezeichnet. Pathogenitätsfaktoren konnten damit ohne vorheriges Wissen ihrer Funktionen identifiziert werden. Dies geschah zum einen über die Charakterisierung von Mutanten, zum anderen über die Analyse von differentiell exprimierten pilzlichen Genen während der Pathogenese (Oliver & Osbourn, 1995). Die Generierung von Mutanten erfolgte zunächst zufällig durch Einsatz spezieller Chemikalien oder Strahlung. Mit der Etablierung neuer Transfektionsmethoden wie der Agrobakterien-vermittelten Transfektion (ATMT) oder der Transfektion von Pilzprotoplasten folgte die Anwendung von Insertionsmutagenesen (REMI-Mutagenese (s. 1.5.1), Transposon-Tagging). Zudem konnten meist durch die Anwendung degenerierter Oligonukleotide homologe Gene als Pathogenitätsfaktoren verwandter Pathosysteme identifiziert werden (Homologie-Screening). Damit stieg die Zahl der neu identifizierten Faktoren bereits innerhalb der ersten zehn Jahre exponentiell an (Idnurm & Howlett, 2001). In neuerer Zeit werden immer mehr Genomsequenzen verschiedener phytopathogener Pilze verfügbar. Damit werden gerichtete Deletionen interessanter, in die Pathogenese des Pilzes involvierter Gene möglich sowie deren funktionelle Charakterisierung durch die nachfolgende Untersuchung der Mutanten beschleunigt. Die Analyse von differentiell exprimierten Genen beruht auf der Annahme, dass bestimmte pilzliche Gene nur während des Kontaktes mit der Pflanze spezifisch transkribiert werden und deshalb sehr wahrscheinlich eine bedeutende Rolle während der Pathogenese spielen. Die Identifizierung solcher Gene kann durch viele verschiedene Ansätze geschehen. Beispiele sind *differential display-PCR*, subtraktive Hybridisierung, Erstellung von ESTs sowie Enhancer- bzw. Promotor-Trapping (Kahmann & Basse, 2001).

Forschungsarbeiten zur Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren in *R. commune* wurden vor ca. zehn Jahren begonnen. Dabei wurden drei verschiedene Ansätze gewählt: REMI-Mutagenese (s. 1.5.1), Promotor-Trapping und Homologie-Screening. Die Anwendung der REMI-Mutagenese ergab die größte Auswahl an putativen Pathogenitätsgenen. Durch Analyse apathogener Mutanten konnten ein Rhomboid-ähnliches Protein, eine putative Aminosäurepermease, ein Protein mit PHD-Zink-Finger-Domäne sowie ein putatives P450-Protein identifiziert werden. Das Promotor-Trapping führte zur Identifizierung einer Histidin-Proteinkinase (Mönchmeier, 2005). Die Anwendung degenerierter

Oligonukleotide auf Aminosäure-Ebene ergab ein homologes Protein zur MAP-Kinase Pmk1 aus *Magnaporthe grisea* (RcPMK1; Völz, 2006).

1.5 Vorarbeiten

1.5.1 Die Insertionsmutagenese zur Identifizierung von Pathogenitätsgenen

Die Vorarbeiten zu dieser Dissertationsarbeit fanden in den Jahren 1998 bis 2000 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ) in Köln statt. Wie oben bereits beschrieben, stand die Identifizierung neuer Pathogenitätsgene im Fokus der Arbeiten. Eine der genutzten Strategien hierfür war die Restriktionsenzym-vermittelte Integration (*restriction enzyme-mediated integration*, REMI), welche eine effektive Methode zur zufälligen Mutagenese von Pilzgenomen darstellt. Der allgemeine Ablauf des REMI-Ansatzes ist vereinfacht in Abbildung 1.7 dargestellt. Ausgangspunkt für die Mutagenese ist ein Expressionsvektor, der ein selektives Markergen enthält, welches Resistenz gegenüber einem Antibiotikum verleiht. Die Pilztransformanden lassen sich so leicht selektieren. Der Pilzvektor wird mit einem Restriktionsenzym behandelt, dessen Nukleinsäure-Erkennungssequenz nur einmal vorhanden ist. Der so linearisierte Vektor wird nun in Anwesenheit desselben Enzyms in Pilz-Protoplasten transferiert. Dadurch integriert die Vektor-DNA, welche die kompatiblen Enden zur restringierten Pilz-DNA besitzt, zufällig in das Genom des Pilzes (Kahmann & Basse, 1999; Maier & Schäfer, 1999). Hierbei kann es zu Mutationen in bestimmten Pilzgenen kommen, die zu phänotypischen Veränderungen führen. Bei phytopathogenen Pilzen kann daher eine insertionsbedingte Inaktivierung von Pathogenitätsgenen zum Verlust der Pathogenität führen und damit zu deren Identifizierung.

Im für diese Arbeit relevanten REMI-Ansatz wurde der Expressionsvektor pAN7-1 (vgl. Abb. 7.3.3.1) verwendet. Dieser enthält das für die Hygromycin-B-Phosphotransferase (*HPH*) kodierende Gen aus dem Bakterium *Escherichia coli* unter der Kontrolle von Promotor- sowie Terminatorsequenzen aus *Aspergillus nidulans* (P_{gpd} ; T_{trpC}). Für den Mutagenese-Ansatz wurden sowohl der Vektor als auch Protoplasten des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7 mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI behandelt. Die entstandenen Pilztransformanden wurden auf Limabohnenagarplatten, die das Antibiotikum Hygromycin-B enthielten, selektiert.

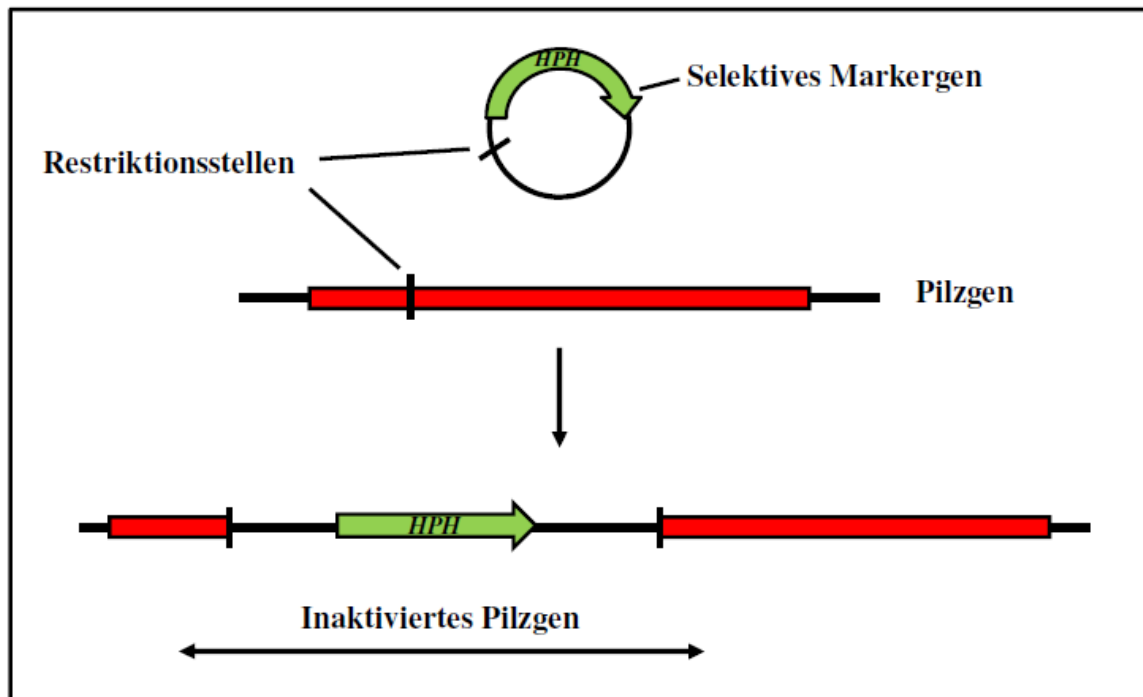


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Prinzips der Restriktionsenzym-vermittelten Integration (*restriction enzyme-mediated integration*, REMI).

Ein Expressionsvektor, der ein Markergen zur Selektion der Transformanten enthält, wird mit einem Restriktionsenzym linearisiert und im Transfektionsansatz pilzlichen Protoplasten zugegeben. Wird die Vektor-DNA zufällig durch DNA-Reparaturmechanismen in die kodierende Sequenz eines Gens inseriert und dieses damit inaktiviert, können phänotypische Veränderungen in den entsprechenden REMI-Mutanten hervorgerufen werden. Das betroffene Gen kann schließlich durch Sequenzierung der das Plasmid flankierenden DNA-Bereiche identifiziert werden.

1.5.2 Die REMI-Mutante LB20₅₇

Die nach der Insertionsmutagenese erhaltenen Pilztransformanten wurden auf Limabohnenagarplatten angezogen und danach auf ihre Fähigkeit zur Infektion suszeptibler Gerstenpflanzen (Gerstensorte Hannchen) getestet. Durch diesen Ansatz konnten mehrere Mutanten von *R. commune* isoliert werden, die auf Gerste keine Krankheitssymptome mehr hervorriefen und somit Mutationen in für die Pathogenese relevanten Genen tragen könnten (Albert & Knogge, unveröffentlichte Daten). Unter diesen Kandidaten wurde die REMI-Mutante LB20₅₇ als apathogen auf suszeptiblen Gerstenpflanzen identifiziert (Abb. 1.8).

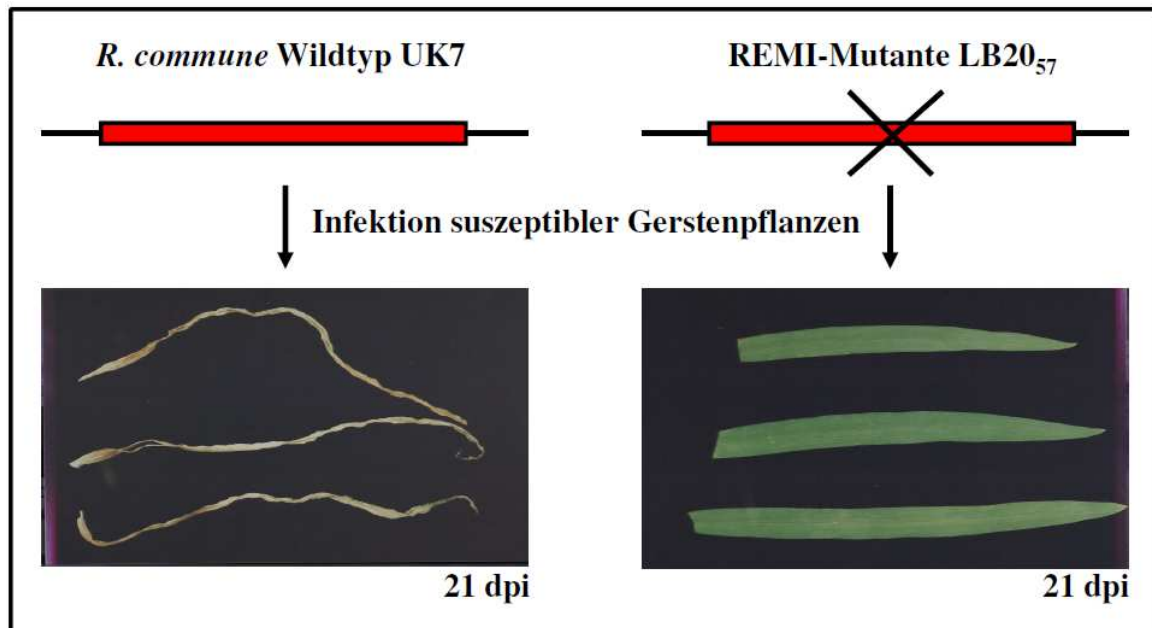


Abbildung 1.8: Vergleich der Phänotypen der REMI-Mutante LB20₅₇ und des *R. commune*-Wildtyps UK7 21 Tage nach Infektion.

Sieben Tage alte Primärblätter der gegenüber dem Wildtyp suszeptiblen Gerstensorte Hannchen wurden jeweils mit 1×10^7 Sporen pro zehn Pflanzen inokuliert. Die REMI-Mutante LB20₅₇ zeigt auch nach drei Wochen keine Symptome auf den Blättern, während mit dem Wildtyp infizierte Blätter vollständig nekrotisch sind (Albert & Knogge, unveröffentlichte Daten).

1.5.3 Identifizierung eines Kandidatengens

Die Apathogenität der REMI-Mutante LB20₅₇ wurde in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Inokulationsexperimenten nachgewiesen. Um die Insertionsstelle des pAN7-1-Vektors im Pilzgenom nachzuweisen und damit einen Hinweis auf das betroffene Pilzgen zu bekommen, wurden zwei Methoden angewandt. Die flankierenden DNA-Bereiche stromauf- und stromabwärts von der bekannten Vektorsequenz wurden sowohl mit PCR-Walking- als auch mit TAIL-PCR-Methoden analysiert. Die Sequenzierung der Insertionsstelle und angrenzender Bereiche ergaben den Nachweis eines korrekten REMI-Ereignisses. Die *Bam*HI-Restriktionsstellen waren vollständig erhalten geblieben. Des Weiteren gaben nachfolgende Sequenzierungen Hinweise auf eine wiederholte Integration des pAN7-1-Vektors. Es wurde daher angenommen, dass die Plasmid-DNA zweimal direkt hintereinander in der *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle inseriert vorlag (*direct tandem repeat integration*). Daraufhin durchgeführte DNA-Hybridisierungsexperimente (*Southern-Analysen*) der REMI-Mutante erbrachten allerdings keine Ergebnisse.

Von den flankierenden Bereichen der Vektor-DNA ausgehend konnten insgesamt durch PCR-Walking 5977 bp der genomischen DNA-Sequenz identifiziert werden. Blastx-Analysen (NCBI-Datenbank; blastx 2.2.24; Altschul *et al.*, 1997) ergaben seinerzeit

(2000) Sequenzhomologien zu einer putativen 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase [AAF19605.1], einem Zink-Finger Protein (BR140) [AAB02119.1] und menschlichem Peregrin [NP_004625.2] sowie zu einer Untereinheit des Histon-Acetyltransferase-Komplexes (Nto1p) aus der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* [CAA21075.1].

Der Ermittlung der genomischen Sequenz schloss sich die Identifizierung der kodierenden Sequenz des Gens an. Mittels 5'- sowie 3'-RACE-PCR konnte zunächst ein offener Leserahmen von 2613 bp identifiziert werden. Die kodierende Sequenz wurde durch die Integration des pAN7-1-Vektors nicht betroffen, da die Insertionsstelle des Plasmids 274 bp vor dem Startcodon, und damit im Promotorbereich des mutmaßlich betroffenen Gens lag (Abb. 1.9).

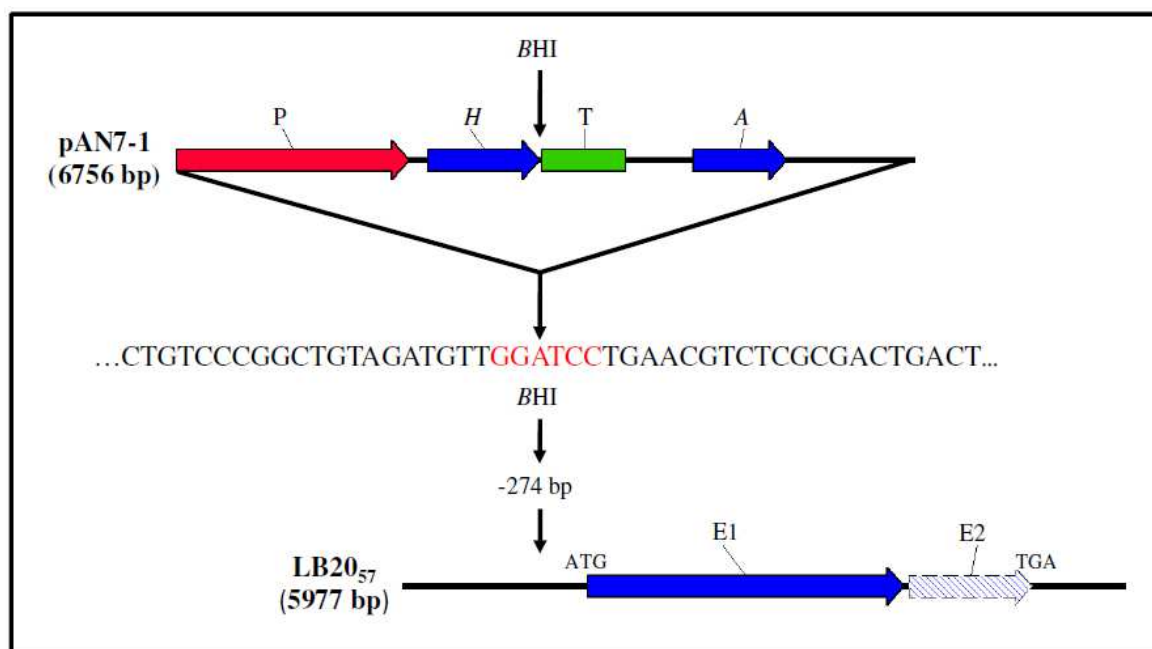


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der REMI-Integration.

Die pAN7-1-Vektorsequenz (6756 bp) konnte 274 bp vor dem Start-ATG des zunächst identifizierten offenen Leserahmens von 2613 bp (E1) nachgewiesen werden. Die Plasmid-DNA inserierte dabei in die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle (BHI). Die jeweiligen Schnittstellen blieben erhalten und konnten in der REMI-Mutante LB20₅₇ durch Sequenzierung exakt nachgewiesen werden, was zur Identifizierung eines korrekten REMI-Ereignisses führte.

P – Promotor des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens aus *Aspergillus nidulans* (P_{gpd}); T – Terminatorsequenz des *TRPC*-Gens aus *Aspergillus nidulans* (T_{trpC}); H – kodierende Sequenz des Hygromycin-B-Phosphotransferasegens aus *Escherichia coli* (HPH); A – Ampicillin-Resistenzkassette (β -Lactamasegen); E2 – später identifiziertes zweites Exon der kodierenden Sequenz des nachgewiesenen offenen Leserahmens (s. 3.2.1.2)

Das aus der Gensequenz abgeleitete Protein umfasste 871 Aminosäuren. *In silico*-Analysen (ExpASy – PROSITE, ScanProsite, www.expasy.ch) ergaben den Nachweis eines PHD-Zink-Finger-Motives mit spezifischer C4HC3-Signatur in der Proteinsequenz, welches die Aminosäuren 457 bis 501 umfasst. Eine Analyse der subzellulären Lokalisierung (PSORT II, www.psort.hgc.jp) zeigte mit 78,3-prozentiger Wahrscheinlichkeit eine Kernlokalisierung des Proteins (Albert & Knogge, unveröffentlichte Daten). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde zunächst eine Funktion des Proteins als Transkriptionsfaktor angenommen, da dies eine häufige Funktion von Proteinen mit PHD-Zink-Finger-Domänen ist.

1.5.4 Komplementation der REMI-Mutante LB20₅₇

Um die REMI-Mutante LB20₅₇ zu komplementieren, wurde nahezu die gesamte bekannte genomische DNA-Sequenz (4,9 kb) des identifizierten Gens in den pilzlichen Expressionsvektor pAN8-1 (vgl. Abb. 7.3.3.2) kloniert. Mit dem so erhaltenen Komplementationsvektor pAN8-1-WT16bis-WT17 (vgl. Abb. 7.3.3.4) wurden Protoplasten der Mutante LB20₅₇ transfiziert. Die Transformanten wurden auf Limabohnenagarplatten bis zur Sporulation vermehrt. Zwei der Komplementationsmutanten wurden auf der hoch suszeptiblen Gerstensorte Hannchen auf ihre Symptomentwicklung überprüft. Dabei wurden 5×10^5 Sporen pro Topf versprüht. In Abbildung 1.10 sind die Primärblätter der untersuchten Pflanzen 21 Tage nach Inokulation gezeigt. Im Vergleich zur apathogenen REMI-Mutante waren die Komplementationsmutanten wieder pathogen auf den Gerstenpflanzen. Sie zeigten jedoch im Vergleich zum Wildtyp weiterhin eine eingeschränkte Virulenz, was in einer verminderten Symptomausbildung sichtbar wurde. (Albert & Knogge, unveröffentlichte Daten).

Dennoch stellte das hier identifizierte Gen einen potentiellen Kandidaten für einen Pathogenitätsfaktor dar, da die REMI-Mutante keinerlei Symptome auf den Gerstenblättern verursachte und als apathogen eingestuft wurde. Als eine Erklärung für die verminderte Virulenz der Komplementationsmutanten wurden durch die REMI-Mutagenese ausgelöste Hintergrund-Mutationen angenommen, die durch die Rückführung der Wildtyp-Gensequenz nicht komplementiert werden konnten. Deshalb war es in nachfolgenden Untersuchungen von großer Wichtigkeit, erneut eine gerichtete Deletion des Gens vorzunehmen, um dessen Einfluss auf die Pathogenität des Pilzes exakt analysieren zu können. Das Gen wurde als *PFPI* bezeichnet, für *putative function in pathogenicity*, und stellt den Ausgangspunkt für diese Dissertationsarbeit dar.

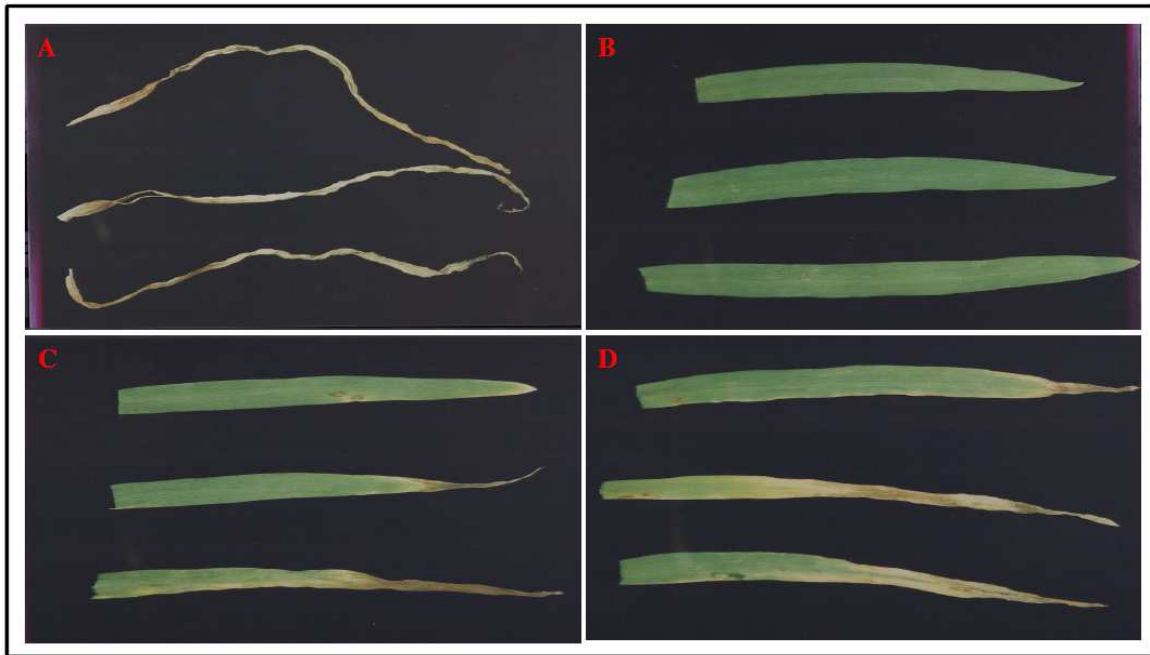


Abbildung 1.10: Vergleiche der Symptomausbildung durch das Wildtyp-Isolat UK7, die REMI-Mutante LB20₅₇ sowie die Komplementationsmutanten 1 und 2.

Infizierte Primärblätter der suszeptiblen Gerstensorte Hannchen 21 Tage nach Inokulation mit dem *R. commune*-Wildtyp-Isolat UK7 (A), der apathogenen REMI-Mutante LB20₅₇ (B) sowie der beiden Komplementationsmutanten 1 und 2 (C und D). Die Retransformanten zeigen erneut Pathogenität auf den Gerstenpflanzen, jedoch eine verminderte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp-Isolat.

1.6 Zielstellung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die strukturelle und funktionelle Charakterisierung des *PFPI*-Gens sowie die Beschreibung seiner mutmaßlichen Rolle während der Pathogenese. Die strukturelle Charakterisierung sollte die Aufklärung der vollständigen Genstruktur sowie *in-silico*-Analysen der Proteinstruktur umfassen. Um den Einfluss möglicher nicht identifizierter Hintergrund-Mutationen in der ursprünglichen REMI-Mutante auszuschließen, sollte für die funktionelle Charakterisierung eine gezielte *PFPI*-Deletionsmutante generiert werden. Diese Mutante sollte mit dem Wildtyp verglichen werden (Krankheitsphänotyp, Hyphenwachstum und Konidienkeimung, Komplementation mit der Wildtyp-Gensequenz). Darüber hinaus sollten die Expression des *PFPI*-Gens *in planta* und unter Kulturbedingungen sowie die subzelluläre Lokalisierung des Pfp1-Proteins untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Saatgut und Pflanzeerde

Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde das Saatgut der Gerstensorten *Hordeum vulgare* L. cv. Ingrid, Atlas und Atlas 46 verwendet. Die Sorte Ingrid wurde vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK), Gatersleben, bezogen. Atlas und Atlas 46 wurden vom United States Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA zur Verfügung gestellt (Lehnackers & Knogge, 1990). Die Suszeptibilitäts- bzw. Resistenzstatus der verschiedenen Gerstensorten gegenüber dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 sind in Tabelle 2.1 zusammengestellt.

Das Saatgut aller Gerstensorten wurde im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Halle in Eigenanzucht reproduziert.

Als Anzuchterde wurde Einheitserde Typ ED73 des EINHEITSERDE-Werksverband e.V. (www.einheitserde.de) eingesetzt.

Gerstensorte	Status gegenüber <i>R. commune</i> UK7
Ingrid	hoch suszeptibel
Atlas	moderat suszeptibel
Atlas 46	resistent

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der verwendeten Gerstensorten sowie deren Status gegenüber *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7

2.1.2 Pilzisolat

Alle experimentellen Arbeiten wurden mit dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 durchgeführt. Des Weiteren standen zu Beginn dieser Arbeit die aus oben genanntem Isolat generierten Mutanten LB20₅₇ (REMI) sowie LB20₅₇ (REMI-Komplementation) zur Verfügung.

2.1.3 Chemikalien

Sofern nicht anders beschrieben, wurden alle in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien und organischen Lösungsmittel von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt, www.merck.de), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, www.carl-roth.de), Sigma-

Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, www.sigmaaldrich.com), Biozym Diagnostik GmbH (Hessisch Oldendorf, www.biozym.com), VWR International GmbH (Darmstadt, www.vwr.com) SERVA Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, www.serva.de), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz, www.sigmaaldrich.com) und Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande, www.duchefa.com) bezogen und zeichneten sich durch den Reinheitsgrad *pro Analysis* (chemisch rein, p.A.) aus.

2.1.4 Enzyme und molekularbiologische Kits

Die verwendeten molekularbiologischen *Kits* sowie die Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, www.fermentas.com), QIAGEN GmbH (Hilden, www.qiagen.com), GE Healthcare (München, www.gehealthcare.com), Invitrogen GmbH (Karlsruhe, www.invitrogen.com), Clontech Laboratories, Inc. (www.clontech.com), Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt, www.appliedbiosystems.com), Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe, www.carl-roth.de), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, www.sigmaaldrich.com) und Roche Diagnostics (Penzberg, www.roche.de) geliefert und sind im Einzelnen unten aufgeführt.

Sofern nicht anders beschrieben wurde für sämtliche Polymerase-Kettenreaktionen eine aus einem *Escherichia-coli*-Überexpressionsstamm rekombinant gewonnene *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt.

<u>Kits:</u>	RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas
	CloneJet™ PCR Cloning Kit	MBI Fermentas
	Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	MBI Fermentas
	Megaprime™ DNA Labeling System	GE Healthcare
	QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
	RNeasy Mini Kit	QIAGEN
	DNeasy Plant Mini Kit	QIAGEN
	QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN
	TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen
	SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
	SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems
<u>Enzyme:</u>	Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
	High Fidelity PCR Enzyme Mix	MBI Fermentas
	T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
	Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	MBI Fermentas
	Ribolock™ RNase Inhibitor	MBI Fermentas
	Ribonuklease A	Roth
	Desoxyribonuklease	Roche Diagnostics
	Lysing Enzyme from <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich

2.1.5 Medien, Puffer und Lösungen

Alle verwendeten Medien, Puffer und Lösungen wurden mit tridestilliertem Wasser, welches zuerst durch eine TKA-Wasseraufbereitungsanlage „Genepure mit Dispenser“ der Firma TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH (Niederelber, www.tka.de) gereinigt wurde, hergestellt und anschließend autoklaviert.

50 mM Acetosyringon-Lösung

50 mM Acetosyringon (3,5-Dimethoxy-4-hydroxy-acetophenon, Roth),
50% (v/v) Reinst-Ethanol,
sterilfiltriert

2x Agrobakterien-Induktionsmedium (pH 5,3; Bundock *et al.* 1995)

80 mM 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES),
1% (v/v) Glycerin,
in 2x Agrobakterien-Minimalmedium gelöst, pH 5,3 mit HCl eingestellt, sterilfiltriert

2x Agrobakterien-Induktionsmedium-Agarplatten (pH 5,3)

1,5% (w/v) Bacto-Agar,
in tridestilliertem Wasser gelöst,
autoklaviert,
danach 0,4% (v/v) 50 mM Acetosyringon-Lösung und 50% (v/v) 2x Induktionsmedium steril zugesetzt,
Platten gegossen

2x Agrobakterien-Minimalmedium (pH 5,3; Hooykaas *et al.* 1979)

23,5 mM Dikaliumhydrogenphosphat,
21,3 mM Kaliumdihydrogenphosphat,
5,1 mM Natriumchlorid,
3 mM Diammoniumsulfat,
in tridestilliertem Wasser gelöst, mit HCl auf pH 5,3 eingestellt
0,6 mM Calciumchlorid-Dihydrat,
4 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat,
0,02 mM Eisen(II)-sulfat-Heptahydrat,
in tridestilliertem Wasser unter Erwärmen einzeln aufgelöst und die Lösungen nacheinander oben stehendem Puffer zugegeben
zuletzt 22,2 mM Glukose zugegeben,
autoklaviert

100 mM Calciumchlorid-Lösung (eiskalt, chemisch kompetente *E.-coli*-Zellen)

100 mM Calciumchlorid-Dihydrat,
autoklaviert

100 mM Calciumchlorid, 15% Glycerin-Lösung (eiskalt, chemisch kompetente *E.-coli*-Zellen)

100 mM Calciumchlorid,
15% (v/v) Glycerin, autoklaviert

6x DNA-Proben-Ladepuffer

60% (v/v) Glycerin (99,8%),
60 mM Na-EDTA,
0,01% (w/v) Bromphenolblau, autoklaviert

0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)

0,5 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA),
pH 8,0 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

70% Ethanol-Lösung

70% (v/v) Reinst-Ethanol

10x FRIES Medium Nr. 3 (pH 6,0)

0,22 M Saccharose
0,27 M Ammoniumtartrat
0,12 M Ammoniumnitrat
73 mM Kaliumdihydrogenphosphat
20 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat
17 mM Natriumchlorid
8,8 mM Calciumchlorid-Dihydrat
1% (w/v) Hefe-Extrakt
Medium bei -20°C gelagert,
vor Benutzung auf 1x Medium mit tridestilliertem Wasser verdünnt,
pH 6,0 eingestellt und autoklaviert

15% Glycerin-Lagerpuffer (Pilz-Protolasten-Langzeitlagerung)

15% (v/v) Glycerin,
autoklaviert

50% Glycerin-Lagerpuffer (*Taq*-DNA-Polymerase-Langzeitlagerung)

50% (v/v) Glycerin,
25% (v/v) 4x Lagerpuffer,
autoklaviert

75% Glycerin-Lagerpuffer (*Taq*-DNA-Polymerase-Langzeitlagerung)

75% (v/v) Glycerin,
25% (v/v) 4x Lagerpuffer,
autoklaviert

10% Glycerin-Lösung (eiskalt; elektrokompetente *E. coli*-Zellen)

10% (v/v) Glycerin,
autoklaviert,
bis zur Benutzung bei -20°C gelagert

4x Lagerpuffer (*Taq*-DNA-Polymerase-Lagerung; pH 8,0)

200 mM Tris-HCl,
400 mM NaCl,
0,4 mM EDTA,
2 mM Dithiothreitol (DTT),
4% (v/v) Triton X-100
pH 8,0 mit HCl eingestellt

10x MOPS-Puffer (pH 7,0)

200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS),
50 mM Natriumacetat,
10 mM EDTA,
Mit 10 N NaOH pH 7,0 eingestellt,
autoklaviert

3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2)

3 M Natriumacetat,
pH 5,2 mit konzentrierter Essigsäure eingestellt,
autoklaviert

1x PBS (pH 7,3-7,4)

140 mM Natriumchlorid,
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
2,7 mM Kaliumchlorid,
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat,
pH 7,3-7,4 eingestellt,
autoklaviert

10x PCR-Puffer (pH 8,8)

100 mM Tris (pH 8,8),
500 mM Kaliumchlorid,
15 mM Magnesiumchlorid,
1% Triton X-100,
autoklaviert

50% PEG 6000-Lösung (Protoplasten-Transformation)

50% (w/v) Polyethylenglykol (PEG),
in Protoplasten-Puffer 2 gelöst,
sterilfiltriert

20x SSC (DNA-DNA-Hybridisierung; pH 7,0)

3 M Natriumchlorid,
0,3 M Natriumcitrat,
pH 7,0 mit Zitronensäure eingestellt,
autoklaviert

50x TAE-Puffer (pH 8,0)

2 M Tris-Base,
50 mM Na-EDTA,
pH 8,0 mit Essigsäure eingestellt,
autoklaviert

Agrobakterien-Plasmid-Präparationslösung 1

0,9% (w/v) Glukose,
2% (v/v) 0,5 M EDTA-Lösung,
2,5% (v/v) 1 M HCl-Lösung,
0,4% (w/v) Lysozym

Agrobakterien-Plasmid-Präparationslösung 2 (alkalische SDS-Lösung)

10% (v/v) 10%-SDS-Lösung,
4% (v/v) 5 M Natriumhydroxidlösung

Agrobakterien-Plasmid-Präparationslösung 3 (3 M KAc-Lösung)

3 M Kaliumacetat,
pH 5,2 mit konzentrierter Essigsäure eingestellt,
autoklaviert

Agrobakterien-Plasmid-Präparationslösung 4 (alkalische Phenol-Lösung)

6% (v/v) 1 M Natriumhydroxid-Lösung,
mit Phenol gemischt

Ampicillin-Stammlösung (100 mg/ml)

10% (w/v) Ampicillin-Natriumsalz (Sigma-Aldrich),
sterilfiltriert

Beladungspuffer (RNA)

50% (v/v) Glycerin,
1 mM EDTA,
0,25% (w/v) Bromphenolblau,
0,25% (w/v) Xylen Cyanol,
autoklaviert

Calcofluor-Färbelösung (1 mg/ml)

0,1% (w/v) Calcofluor White M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich)

Cefotaxim-Stammlösung (200 mg/ml)

20% (w/v) Cefotaxim-Natriumsalz (Duchefa Biochemie),
sterilfiltriert

Church-Hybridisierungspuffer (DNA-DNA-Hybridisierung; pH 7,5)

500 mM Dinatriumhydrogenphosphat,
0,2% (v/v) 85%ige Phosphorsäure
1% (w/v) Bovines Serumalbumin (BSA),
1 mM EDTA,
7% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)
0,2% (w/v) Lachssperma-DNA,
pH 7,5 mit Phosphorsäure eingestellt,
autoklaviert

DAPI-Stammlösung (1 mg/ml)

0,1% (w/v) 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, Roth),
in 1x PBS-Puffer gelöst,
bis zur Verwendung bei -20°C gelagert

DEPC-Wasser (RNA)

0,1% (v/v) Diethylenpyrocarbonat (DEPC, Roth),
über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert,
autoklaviert,
bis zur Verwendung bei -20°C gelagert

Denaturierungspuffer (DNA-DNA-Hybridisierung)

1,5 M Natriumchlorid
0,5 M Natriumhydroxid,
autoklaviert

Denaturierungspuffer (RNA-Proben)

40% (v/v) deionisiertes Formamid,
36% (v/v) steriles DEPC-Wasser
14% (v/v) Formaldehyd
10% (v/v) steriler 10x MOPS-Puffer (pH 7,0)

DNA-Extraktionspuffer (pH 8,0)

1% (w/v) Sarcosyl,
100 mM Tris,
100 mM Natriumchlorid,
10 mM EDTA,
1% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP),
pH 8,0 mit HCl bzw. NaOH eingestellt, autoklaviert

Entfärbelösung 1 (Pilzmyzelfärbung auf Blattmaterial)

80% (v/v) Reinst-Ethanol,
20% (v/v) Chloroform,
0,15% (w/v) Trichloressigsäure (TCA)

Entfärbelösung 2 (Pilzmyzelfärbung auf Blattmaterial)

33,3% (v/v) Milchsäure,
33,3% (v/v) Glycerin,
33,3% (v/v) tridestilliertes Wasser

Escherichia-coli-Plasmid-Präparationslösung 1 (pH 8,0)

25 mM Tris,
10 mM EDTA,
pH 8,0 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

Escherichia-coli-Plasmid-Präparationslösung 2

0,2 M Natriumhydroxid,
1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS),
autoklaviert

Escherichia-coli-Plasmid-Präparationslösung 3 (pH 5,0)

3 M Natriumacetat,
pH 5,0 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

Glycerin-Magermilch-Lösung (Pilzmyzel-Langzeitlagerung)

20% (v/v) Glycerin,
17% (w/v) Magermilchpulver,
autoklaviert

Hygromycin-Stammlösung (50 mg/ml)

5% (w/v) Hygromycin B in wässriger Lösung (*ready-to-use*, Roth)

IPTG-Stammlösung (0,1 M)

100mM Isopropyl- β -D-thiogalactosid (Roth),
sterilfiltriert

Kanamycin-Stammlösung (50 mg/ml)

5% (w/v) Kanamycin-Sulfat (Roth),
sterilfiltriert

Limabohnenagarplatten

Gesamtmenge an Limabohnen-Extrakt 1:3 mit tridestilliertem Wasser verdünnt,
1,5% (w/v) Bacto-Agar,
nur bei Platten für Protoplastentransfektion noch 0,6 M Saccharose zugegeben,
autoklaviert

Limabohnen-Extrakt

5% (w/v) Limabohnen mit sterilem Wasser autoklaviert.
Bohnen noch heiß im Wasser ausgeschüttelt,
Extrakt filtriert

Luria Bertani (LB)-Medium und Luria Bertani (LB)-Platten (pH 7,0)

1% (w/v) Trypton,
0,5% (w/v) Hefe-Extrakt,
1% (w/v) Natriumchlorid,
nur für Platten noch 1,5% (w/v) Agar-Agar zugesetzt,
pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen und autoklaviert

Membranfärbelösung (Nylonmembranen)

0,5 M Natriumacetat,
0,04% Methyleneblau

Neutralisierungspuffer (DNA-DNA-Hybridisierung; pH 7,0)

1,5 M Natriumchlorid,
1 M Tris,
pH 7,0 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

Phleomycin-Stammlösung (50 mg/ml)

5% (w/v) Phleomycin (Duchefa Biochemie) in 10% Ethanol-Lösung,
sterilfiltriert

Protoplasten-Präparationspuffer 1 (B1; pH 7,5)

10 mM Tris,
0,7 M Kaliumchlorid,
50 mM Calciumchlorid,
pH 7,5 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

Protoplasten-Präparationspuffer 2 (B2; pH 7,5)

10 mM Tris,
50 mM Calciumchlorid,
pH mit HCl auf 7,5 eingestellt,
autoklaviert,
danach 25% (v/v) 4 M Sorbitlösung (steril) zugegeben

Rifampicin-Stammlösung (100 mg/ml)

10% (w/v) Rifampicin (Duchefa Biochemie) in Reinst-Methanol,
sterilfiltriert

RNaseA-Stammlösung (10 mg/ml)

1% (w/v) Ribonuklease A

Spectinomycin-Stammlösung (100 mg/ml)

10% (w/v) Spectinomycin-Sulfat (Duchefa Biochemie),
sterilfiltriert

Taq-DNA-Polymerase-Puffer A (Taq-DNA-Polymerase-Gewinnung; pH 7,9)

50 mM Tris,
50 mM Glukose,
1 mM EDTA,
pH 7,9 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

Taq-DNA-Polymerase-Puffer B (Taq-DNA-Polymerase-Gewinnung; pH 7,9)

10 mM Tris,
50 mM Kaliumchlorid,
1 mM EDTA,
0,5% (v/v) Tween20
0,5% (v/v) Nonidet P-40,
pH 7,9 mit HCl eingestellt,
autoklaviert

Taq-DNA-Polymerase-Puffer 1 (Taq-DNA-Polymerase-Reinigung; pH 8,0)

50 mM Tris,
5% (v/v) Glycerin,
10 mM β -Mercaptoethanol,
pH 8,0 mit HCl eingestellt

Taq-DNA-Polymerase-Puffer 2 (Taq-DNA-Polymerase-Reinigung; pH 8,0)

50 mM Tris,
5% (v/v) Glycerin,
10 mM β -Mercaptoethanol,
100 mM Natriumchlorid,
pH 8,0 mit HCl eingestellt

Taq-DNA-Polymerase-Puffer 3 (Taq-DNA-Polymerase-Reinigung; pH 8,0)

50 mM Tris,
5% (v/v) Glycerin,
10 mM β -Mercaptoethanol,
250 mM Natriumchlorid, pH 8,0 mit HCl eingestellt

Tetracyclin-Stammlösung (10 mg/ml)

1% (w/v) Tetracyclin (Sigma-Aldrich) in Reinst-Ethanol,
sterilfiltriert

TSS-Puffer (elektrokompetente *A.-tumefaciens*-Zellen; pH 6,5-6,8)

10% (w/v) Polyethylenglykol (PEG) 4000,
1% (v/v) 2 M Magnesiumsulfat-Lösung,
pH 6,5-6,8 mit HCl eingestellt,
sterilfiltriert,
danach 5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) zugegeben und bis zur Verwendung auf Eis gekühlt

Trypanblaulösung

33,3% (v/v) Milchsäure,
33,3% (v/v) Glycerin.
25% (w/v) Trypanblau (Sigma-Aldrich)

Trypanblau-Färbelösung (Pilzmyzelfärbung)

50% (v/v) Trypanblaulösung,
50% (v/v) Reinst-Ethanol

Waschlösung 1 (2x SSC, 0,05% SDS; DNA-DNA-Hybridisierung)

10% (v/v) 20x SSC-Puffer,
0,5% (v/v) 10%-SDS-Lösung,
autoklaviert

Waschlösung 2 (0,1x SSC, 0,1% SDS; DNA-DNA-Hybridisierung)

0,5% (v/v) 20x SSC-Puffer,
1% (v/v) 10%-SDS-Lösung,
autoklaviert

X-Gal-Stammlösung (20 mg/ml)

2% (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galctopyranosid (Fermentas) in Dimethylformamid (DMF)

YEB-Medium (pH 7,2-7,3)

0,5% (w/v) Rinder-Extrakt,
0,1% (w/v) Hefe-Extrakt,
0,5% (w/v) Trypton,
0,5% (w/v) Saccharose,
0,2% (v/v) 1 M Magnesiumsulfat-Heptahydrat,
pH 7,2-7,3 mit NaOH eingestellt,
autoklaviert

2.1.6 Bakterienstämme und Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren und Bakterienstämme sind im Einzelnen unten aufgelistet. Die Klonierungsvektoren wurden von den Firmen Invitrogen GmbH und MBI Fermentas GmbH bezogen und wurden größtenteils für Zwischenklonierungsschritte genutzt. Die binären Plasmide sowie pilzlichen Expressionsvektoren standen zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung. Sie wurden als Ausgangsvektoren für sämtliche in der vorliegenden Arbeit hergestellten Konstrukte eingesetzt. Die zugehörigen Vektorkarten sind im Anhang zu finden.

Klonierungsvektoren:	pCR [®] 2.1-TOPO [®] (Invitrogen) (Abb. 7.3.1.1) pJET1.2/blunt (MBI Fermentas) (Abb. 7.3.1.2)
Binäre Vektoren:	pPZP200 (Abb. 7.3.2.1; Hajdukiewicz, 1994) pRcEGFP1 (pPZP200-Derivat; Abb. 7.3.2.2) pPZPtk8.10 (Abb. 7.3.2.3; Gardiner & Howlett, 2004)
Pilzliche Expressionsvektoren:	pAN7-1 (Abb. 7.3.3.1) (Punt, 1987) pAB8.1 (Abb. 7.3.3.3) (pAN8-1-Derivat; Abb. 7.3.3.2; Mattern, 1988)
Bakterienstämme:	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL0 (C58 pTiBo542) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1 (Lazo <i>et al.</i> , 1991) (AGL0 <i>recA::bla</i> pTiBo542ΔT Mop ⁺ Cb ^R) <i>Escherichia coli</i> XL1 blue (<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10(Tetr)</i>]) <i>Escherichia coli</i> DH5α (F ⁺ Φ80 <i>lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)</i> U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1</i>)

2.1.7 Größenstandards

Für die Größen- oder Längenbestimmung von DNA-Fragmenten nach Agarose-Gelelektrophorese wurde ausschließlich „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“, sowie „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder“, ein 1 kb– bzw. 100 bp- DNA-Größenstandard der Firma MBI Fermentas verwendet.

2.1.8 Oligonukleotide und Nukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, www.eurofinsdna.com) synthetisiert.

Für PCR-Reaktionen wurde ein „dNTP Set, 100 mM“ der Firma MBI Fermentas, welches 100 mM-Lösungen aller Einzelnukleotide enthielt, verwendet.

Radioaktiv markiertes α -[³²P]-dATP zur Sondenherstellung wurde jeweils zum Zeitpunkt des Bedarfs von der Firma ICN Biomedicals GmbH (Frankfurt a. M., www.icnbiomed.com) bezogen.

2.2 Geräte, Apparaturen und Verbrauchsmaterial

Geräte	Bezeichnung	Firma
Autoklaven	HICLAVE HV-110l HICLAVE HV-85l	HMC Europe GmbH (Tüßling, www.hmc-europe.eu)
	Varioklav Dampfsterilisator	H+P Labortechnik AG (Oberschleißheim)
Blottingapparatur	Boekel/Appligene Vacuum Blotter	Boekel Scientific (Feasterville, USA, www.boekelsci.com)
Crosslinker	Stratalinker® UV Crosslinker	Stratagene (La Jolla, USA, www.stratagene.com)
Deckgläser	Deckgläser (24 x 24 mm, 18 x 18 mm)	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, www.carl-roth.de)
Digitalkamera	Olympus® E-410, Digital SLR Camera	Olympus Imaging Europa GmbH (Hamburg, www.olympus.de)
Elektrophoresekammern (Mini, 50 ml, horizontal)	Horizon®-58 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Biometra GmbH (Göttingen, www.biometra.com)

	BlueMarine™ 100	SERVA Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, www.serva.de)
Elektrophoresekammern (Midi, 100 ml, horizontal)	MIDI 1 Elektrophoresekammer	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, www.carl-roth.de)
Elektrophoresekammern (Midi, 200-250 ml, horizontal)	BlueMarine™ 200	SERVA Elektrophoresis GmbH (Heidelberg, www.serva.de)
Elektroporator	Gene Pulser® Transfection Apparat	Biorad Laboratories GmbH (München, www3.bio-rad.com)
Feinwaage	Analysenwaage	Sartorius AG (Beucha, www.sartorius.de)
Filterpipettenspitzen	TipOne® 10 µl Graduated Filter Tip (Sterile) TipOne® 20 µl Bevelled Filter Tip (Sterile)	Starlab (Ahrensburg, www.starlab.de)
	Micro-Filterspitze 10 µl für Gilson Micro-Filterspitze 10 µl für Eppendorf Micro-Filterspitze 20 µl für Gilson Filterspitzen 200 µl für Gilson Filterspitzen 1000 µl für Gilson	Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, www.greinerbioone.com)
Fluoreszenz-Messgerät	CytoFluor™ II Microwell Fluorescence Reader	PerSeptive Biosystems (Biosearch Products)
Glasflaschen	Duran® Laborglasflaschen	Schott AG (Mainz, www.schott.com)
Heizblöcke	Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, www.eppendorf.de)
Hybridisierungsöfen	Hybridisierungsofen GFL 7601	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, www.gfl.de)
Hybridisierungsröhren	Hybridisierungsröhre	Appligene (Heidelberg)

Isopropanol-Gefriercontainer	5100 Cryo 1°C Freezing Container, „Mr. Frosty”	Nalgene® Labware, Thermo Fisher Scientific (Rochester, USA, www.nalgenelabware.com)
Kryogene Schraubgefäße	Srew Cap Tubes, graduated, conical	Starlab (Ahrensburg, www.starlab.de)
Homogenisator	Precellys® 24 Homogenisator	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, www.peqlab.de)
Schraubgefäße für Homogenisator	Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt (Nürnberg, www.sarstedt.com)
Membranen	Roti®-Nylon plus	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, www.carl-roth.de)
Mikroskope	Stereomikroskop Stemi 2000 Hellfeld- bzw. Fluoreszenz-Mikroskop Axio Imager	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen, www.zeiss.com)
	Hellfeld- bzw. Fluoreszenz-Mikroskop Leitz DMIL Stereo-Fluoreszenz-Mikroskop Leica MZ FLIII	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, www.leica-microsystems.com)
Objektträger	Standard-Objektträger	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, www.carl-roth.de)
Objektträger mit Medien-Kammern	Lab-Tek™-Chamber Slide™ System, 2 well	Nunc GmbH & Co KG (Wiesbaden, www.nuncbrand.com)
PCR-Cycler	MJ Mini Gradient Thermal Cycler	Biorad Laboratories GmbH (München, www3.bio-rad.com)
	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research, Inc. (Waltham, USA)
pH-Meter	pH meter lab 850	Schott Instruments GmbH (Mainz, www.si-analytics.com)
Phosphorscreens	Storage Phosphor Screen	GE Healthcare (München, www.gehealthcare.com)

Pipetten	Pipetman [®] P (P2, P20, P100, P200, P1000 und P5000)	Gilson, Inc. (Middleton, USA, www.gilson.com)
	Eppendorf Research [®] (variable 0,1-2 µl) Eppendorf Reference [®] (variable 0,5-10 µl)	Eppendorf AG (Hamburg, www.eppendorf.de)
Pipettenspitzen	Pipettenspitzen Typ Gilson [®] (05-10 µl, 21-200 µl, 201-1000 µl)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, www.greinerbioone.com)
Pilzanzuchtschrank	Incubator IS-K	Eurotherm Deutschland GmbH (Limburg, www.eurotherm-deutschland.de)
Reaktionsgefäße PCR (0,2 ml)	8-Strip PCR tubes with individual attached flat caps	Starlab (Ahrensburg, www.starlab.de)
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	1,5 ml-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nürnbrecht, www.sarstedt.com)
	2 ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, www.eppendorf.de)
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	Polypropylen-Röhrchen (konisch, 15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, www.greinerbioone.com)
Real-Time-PCR-Cycler	Mx3005P [™] QPCR System	Stratagene (La Jolla, USA, www.stratagene.com)
Säulen für Radioaktivität	illustra [™] ProbeQuant [™] G-50 Micro Columns	GE Healthcare (München, www.gehealthcare.com)
Scanner für Phosphorscreens	Typhoon [™] Imager	GE Healthcare (München, www.gehealthcare.com)
Serologische Einmalpipetten	Falcon [®] Sterile Pipetten	Beckton Dickinson Labware (Heidelberg, www.bd.com)
Sterilisator	T12 Function Line Trockenschrank	Heraeus Instruments GmbH
Spektrophotometer	Nanophotometer [™] UV/VIS Spektrophotometer	IMPLEN GmbH (München, www.implen.de)
Transilluminator	GeneGenius Bioimaging System	Syngene (Cambridge, UK, www.syngene.com)

Vortex	Vortex-Genie2	Scientific Industries, Inc. (New York, USA, www.scientificindustries.com)
Waagen	Präzisionswaagen	Sartorius (Beucha, www.sartorius.de)
Wasserbad	Inkubationsbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, www.gfl.de)
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal- Zählkammer	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, www.carl-roth.de)
Zellkulturröhrchen	Cellstar® Polystyrol Zellkultur Röhrchen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, www.greinerbioone.com)
Zellkultur-Multiwell- Platten	Cellstar® 6 Well Zellkultur Multiwell Platte	Greiner Bio-One (Frickenhausen, www.greinerbioone.com)
Zellkultur-Schalen	Cellstar® Zellkulturschale (35 mm, 100 mm und 145 mm)	Greiner Bio-One (Frickenhausen, www.greinerbioone.com)
Zentrifugen	5804R 5810 R 5403 5415 C	Eppendorf AG (Hamburg, www.eppendorf.de)
	Avanti™ J-25	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, www.beckmancoulter.de)
Zerstäuber- Inokulationsflaschen	Zerstäuberflaschen	Carl-Roth GmbH (Karlsruhe, www.carl-roth.de)

Tabelle 2.2: Zusammenstellung der genutzten Geräte, Apparaturen und Verbrauchsgegenstände

2.3 Methoden

Alle in dieser Arbeit durchgeführten molekularbiologischen Standardtechniken sind, sofern nicht anders beschrieben, bei Sambrook *et al.* (1989) nachzulesen.

2.3.1 Arbeiten mit Organismen

2.3.1.1 Pflanzenanzuchtbedingungen

Die Anzucht aller Gerstensorten (*Hordeum vulgare* L cv. Ingrid, Atlas und Atlas 46) erfolgte in einer Pflanzenanzuchtkammer (Heraeus/Vötsch GmbH, Hanau), um während des Wachstums und der Dauer der entsprechenden Versuchsreihen folgende Umweltbedingungen konstant zu halten:

Temperatur:	17°C
Luftfeuchte:	50%
Lichtintensität:	16,67 klx (300 $\mu\text{Mol/m}^2\text{s}$)

Die Pflanzen erhielten über den gesamten Versuchszeitraum Langtagbedingungen, welchen jeweils 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit entsprachen.

Die Aussaat der Gerste erfolgte in runden Kunststofftöpfen, mit einem Durchmesser von zehn Zentimetern. Die Anzuchterde ED73 wurde zuvor zwei Stunden bei 120°C gedämpft, mit festem Dauerdünger Osmocete® plus der Firma Scotts Europe B.V. gedüngt und 2:1 mit Sand gemischt.

Die Pflanzen wurden in Gewächshäusern, welche zuvor mit feuchtem Perlit-Dämmstoff gefüllt wurden, sieben Tage bei geschlossenem Deckel in der Versuchskammer angezogen.

2.3.1.2 Kultivierung der *Rhynchosporium-commune*-Isolate

Kultivierung auf Agarplatten

Zur Pilzanzucht auf Agarplatten wurde Limabohnenagar mit Konidiosporen der entsprechenden Isolate in einer Konzentration von 5×10^5 Sporen/ml beimpft. 10 ml der Sporensuspension wurden über 10-20 Platten verteilt und unter der Sterilbank getrocknet. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und 14 Tage im Pilzanzuchtschrank bei 17°C und Dunkelheit inkubiert.

Kultivierung im Flüssigmedium

Zur Anzucht von Pilzmyzel in FRIES-Medium Nr. 3 wurden je nach Versuchsreihe große Zellkulturschalen (145 mm Durchmesser) oder Sechs-Well-Zellkulturplatten genutzt. Große Schalen wurden mit 1×10^5 , Sechs-Well-Platten mit 1×10^4 Konidiosporen pro Well beimpft. Neu generierte Pilztransformatanten, bei denen noch keine Sporenisolation erfolgen konnte, wurden durch Zugabe von 1 bis 2 cm großen Agarstückchen in das Flüssigmedium angezogen. Die Schalen bzw. Multiwellplatten wurden bei 17°C und Dunkelheit im Pilzanzuchtschrank auf einem Schüttler bei 40 bis 50 rpm 10-14 Tage inkubiert.

2.3.1.3 Kultivierung der Bakterienstämme

Kultivierung auf Agarplatten

Sowohl die in dieser Arbeit genutzten *Escherichia coli*-, als auch die *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme wurden auf Luria-Bertani-Platten angezogen. Für beide Bakterienstämme wurden dem Medium zuvor die für die jeweiligen Plasmide wichtigen Antibiotika zugegeben (Konzentrationsangaben Antibiotika, s. Tabelle 2.3). Agrobakterien-Platten enthielten grundsätzlich Rifampicin. Die beimpften Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 37°C 16 Stunden (*Escherichia coli*), bzw. bei 30°C 48 Stunden (*Agrobacterium tumefaciens*) in Dunkelheit inkubiert.

Kultivierung im Flüssigmedium

Die Anzucht aller genutzten Bakterienstämme erfolgte im Luria-Bertani-Flüssigmedium in Kunststoff-Zellkultur-Röhrchen (5 ml) bzw. sterilen Glas-Erlenmeyerkolben (10-100 ml). Enthielten die verwendeten Stämme Plasmide, wurden dem Medium zuvor die entsprechenden Antibiotika zur Selektion zugegeben. Agrobakterien wurden immer unter Zugabe von Rifampicin angezogen. Die Inkubation erfolgte im Schüttler bei 37°C 16 Stunden (*Escherichia coli*), bzw. 30°C 48 Stunden (*Agrobacterium tumefaciens*) in Dunkelheit.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 µg/ml
Cefotaxim	100 µg/ml
Hygromycin B	100 µg/ml
IPTG	1 mM
Kanamycin	30 µg/ml
Phleomycin	20 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml
Spectinomycin	50 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml
X-Gal	80 µg/ml

Tabelle 2.3: Konzentrationsangaben der für die Anzuchtmedien verwendeten Antibiotika und anderer Zusätze

2.3.1.4 Pflanzeninokulation

Inokuliert wurden ausschließlich die Primärblätter sieben Tage alter Gerstenpflanzen mit Konidiosporen von *R. commune*. Die Sporen wurden in einer 0,1%igen Tween20-Lösung aufgenommen und mittels Zerstäuber-Fläschchen auf die Pflanzen gesprüht. Pro 10 Pflanzen wurden 1×10^7 Sporen ausgebracht. Um eine möglichst hohe Infektionsrate zu erreichen, war während der ersten Phase eine hohe Luftfeuchte sowie Dunkelheit wichtig. Dazu wurden die Töpfe mit den frisch inokulierten Pflanzen in einer mit Wasser gefüllten Anzuchtschale unter geschlossenem Gewächshausdeckel 48 Stunden inkubiert. Während der ersten 24 Stunden wurden sie zusätzlich durch eine schwarze Kunststoffplane abgedunkelt. Nach zwei Tagen wurde der Gewächshaus-Deckel entfernt und die Töpfe in Perlit gestellt, welches während der folgenden drei Wochen möglichst feucht gehalten wurde.

2.3.1.5 Ernte des Pflanzenmaterials

Für Versuchszwecke wurden nur die Primärblätter der Gerstenpflanzen geerntet. Diese wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation abgeschnitten, in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für die Dokumentation der Blattsymptome sowie Mikroskopie-Aufnahmen wurden die Pflanzen zumeist nach sieben, 14 und 21 Tagen geerntet. Das Blattmaterial für Wachstums- und Expressionskinetiken wurde nach 0 d, 1 d, 3 d, 6 d, 10 d, 14 d und 21 d eingefroren.

2.3.1.6 Ernte des Pilzmaterials

Sporenisolierung von Limabohnenagarplatten

Um eine höchstmögliche Anzahl an Konidiosporen zu erhalten wurden in einem Ansatz 10-20 Limabohnenplatten abgeerntet. Dazu wurden 10 ml steriles tridestilliertes Wasser auf die erste Platte gegeben und die Sporen mit einer sterilen Einmal-Pipette abgelöst. Danach wurde die so entstandene Sporensuspension auf die nächste Platte überführt um erneut die Sporen abzulösen. Dieser Vorgang wurde über vier bis fünf Platten wiederholt. Die so erhaltene Sporensuspension wurde über einen sterilen, mit Glaswolle gefüllten, Glastrichter in ein 50 ml Reaktionsgefäß filtriert und mit 5 bis 10 ml sterilem Wasser gewaschen. Um die so erhaltenen Sporen zu sedimentieren, wurden diese 15 Minuten bei 17°C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in einer geeigneten Menge sterilen Wassers aufgenommen und die Sporen in einer 1:200-Verdünnung mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer am Leitz DMIL-Mikroskop ausgezählt. Zur Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 16 Kleinquadrate gezählt und die Menge aller lebenden Sporen mittels unten stehender Formel (Formel 2.1) berechnet.

$$c[\text{Sporen/ml}] = \frac{n \times 16 \times 5000 \times \text{VF} \times 2}{3}$$

Formel 2.1: Formel zur Berechnung der Sporenkonzentration pro ml (n = durchschnittliche Menge der gezählten Sporen; VF = Verdünnungsfaktor der Sporensuspension)

Die Sporensuspension wurde auf eine Konzentration von 5×10^7 Sporen/ml eingestellt und diese in 200-400 μl -Aliquots zunächst bei -20°C und nach weiteren 24 Stunden bei -80°C eingefroren.

Ernte des Pilzmyzels aus Flüssigmedium

Um das Pilzmyzel vom Flüssigmedium zu trennen, wurde dieses über einen mit Filterpapier (Durchmesser 70 mm, 80 g/m^2 , Sartorius AG) ausgelegten Büchner-Trichter in eine Saugflasche filtriert, welche mit einer Wasserstrahlpumpe verbunden war. Das auf dem Filter befindliche Myzel wurde gewogen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

2.3.1.7 Herstellung von Gefrier- und Dauerkulturen

Herstellung kryogener Dauerkulturen von *R. commune*

Auf Limabohnenagarplatten angezogenes Pilzmyzel konnte zur Überdauerung in flüssigem Stickstoff eingelagert werden. Dazu wurden mit Hilfe der Oberseite einer sterilen Pasteurpipette kleine Scheiben aus einer mit Pilzmyzel bewachsenen Platte ausgestochen. Mit einem sterilen Holzstäbchen wurden jeweils fünf bis sechs dieser Scheiben in ein kryogenes Schraubgefäß überführt und mit 1 ml einer sterilen 1:1-Mischung aus 20%igem Glycerin und 17%iger Magermilchlösung bedeckt. Die Kulturen wurden danach zunächst für 24 bis 48 Stunden in einem kryogenen mit 100% Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C gelagert. Während dieses Zeitraums wurden die Kulturen schrittweise um 1°C pro Stunde abgekühlt und konnten danach in flüssigem Stickstoff dauergelagert werden.

Dauerhafte Lagerung von *R.-commune*-Sporen auf Siedesteinen

Um Pilzsporen dauerhaft zu lagern kann man sie auf Siedesteine aufbringen, wo sie auf Grund der porösen Beschaffenheit des Materials gut haften. Dazu wurde die zuvor isolierte Sporensuspension (mindestens 5×10^7 Sporen/ml) in eine sterile Petrischale gegeben und ca. 50 Siedesteine hinzugefügt. Alle Steine sollten vollständig von der Sporensuspension bedeckt sein. Die Petrischale wurde so lange unter der Sterilbank stehen gelassen, bis die Sporensuspension vollständig von den Steinen absorbiert wurde. Danach wurde ein 50 ml Reaktionsgefäß bis zur 30 ml-Marke mit sterilem Silicagel gefüllt, darüber eine Schicht sterile Glaswolle gebracht, auf welche die Siedesteine transferiert wurden und diese mit einer zweiten Schicht Glaswolle abgedeckt. Das Reaktionsgefäß wurde mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert. Das Silicagel wurde von Zeit zu Zeit ausgetauscht um die Sporen trocken zu halten.

Herstellung bakterieller Gefrierkulturen

Sowohl *Escherichia-coli*- als auch *Agrobacterium-tumefaciens*-Stämme wurden in Glycerinlösungen dauergelagert. Dazu wurden zunächst 5 ml Übernachtskulturen in LB-Medium angesetzt, indem die Zellen von der Platte mit einer sterilen Pipettenspitze in das Medium mit den entsprechenden Antibiotika überführt wurden. *E.-coli*-Kulturen wurden 16 Stunden bei 37°C, *A.-tumefaciens* 48 Stunden bei 30°C schüttelnd inkubiert. 500 µl der Kulturen wurden dann mit 500 µl steriler 50%iger Glycerinlösung gemischt, in kryogene 2 ml Schraubgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.1.8 Herstellung transformationskompetenter *E.-coli*- und *A.-tumefaciens*-Zellen

Herstellung elektrokompeter *Escherichia-coli*-Zellen

Für die Herstellung elektrokompeter *E.-coli*-Zellen wurde ein XL1-blue-Stamm genutzt. Die Zellen wurden zunächst über Nacht auf einer Tetracyclin enthaltenden LB-Platte bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag konnten 5 ml einer wiederum mit Tetracyclin versetzten LB-Kultur mit einer Kolonie der Zellen angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert werden. Die gesamte Kultur wurde am dritten Tag in einem Liter LB-Tetracyclin-Medium gegeben und in einem sterilen Zwei-Liter-Erlenmeyerkolben bei 37°C geschüttelt bis die bei 600 nm gemessene optische Dichte der Bakteriensuspension zwischen 0,5 und 0,7 betrug. Die gesamte Kultur wurde auf sechs, zuvor auf Eis gekühlten, 250 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und bei 4°C und 5000g für 20 Minuten sedimentiert. Die Zellen wurden nun in drei aufeinanderfolgenden Schritten mit sterilem tridestilliertem eisgekühltem Wasser gewaschen. Im ersten Waschschrift wurde pro Zentrifugenröhrchen mit 170 ml Wasser gewaschen und bei 4°C und 5000g für 15 Minuten zentrifugiert. In der zweiten Waschphase wurden die Sedimente jeweils dreier Röhrchen zu einem vereinigt und die verbliebenen zwei Zellsuspensionen erneut mit jeweils 175 ml Wasser 15 Minuten bei 4°C und 5000g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde im dritten Waschschrift wiederholt und die Zellsedimente danach kurz auf Filterpapier steril getrocknet. Die Zellen wurden danach in 50 ml steriler eisgekühlter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und bei 5000g und 4°C erneut zehn Minuten zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellsedimente wurden in jeweils 2 ml sterilem 10% Glycerin aufgenommen, als 50 µl-Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen konnten danach bei -80°C gelagert und sechs Monate für Transformationsreaktionen genutzt werden.

Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia-coli*-Zellen

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E.-coli*-Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. Zellen des Stamms DH5α wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium angezogen. Mit 1 ml dieser Kultur wurden am nächsten Tag 100 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und diese unter Schütteln bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,4 inkubiert. Die Zellen wurden zehn Minuten auf Eis abgekühlt, in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und sieben Minuten bei 4°C und 3300g sedimentiert. Das Sediment wurde mit 100 mM Calciumchlorid-Lösung (steril und gekühlt) gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 3000g, 4°C). Die Zellen wurden nun in 100 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem dritten Zentrifugationsschrift (5 min, 3000g, 4°C) wurden die Zellen in 2 ml 100 mM CaCl₂, 15% (v/v) Glycerin aufgenommen und erneut 30 Minuten bei 0°C stehen gelassen.

Danach wurden 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -80°C ein halbes Jahr gelagert werden.

Herstellung chemisch kompetenter *Agrobacterium-tumefaciens*-Zellen

Eine Rifampicin enthaltende Übernachtkultur des *A.-tumefaciens*-Stamms AGL0 wurde zwei Tage bei 28°C unter Schütteln angezogen. 1 ml dieser Kultur wurde in 100 ml LB-Medium gegeben und weiterhin bei 28°C geschüttelt bis die bei 660 nm gemessene optische Dichte zwischen 0,4 und 0,6 lag. Die Zellen wurden bei 4°C und 4000 rpm zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment in 5 ml eiskaltem TSS-Puffer resuspendiert. 200 µl-Aliquots der Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C drei Monate zu Transformationszwecken gelagert.

2.3.1.9 Transfektions- und Transformationsmethoden

Agrobakterien-vermittelte Transfektion von *Rhynchosporium commune*

Für die Agrobakterien-vermittelte Transfektion von *R. commune* wurden zunächst Zellen des *Agrobacterium-tumefaciens*-Stammes AGL0, welche den gewünschten binären Vektor enthielten, in 5 ml LB zwei Tage bei 30°C angezogen. Dem Medium wurde zuvor Rifampicin und das auf das Plasmid selektierende Antibiotikum zugesetzt. Am Tag der Transfektion wurden 1:5-, 1:10- und 1:20-Verdünnungen der Bakterien-Suspension mit 1x Induktionsmedium/50 mM Acetosyringon hergestellt und die OD bei 660 nm bestimmt. Die Original-Kultur wurde mit 1x IM-Acetosyringon auf eine OD₆₆₀ von 0,15 verdünnt und die Zellen weitere sechs Stunden bei 28°C schüttelnd inkubiert.

Zur Transfektion wurden sterile 0,45 µm-Filter auf zehn frisch gegossenen 1x IM-Platten ausgelegt. 100 µl einer konzentrierten *R. commune*-Sporenlösung (5×10^6 Sporen) wurden mit 100 µl der Agrobakterien-Suspension gemischt und auf dem Filter ausplattiert. Die IM-Platten wurden zwei Tage bei 19-25°C in Dunkelheit inkubiert.

Nach diesem Zeitraum wurden die Filter mittels einer sterilen Pinzette auf Limabohnenagarplatten umgesetzt, welche das auf positive Transformanden selektierende Antibiotikum, sowie Cefotaxim zum Abtöten der Agrobakterien enthielten (Mullins *et al.*, 2001). Diese Platten wurden bei 17°C im Dunkeln inkubiert, bis Pilzkolonien zu sehen waren. Die pilzlichen Transformanden wurden dann auf neue Limabohnenagarplatten umgesetzt, welche nur noch das auf das eingesetzte Plasmid selektierende Antibiotikum enthielten.

Protoplastentransfektion von *Rhynchosporium commune*

Für die Protoplastentransfektion von *R. commune* musste zunächst Myzel des zu transfizierenden Pilzes angezogen werden. Dies geschah zehn Tage vor der Protoplastierung in großen sterilen Petrischalen, welche bei 17°C geschwenkt wurden. Am Tag der Transfektion wurde das Myzel mit Hilfe steriler Einmal-Pipetten in 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt, fünf Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert und gewogen. Pro Protoplastierung sollten nicht mehr als 2-3 g Myzel eingesetzt werden. Das Myzel wurde in 20 ml Protoplastenpuffer 1 (B1) aufgenommen und bei 5000 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 5 ml B1 resuspendiert. Mit einem Ultraturrax wurde das Myzel fünf Sekunden bei voller Leistung homogenisiert und erneut bei 5000 rpm fünf Minuten abzentrifugiert. 125 mg des, pilzliche Zellwände abbauenden, *Lysing Enzyme* aus *Trichoderma harzianum* wurden steril abgewogen und in 10 ml B1 gelöst. Das homogenisierte Myzel wurde in 15 ml B1 aufgenommen, die, das Enzym enthaltende, Lösung zugegeben und selbige sechs Stunden bei 29°C und 40 rpm auf einem Schüttler inkubiert.

Nach der Protoplastierung wurde die gesamte Lösung durch einen sterilen Filter mit Glaswolle gegeben und mit 25 ml B1 nachgespült. Die Pilzprotoplasten wurden fünf Minuten bei 4800 rpm sedimentiert, danach vorsichtig in 30 ml B1 gelöst und erneut zentrifugiert (4800 rpm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 0,5-2 ml (je nach Größe des Sediments) B1 resuspendiert. Der Titer der Lösung wurde mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und die Menge an erhaltenen Protoplasten wie bei einer Sporenlösung berechnet (s. Formel 2.1). Die Protoplasten wurden mit B1 auf eine Konzentration von 5×10^7 Protoplasten/ml eingestellt und für die Transformation eingesetzt.

200 µl der Protoplasten-Lösung wurden mit 1-2 µl des einzusetzenden Plasmids gemischt. Danach wurden 500 µl einer 50%igen PEG 6000-Lösung in Protoplastenpuffer 2 (B2) zugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde in 140 µl-Aliquots auf zuvor gegossene Limabohnenagarplatten mit 0,6 M Saccharose gegeben und mit zusätzlichen 300 µl B2 verteilt. Die Platten wurden steril getrocknet, mit Parafilm verschlossen und bei 17°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das für die Selektion positiver Transformanden erforderliche Antibiotikum in einer Lösung mit 1x FRIES-Medium auf den Platten verteilt und diese 10-14 Tage bei 17°C und Dunkelheit stehen gelassen. Die nach dieser Zeit gewachsenen Pilztransformanden wurden auf neue Limabohnenagarplatten mit Antibiotikum umgesetzt und angezogen.

Verbleibende Protoplasten, welche nicht zur Transfektion eingesetzt wurden, konnten bei 4800 rpm vier Minuten sedimentiert und in einem je nach Sedimentgröße ermittelten Volumen 15%iger Glycerinlösung aufgenommen werden. Die Lösung wurde in 200 µl-Aliquots in mehrere 1,5 ml-Reaktionsgefäßen aufgeteilt und in einem Isopropanol-Kryo-

Gefäß langsam eingefroren. Die Pilzprotoplasten waren so bei -80°C noch einige Wochen haltbar und konnten für noch folgende Transfektionen eingesetzt werden.

Transformation von elektrokompetenten *Escherichia-coli*-Zellen

Elektrokompetente *E.-coli*-Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. Dazu wurden zunächst Quarzküvetten auf Eis abgekühlt. Die elektrokompetenten XL1-blue-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Zu transformierende Ligationsansätze wurden vorher bei 65°C im Heizblock fünf bis sieben Minuten abgestoppt. Plasmide konnten direkt zur Transformation eingesetzt werden. 30 µl der aufgetauten Zellsuspension wurden in eine Küvette pipettiert und 1 µl des Ligationsansatzes bzw. 0,5 µl einer Plasmidpräparation zugegeben. Die Küvette wurde in den Elektroporator gestellt und bei 2,5 kV und 25 µF geschockt. Danach wurden die Zellen sofort in 500 µl LB-Medium gegeben und bei 37°C im Heizblock eine Stunde geschüttelt. 50-100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf LB-Platten mit Antibiotika ausplattiert. Handelte es sich um einen Transformationsansatz mit Blau-Weiß-Selektion wurden zuvor auf den Platten noch IPTG sowie X-Gal ausgestrichen. Die Platten wurden 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia-coli*-Zellen

Zu den auf Eis stehenden kompetenten DH5α-Zellen wurden 5 µl des Ligationsansatzes bzw. 1 µl einer Plasmidpräparation gegeben. Die Zellen wurden nun 20 Minuten im Eisbad aufgetaut und dabei einmal sehr sanft gemischt. Um den Transformationsansatz mit Hitze zu schocken, wurden die Zellen exakt eine Minute bei 41°C im Heizblock inkubiert. Danach stellte man die Zellen sofort auf Eis für zwei Minuten. Nachdem 650 µl raumtemperiertes LB-Medium zugegeben wurde, inkubierte man die Zellen eine Stunde bei 37°C schüttelnd im Heizblock. 100-200 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von chemisch kompetenten *Agrobacterium-tumefaciens*-Zellen

Kompetente *Agrobacterium-tumefaciens*-Zellen des Stammes AGL0 wurden auf Eis langsam aufgetaut. Circa 6 µg der Plasmid-DNA wurden zugegeben und der gesamte Ansatz in flüssigem Stickstoff für eine Minute schockgefroren. Ein Hitzeschock der Zellen erfolgte danach für sechs Minuten im 37°C-Heizblock. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Zellen zwei Stunden bei 30°C geschüttelt. Danach konnten 100-200 µl des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit Rifampicin sowie der transformierten Plasmid-DNA entsprechenden Antibiotika ausplattiert werden.

2.3.2 RNA-Analysen

2.3.2.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus *Rhynchosporium commune* bzw. *Hordeum vulgare* erfolgte durch den „RNeasy Mini Kit“ der Firma QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben (Protokoll: Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Pflanzenzellen, Geweben und filamentösen Pilzen). Bei diesem System wird die RNA über eine Silica-Membran gebunden und über ein konzentriertes Salz-Puffer-System aufgereinigt. Man erhält sehr reine RNA, die unter anderem für cDNA-Herstellung und anschließende semiquantitative sowie quantitative PCR-Reaktionen einsetzbar ist. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde durch ein Nano-Spektrophotometer bestimmt und 3-5 µl auf einem 1%igen Agarosegel zur Überprüfung aufgetrennt. Die Proben wurden danach mit jeweils 1 µl Ribolock™ RNase-Inhibitor versetzt bei -80°C eingefroren.

2.3.2.2 Abbau von Verunreinigungen genomischer DNA aus RNA-Proben

Für die Herstellung von cDNA aus der isolierten RNA musste diese zunächst von Verunreinigungen genomischer DNA befreit werden. Dies geschah durch Zugabe von rekombinanter RNase-freier DNaseI der Firma Roche nach Herstellerangaben. Die vollständige Beseitigung der DNA wurde durch eine PCR auf die verdauten RNA mit 50 Zyklen überprüft (s. 2.3.3.2).

2.3.2.3 Herstellung von cDNA

Die Synthese von cDNA erfolgte mit der zuvor DNase-verdauten Gesamt-RNA. Dazu wurde ein „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma MBI Fermentas nach Herstellerangaben genutzt. Es wurden 5 µg der RNA eingesetzt. Als Start-Oligonukleotid wurde ein Oligo(dT)₁₈-Primer verwendet. Die so synthetisierte cDNA wurde danach durch eine PCR auf ein konstitutiv exprimiertes Gen überprüft. Für Real-Time-PCR eingesetzte cDNA wurde zuvor 1:10 verdünnt mit entionisiertem Wasser und bei -20°C gelagert.

2.3.3 DNA-Analysen und Klonierung

2.3.3.1 Isolierung von genomischer DNA

DNA-Isolierung mit Phenol-Chloroform-Extraktion

Um eine hohe Ausbeute zu erhalten, wurde für die Isolierung von genomischer DNA aus Gersten- sowie Pilzzellen die Phenol-Chloroform-Extraktion genutzt. Dazu wurde zunächst das zuvor bei -80°C eingefrorene Pilzmyzel bzw. die Blattproben in einem sterilen, durch flüssigen Stickstoff vorgekühlten Mörser homogenisiert und in 1 ml DNA-Extraktionspuffer pro 1 ml des gemörserten Materials in 50 ml-Reaktionsröhrchen aufgenommen. Für kleinere Mengen Pilzmaterials erfolgte die Homogenisierung in Kunststoff-Schraubgefäßen durch eine Kugelmühle im Extraktionspuffer (dreimal 30 Sekunden bei 6800 rpm). Um die in den Proben enthaltene RNA zu verdauen, wurde dem Gemisch 30 μl RNase A (10 mg/ml) pro 1 ml Extraktionspuffer zugegeben und der Ansatz 15 Minuten bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) pro 1 ml Extraktionspuffer, der sich eine Inkubationsphase von 15 Minuten bei Raumtemperatur anschloss. Das Gemisch wurde durch 15 Minuten Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C (Kugelmühlen-Proben 15 Minuten, 14000 rpm, 4°C) in eine organische, eine wässrige Phase und eine proteinhaltige Interphase aufgetrennt. Die obere wässrige Phase enthielt die genomische DNA. Diese wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100 % Isopropanol pro 1 ml Lösung gefällt. Nach einer 10-minütigen Inkubationsphase bei 4°C (oder über Nacht) wurde die DNA bei 12000 rpm und 4°C zehn Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen (10 min, 12000 rpm, 4°C) und dann bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Sedimentgröße konnte die isolierte DNA dann in 100-200 μl tridestilliertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert werden.

Isolierung genomischer DNA mit QIAGEN

Um besonders reine genomische DNA zu erhalten, konnte diese aus Blattmaterial und Pilzmyzel mit dem „DNeasy Plant Mini Kit“ der Firma QIAGEN isoliert werden. Dazu wurde nach Herstellerangaben verfahren (Protokoll: Aufreinigung von Gesamt-DNA aus Pflanzenzellen – Mini-Protokoll). Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde mit einem Nanophotometer bestimmt und zur Überprüfung 3-5 μl auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.3.3.2 Polymerase-Kettenreaktionen

Kolonie-PCR

Sind nach einer *E.-coli*-Transformation Kolonien auf den LB-Selektionsplatten zu sehen, enthalten diese Zellen mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Vektor mit dem gewünschten inserierten DNA-Fragment. Kann ein Blau-Weiß-Selektionssystem nicht angewandt werden, empfiehlt es sich auf die gewachsenen Zellen eine Kolonie-PCR durchzuführen, um positive Klone eindeutig zu identifizieren. Dazu wurde eine Vielzahl an Kolonien (zwischen 10 und 20) mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte gepickt, zunächst auf einer *Masterplate* erneut ausgestrichen und danach direkt in den vorpipettierten PCR-Ansatz gegeben.

Kolonie-PCR-Ansatz:

Kolonie von LB-Platte	<i>Template</i> -DNA
2 µl (1x)	10x PCR-Puffer
2 µl (2,5 mM)	25 mM Magnesiumchlorid
1 µl (0,5 mM)	10 mM Desoxynukleotid-Mix
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Senseprimer</i> (passend für eingesetzten Vektor)
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Antisenseprimer</i> (passend für eingesetzten Vektor)
1 µl (~0,5 U)	0,5 U/µl <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (rekombinant)
ad 20 µl	steriles entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	5 min	Denaturieren
30 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	45-65°C	30 sec	<i>Annealing</i> (abhängig vom eingesetzten <i>Primer</i> -Paar)
	72°C	30 sec-2 min	Synthese (abhängig von der Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes)
1 Zyklus	72°C	5- 10 min	Nachsynthese
	14°C	∞	

Gradienten-PCR

Um neu synthetisierte Oligonukleotide richtig einsetzen zu können, wurden diese zunächst in einer Gradienten-PCR getestet. Dazu wurde ein 15-facher PCR-Mastermix hergestellt, in 12 PCR-Reaktionsgefäße verteilt und danach die *Template*-DNA zugegeben. Der Gradienten-PCR-Block wurde nun so programmiert, dass während der PCR für jedes Reaktionsgefäß eine andere *Annealing*-Temperatur genutzt wurde. Die nachträgliche Auftrennung der PCR auf einem 1%igen Agarosegel ermöglichte die Identifizierung der für die Oligonukleotide passenden Schmelztemperatur.

Gradienten-PCR-Ansatz:

1 µl (20-100 ng)	<i>Template-DNA</i>
2 µl (1x)	10x PCR-Puffer
2 µl (2,5 mM)	25 mM Magnesiumchlorid
1 µl (0,5 mM)	10 mM Desoxynukleotide
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Senseprimer</i>
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Antisenseprimer</i>
1 µl (~0,5 U)	0,5 U/µl <i>Taq-DNA-Polymerase</i> (rekombinant)
ad 20 µl	steriles entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	2 min	Denaturieren
30 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	45-65°C	30 sec	<i>Annealing</i>
	72°C	30 sec-4 min	Synthese (abhängig von der Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes)
1 Zyklus	72°C	5-10 min	Nachsynthese
	14°C	∞	

Touch-down-PCR

Ist trotz vorangegangener Gradienten-PCR das gewünschte DNA-Fragment in unzureichender Menge vorhanden oder ist die PCR zu unspezifisch, empfiehlt es sich eine *Touch-down-PCR* durchzuführen. Bei diesem Vorgang wird die Spezifität der Bindung der Oligonukleotide durch schrittweise Annäherung der *Annealing*-Temperatur an die Schmelztemperatur derselben (pro Zyklus 1°C) erhöht. Wird die *Annealing*-Temperatur höher als die Schmelztemperatur der Oligonukleotide gewählt, binden diese hochspezifisch an die DNA. Damit werden *Primer*-Dimere und Artefakte verhindert und so die Menge des gewünschten Amplikons erhöht.

Touch-down-PCR-Ansatz:

1 µl (20-100 ng)	<i>Template-DNA</i>
2 µl (1x)	10x PCR-Puffer
2 µl (2,5 mM)	25 mM Magnesiumchlorid
1 µl (0,5 mM)	10 mM Desoxynukleotide
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Senseprimer</i>
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Antisenseprimer</i>
1 µl (~0,5 U)	0,5 U/µl <i>Taq-DNA-Polymerase</i> (rekombinant)
ad 20 µl	steriles entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	2 min	Denaturieren
11 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	60°C	30 sec	<i>Annealing</i> (die Temperatur wird je Zyklus um 1°C verringert)
	68°C	30 sec-5 min	Synthese
32 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	50°C	30 sec	<i>Annealing</i>
	68°C	30 sec-5 min	Synthese
1 Zyklus	68°C	5-10 min	Nachsynthese
	14°C	∞	

Multiplex-PCR

Um in einer PCR mehr als ein DNA-Fragment nachzuweisen, wurden Multiplex-PCR-Ansätze durchgeführt. Dabei wurden zwei Oligonukleotid-Paare im 1:1-Mix eingesetzt. Die Reaktion wurde bevorzugt auf die Amplifikation von cDNA angewandt, um die Expression zweier Gene semiquantitativ in einem Ansatz nachzuweisen und zu vergleichen. Die *Annealing*-Temperatur der Oligonukleotid-Paare wurde zuvor mittels Gradienten-PCR auf genomische DNA bestimmt.

Multiplex-PCR-Ansatz:

1 µl (20-100 ng)	<i>Template</i> -cDNA
2 µl (1x)	10x PCR-Puffer
2 µl (2,5mM)	25 mM Magnesiumchlorid
1 µl (0,5mM)	10 mM Desoxynukleotide
1 µl (0,5 µM)	10 µM <i>Primermix</i> (Mix aus vier Oligonukleotiden im Verhältnis 1:1:1:1)
1 µl (~0,5 U)	0,5 U/µl <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (rekombinant)
ad 20 µl	steriles entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	2 min	Denaturieren
30 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	45-65°C	30 sec	<i>Annealing</i> (abhängig von den eingesetzten <i>Primer</i> -Paaren)
	72°C	30 sec-4 min	Synthese (abhängig von der Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes)
1 Zyklus	72°C	5-10 min	Nachsynthese
	14°C	∞	

High Fidelity-PCR

Zur Amplifikation besonders langer DNA-Fragmente wurde der „High Fidelity PCR Enzyme Mix“ der Firma MBI Fermentas genutzt, welcher sowohl *Taq*-DNA-Polymerase als auch eine ebenfalls thermostabile *Pfu*-DNA-Polymerase mit Korrekturlese-Funktion (*proofreading*) enthält. Der Enzym-Mix ermöglicht die Amplifizierung genomischer DNA-Fragmente einer Größe von bis zu 10 kb.

High Fidelity-PCR-Ansatz:

1 µl (50 pg-1 µg)	<i>Template</i> -DNA
2 µl (1x)	10x High Fidelity-PCR-Puffer
2 µl (2,5 mM)	25 mM Magnesiumchlorid
0,4 µl (0,2 mM)	10 mM Desoxynukleotide
1 µl (0,5 µM)	10 µM <i>Senseprimer</i>
1 µl (0,5 µM)	10 µM <i>Antisenseprimer</i>
0,4 µl (2 U)	5 U/µl High Fidelity Enzym Mix
ad 20 µl	steriles entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	2 min	Denaturieren
30 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	45-65°C	30 sec	<i>Annealing</i> (abhängig von den eingesetzten <i>Primer</i> -Paaren)
	68°C	30 sec-4 min	Synthese (abhängig von der Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes)
1 Zyklus	72°C	5-10 min	Nachsynthese
	14°C	∞	

Semiquantitative RT-PCR

Um die Expression verschiedener Gene zu überprüfen, konnte nach der cDNA-Synthese eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt werden. Dafür wurde die einzelsträngige cDNA als Template eingesetzt und mit spezifischen Oligonukleotiden das Gen von Interesse, sowie ein konstitutiv exprimiertes Gen zum Vergleich nachgewiesen werden. Diese konnten getrennt voneinander, aber auch als Multiplex-PCR in einem Ansatz amplifiziert werden. Der Nachweis der amplifizierten, also auch exprimierten Gene, erfolgte durch Auftrennung der PCR-Reaktionen auf einem 1%igen Agarosegel.

Ansatz semiquantitative RT-PCR:

1 µl (20-100 ng)	<i>Template-cDNA</i>
2 µl (1x)	10x PCR-Puffer
2 µl (2,5 mM)	25 mM Magnesiumchlorid
1 µl (0,5 mM)	10 mM Desoxynukleotide
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Senseprimer</i>
0,5 µl (0,25 µM)	10 µM <i>Antisenseprimer</i>
1 µl (~0,5 U)	0,5 U/µl <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (rekombinant)
ad 20 µl	steriles entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	2 min	Denaturieren
30 Zyklen	94°C	30 sec	Denaturieren
	45-65°C	30 sec	<i>Annealing</i> (abhängig von den eingesetzten <i>Primer</i> -Paaren)
	72°C	30 sec-4 min	Synthese (abhängig von der Länge des amplifizierten DNA-Fragmentes)
1 Zyklus	72°C	5-10 min	Nachsynthese
	14°C	∞	

Quantitative Real-Time-PCR

Da bei der semiquantitativen RT-PCR eine Identifizierung der Menge der gebildeten PCR-Produkte erst nach des gesamten Laufs durch gelelektrophoretische Auftrennung möglich ist, kann eine genaue Bestimmung hier nicht erreicht werden. Für eine korrekte Quantifizierung der gebildeten Amplikons wurde die *Real-Time*-PCR-Technik eingesetzt. Hierbei wurde die Menge der gebildeten PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der PCR durch Messung von, vorher zugegebenen in die DNA interkalierenden, Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt. In dieser Arbeit wurde ausschließlich SYBR Green I der Firmen Applied Biosystems sowie MBI Fermentas als Farbstoff genutzt.

Real-Time-PCR-Ansatz:

1 µl (20-100 ng)	<i>Template</i> -DNA bzw. -cDNA
5 µl (1x)	2x SYBR Green I Master Mix
1 µl (je 25 nM)	1 µM <i>Primermix</i> (<i>Sense</i> - und <i>Antisenseprimer</i>)
ad 10 µl	steriles, entionisiertes Wasser

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus	95°C	10 min	Denaturieren
60 Zyklen	95°C	30 sec	Denaturieren
	60°C	30 sec	<i>Annealing</i>
	72°C	30 sec	Synthese
1 Zyklus	95°C	1 min	Denaturieren
	60°C	30 sec	<i>Annealing</i>
	95°C	1 min	Denaturieren
	25°C	Plateau	

5′-/3′-RACE-PCR

Die „RACE-PCR“ (*rapid amplification of cDNA-ends*) stellt ein Verfahren zur Amplifikation bzw. Verlängerung von cDNA-Enden dar. Diese Methode ermöglicht durch reverse Transkription und Verwendung von speziellen Adapter-Oligonukleotiden die Identifizierung von 5′- bzw. 3′-Enden bestimmter Gene. Für die Durchführung von RACE-PCR in der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde ein „SMART™ RACE cDNA Amplification Kit“ der Firma Clontech Laboratories, Inc verwendet und nach Herstellerangaben verfahren.

2.3.3.3 Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese

Sowohl DNA, als auch RNA wurden in der Regel in Horizontal-Gelkammern auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Waren auf den Gelen große Fragmente mit Längen über 3 kb zu erwarten, wurden 0,6-0,8%ige Gele verwendet. Bei Fragment-Größen von 100-200 bp wurden die Gele höher-prozentig (2-3%ig) gegossen. Die Agarose wurde in der gewünschten Menge in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit einer, der genutzten Elektrophoresekammer entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer versetzt. Das Agarose-TAE-Gemisch wurde in einer Mikrowelle so lange siedend erhitzt, bis die Lösung klar war. Auf einem Rührgerät wurde das flüssige Gel bis auf eine Temperatur von ca. 60°C abgekühlt, mit einem Hunderttausendstel 1%iger Ethidiumbromid-Lösung versetzt und sofort gegossen. Nach Abkühlung und Verfestigung des Gels wurde dieses mit 1x TAE-Puffer bedeckt, die Proben mit einem DNA-Größenstandard in die Geltaschen geladen und die Kammer an einer Stromquelle mit 80-150 V angeschlossen. Nach ca. 30 Minuten konnte die nach ihrer Ladung und Größe aufgetrennte DNA bzw. RNA unter UV-Licht fotografiert werden.

Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA-Proben wurden Formaldehyd-Gele verwendet, die einen Abbau der RNA verhinderten. Dazu wurden 1% Agarose, 10% (v/v) 10x-MOPS-Puffer und 87 ml tridestilliertes Wasser in einer Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Die Lösung wurde auf einem Rührgerät abgekühlt und 5% (v/v) Formaldehyd zugegeben. Danach wurde das Gel sofort in die vorher mit 70% Ethanol gereinigte Kammer gegossen. Während der Verfestigung des Gels wurden die RNA-Proben vorbereitet. 3 µl RNA-Probe wurde auf 7 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, mit 15 µl Denaturierungspuffer versetzt und zehn Minuten bei 65°C im Heizblock inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und jeweils 4 µl Beladungspuffer mit 1% (v/v) Ethidiumbromid zugegeben. Das feste Gel wurde mit 1x MOPS-Puffer überschichtet und die RNA-Proben in die Taschen geladen. Der Gel-Lauf erfolgte bei 70 V ca. zwei Stunden.

2.3.3.4 DNA-Hybridisierung (Southern-Analysen)

Gelelektrophorese

Die über Nacht bei 37°C mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnittenen Proben genomischer DNA wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versehen und auf ein großes (250 ml) 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid geladen. Der Gel-Lauf erfolgte in 1x TAE-Puffer sehr langsam bei 20-30 V über Nacht.

Gel-Vorbereitung und Blot

Am folgenden Tag wurde das Gel zunächst unter UV-Licht mit einem Lineal fotografiert. Waren sehr feine Banden zu sehen, war der Restriktionsverdau erfolgreich und die Fragmente gut getrennt. Bevor die DNA auf eine Membran überführt werden konnte, musste diese zunächst denaturiert werden. Dazu wurde das Gel kurz in destilliertem Wasser gewaschen und in 0,25 M HCl-Lösung 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach schloss sich der Denaturierungsschritt im Denaturierungspuffer zweimal 20 Minuten an, gefolgt von zweimal 20 Minuten Neutralisierungspuffer. Zwischen den jeweiligen Schritten wurde das Gel kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach dem letzten Neutralisierungsschritt wurde der pH-Wert der Lösung mit pH-Papier bestimmt. Der pH sollte zwischen 7,0 und 7,5 liegen. War dies erreicht konnte das Gel *geblottet* werden. Damit ist der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran gemeint, welcher in einem hochkonzentrierten Salzpuffer unter Vakuum geschah. Auf die Vakuum-Blot-Apparatur wurde zunächst ein Whatman-Papier gelegt, auf welchem luftblasenfrei die zuvor in destilliertem Wasser und

20x SSC-Puffer inkubierte Nylonmembran platziert wurde. Darauf konnte dann eine Kunststoff-Maske gelegt werden, deren Größe der Gel-Breite und –Länge entsprach. Auf die Membran wurde das DNA-Gel wiederum luftblasenfrei platziert und dieses mit 20x SSC-Puffer überschichtet. Nachdem ein Druck von 7 kPa erreicht war, wurde das Gel 1-1,5 h *geblottet*. Danach wurde der Blot abgebaut und die Membran zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet. Um die transferierte DNA sehr fest an die Nylonmembran zu binden wurde diese 30 Minuten bei 80°C inkubiert und danach im „Crosslinker“ bei 1200 J mit UV-Licht bestrahlt. Die Membran konnte nun direkt zur Prähybridisierung mit Church-Hybridisierungsbuffer über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen inkubiert werden, oder bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C zwischengelagert werden.

Sondenherstellung und Hybridisierung

Die Herstellung der radioaktiven Sonde erfolgte mit Hilfe des „Megaprime™ DNA Labeling System“ der Firma GE Healthcare nach Herstellerangaben. Als *Template* wurde ein zuvor mittels PCR amplifiziertes, bis zu 500 bp großes DNA-Fragment genutzt. Für die Markierung wurde ausschließlich α -[³²P]-dATP genutzt.

Die überschüssige nicht eingebaute Radioaktivität, sowie dNTPs und Oligonukleotide wurden nach der Reaktion über eine „illustra ProbeQuant G-50 Micro“-Säule der Firma GE Healthcare entfernt (2x 2 min 5000 rpm), die Sonde zehn Minuten bei 95-100°C denaturiert und zum Prähybridisierungspuffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C im Hybridisierungssofen.

Waschen und Entwicklung

Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung mit der Sonde in ein 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt und bei 4°C gelagert. Die Membran wurde nun gewaschen um sie von überflüssiger Radioaktivität zu befreien. Dies erfolgte zunächst zweimal 20 Minuten mit Waschlösung 1 bei Raumtemperatur, gefolgt von zweimal 20 Minuten mit Waschlösung 2 bei 50°C. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Membran kurz getrocknet, in Saranfolie (Dow Deutschland GmbH, www.dow.com) eingeschlagen und in eine Kassette mit einem Phosphorscreen gelegt. Dort wurde sie mindestens sechs, höchstens 48 Stunden inkubiert. Der Screen wurde dann im Typhoon™-Scanner ausgewertet. Ein positives Signal ist auf den Screens als Schwärzung zu erkennen.

2.3.3.5 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen wurde das „QIAquick Gel Extraxtion Kit“ der Firma QIAGEN verwendet (siehe Bedienungsanleitung des Herstellers).

2.3.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde zunächst eine 5 ml LB-Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden am nächsten Tag bei 5000 rpm fünf Minuten sedimentiert, in 100 µl Minipräparationspuffer 1 und 10 µl RNase A (10 mg/ml) aufgenommen und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 200 µl Minipräparationslösung 2 wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur zur Zell-Lyse und zum RNA-Abbau inkubiert. Die Proteine wurden mit 200 µl Minipräparationslösung 3 und zehn Minuten Inkubation auf Eis ausgefällt und anschließend zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt die Plasmid-DNA und wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß, in welches 1 ml 100% Ethanol vorgelegt wurden, überführt. Die Fällung der DNA wurde durch fünf Minuten Inkubation auf Eis beschleunigt. Schließlich wurden die Proben erneut zehn Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment mit 70% Ethanol-Lösung gewaschen (5 min, 14000 rpm). Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet, in 50 µl tridestilliertem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* mittels Plasmid-MIDI-Präparations-Kit

Um sehr reine Plasmid-DNA in großer Menge zu erhalten, wurde diese mit dem „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ der Firma QIAGEN isoliert. Hierbei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*

Eine 3 ml-Agrobakterien-Kultur wurde zwei Tage lang in LB-Medium bei 28°C geschüttelt. Am Tag der Plasmid-Präparation wurde die Kultur 1 min bei 14000 rpm abzentrifugiert, die Zellen sofort in 100 µl Präparationslösung 1 aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und erneut 30 Minuten bei RT stehen gelassen. Nach der Inkubation wurden 30 µl alkalisches Phenol und 150 µl 3 M Kaliumacetat-Lösung zugegeben und fünf Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Nach Zentrifugation (3 min, 4°C, 14000 rpm) wurde die obere wässrige Phase abgenommen und mit einem Volumen Chloroform erneut zentrifugiert (2 min, 4°C, 14000 rpm). Die entstandene wässrige Phase wurde nochmals abgenommen und mit 500 µl 100% Isopropanol zur Fällung 5 min bei

Raumtemperatur zentrifugiert. Das Sediment wurde mit einmal 70% Ethanol-Lösung gewaschen (5 min, 14000 rpm, RT) und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 40-50 µl Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

2.3.3.7 Restriktionsreaktionen

Für die Klonierung bestimmter DNA-Fragmente in Vektoren war es nötig, diese zuvor mit geeigneten Enzymen zu restrigieren. Für einen gerichteten Einbau der DNA-Fragmente wurde meist ein Doppelverdau mit zwei verschiedenen Enzymen genutzt. Diese wurden so gewählt, dass die geschnittenen Fragmente 3'- und 5'-überhängende Enden enthielten und die Restriktionsstellen nach der Ligation der Fragmente noch vorhanden waren. DNA-Fragmente, welche auf einfachem Wege kloniert werden sollten, konnten mit Enzymen verdaut werden, die keine Überhänge produzierten. Die Schnittstellen blieben somit nicht erhalten und das DNA-Fragment konnte nicht wieder aus dem Vektor ausgeschnitten werden. DNA-Fragmente, die nicht gerichtet kloniert werden sollten, konnten durch Einzelrestriktionen geschnitten werden. Die Restriktionen fanden bei 37°C im PCR-Block statt (bis auf wenige Ausnahmen, z.B. *Sma*I bei 30°C). Die Länge der Inkubation richtete sich nach der Menge der eingesetzten DNA, sowie des Enzyms. Die Reaktionen wurden 20 Minuten bei 65°C bzw. 80°C gestoppt und danach auf 1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Unter UV-Licht wurden sowohl geschnittene Vektor-DNA als auch die zu klonierenden Fragmente ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (s. 2.3.3.5). Die Eluate konnten dann direkt für die Ligationsreaktionen eingesetzt werden.

Bei einigen Doppelrestriktionen konnte kein einheitlicher Restriktionspuffer (z.B. *Y⁺/Tango*) gefunden werden. Bei diesen Reaktionen war es nötig zuerst mit dem einen, dann mit dem anderen Restriktionsenzym zu schneiden. Nach dem ersten Restriktionsschritt wurde die linearisierte Plasmid-DNA deshalb gefällt. Dazu wurde der Restriktionsansatz zunächst mit Wasser auf 100 µl verdünnt, 250 µl 100% Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) zugegeben und einige Minuten auf Eis inkubiert. Die Fällung wurde bei 4°C und 14000 rpm 20 Minuten abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das (häufig nicht sichtbare) Sediment mit 70% Ethanol-Lösung gewaschen (10 min, 4°C, 14000 rpm). Die gefällte lineare Plasmid-DNA wurde dann in 10-20 µl Wasser aufgenommen und für den zweiten Restriktionsschritt eingesetzt.

Einzelrestriktion:

1 µl (1x)	10x Restriktionspuffer (dem eingesetzten Enzym entsprechend)
5-10 µg	Plasmid-DNA (15-20 µg bei genomischer DNA)
10-20 U	Restriktionsendonuklease (30 U bei genomischer DNA)
ad 10 µl	entionisiertes Wasser

Doppelrestriktion:

1 µl (1x)	10x Y ⁺ /Tango-Restriktionspuffer
5-10 µg	Plasmid-DNA
10-20 U	Restriktionsendonuklease 1
10-20 U	Restriktionsendonuklease 2
ad 10 µl	entionisiertes Wasser

Restriktionsbedingungen:

37°C	1-6 h oder über Nacht (abhängig von Menge eingesetzter Plasmid- bzw. genomischer DNA)
65 oder 80°C	20 min (abhängig von eingesetztem Enzym)
14°C	∞

2.3.3.8 Ligationsreaktionen

Für die Ligation zuvor restrigierter Plasmid-DNA mit DNA-Fragmenten wurde die T4-Ligase der Firma MBI Fermentas genutzt. Um eine maximale Ausbeute an klonierten Fragmenten zu erhalten wurden Insert und Vektor in einem bestimmten Verhältnis eingesetzt. Dies war abhängig von der Größe des Vektors, sowie der Länge des zu klonierenden DNA-Fragments. Berechnet wurde die entsprechende Menge nach Formel 2.2.

$\frac{\text{ng Insert}}{\text{kb Insert}}$	=	$\frac{\text{ng Vektor}}{\text{kb Vektor}}$	x	$\frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$
---	---	---	---	---------------------------------------

Formel 2.2: Formel zur Berechnung der für die Ligationsreaktionen einzusetzenden Menge an Plasmid- bzw. *Insert*-DNA

Ligationsansatz:

1 µl (1x)	10x Ligationspuffer
X µl	Plasmid-DNA
X µl	DNA-Fragment
1 µl (5 U)	T4 Ligase (5 U/µl)
ad 10 µl	entionisiertes Wasser

Reaktionsbedingungen:

Raumtemperatur	über Nacht
65°C	7 min
4°C	bis zur Transformation

2.3.3.9 Klonierung von PCR-Fragmenten

TA-Klonierung

Wird ein DNA-Fragment mit *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert, so produziert das Enzym sowohl an 5'- als auch an 3'-Seite Überhänge aus Desoxy-Adenin. Diesen Vorgang macht man sich bei der TA-Klonierung zu nutze. PCR-Fragmente können somit sehr einfach in einen linearen Vektor (pCR[®]2.1-TOPO[®]) mit komplementären Überhängen aus Desoxy-Thymidin ligiert werden. In dieser Arbeit wurde dafür das „TOPO[®] TA Cloning[®] Kit“ der Firma Invitrogen genutzt und nach Herstellerangaben verfahren.

Ligation über glatte Enden

Werden DNA-Fragmente über *Pfu*-DNA-Polymerase amplifiziert, entfallen die Desoxy-Adenin-Überhänge. Um diese PCR-Fragmente trotzdem auf schnellem Wege zwischenklonieren zu können, wurde das „CloneJet[™] PCR Cloning System“ der Firma MBI Fermentas genutzt. Hierbei wurden die DNA-Fragmente direkt in einen linearisierten Vektor mit glatten Enden ligiert. PCR-Fragmente, die mit einem Enzym-Mix, welcher auch *Taq*-DNA-Polymerase enthält, amplifiziert wurden, konnten zuvor außerdem mit einem *Blunting Enzyme* behandelt werden, um die glatten Enden zu erlangen. Der Klonierungsvektor (pJET1.2/blunt) codiert für ein letales Restriktionsenzym, dessen Gensequenz durch die Insertion eines DNA-Fragments unterbrochen wird, und somit 99% rekombinante Klone garantiert.

2.3.3.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Sämtliche, in dieser Arbeit durchgeführten, Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA Genomics, Gesellschaft für molekularbiologische Technologie mbH (Berlin, www.agowa.de) übernommen. Die Auswertung erfolgte über das Programm VectorNTi[®] (Invitrogen).

2.3.4 Herstellung rekombinanter *Taq*-DNA-Polymerase

Expression in *Escherichia coli*

Zunächst wurde aus einer Glycerin-Dauerkultur des *E.-coli-Taq*-Überexpressionsstamms eine LB-Platte beimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie von dieser Platte wurden am nächsten Tag 5 ml LB-Flüssigkultur angesetzt und wiederum über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden am darauf folgenden Tag

250 ml-Flüssigkultur angeimpft und diese im Schüttel-Inkubator bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 wachsen gelassen. Die gesamte Kultur wurde dann durch Zugabe von 2,5 ml 0,1 M IPTG-Lösung induziert und über Nacht bei 37°C weiter geschüttelt.

Gewinnung des Rohenzymextraktes der *Taq*-DNA-Polymerase

Die über Nacht induzierte Flüssigkultur wurde bei 5000 rpm und 4°C für zehn Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml Puffer A resuspendiert, in 50 ml-Reaktionsröhrchen überführt und anschließend bei 5000 rpm und 4°C zehn Minuten sedimentiert. Nachdem der Überstand vollständig dekantiert war, wurden die Zellen erneut in 3 ml Puffer A resuspendiert, 250 µl Lysozym-Lösung, 1 mg DNase sowie 125 µl 1 M Magnesiumchlorid-Lösung zugefügt und die Suspension für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 3 ml Puffer B zugegeben und die Suspension für eine Stunde im 75°C-heißen Wasserbad stehen gelassen. Die Lösung wurde dann für fünf Minuten auf Eis abgekühlt und für 20 Minuten bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, in dem das Enzym vorlag, wurde großzügig in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Reinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (IAC)

Die Reinigung der *Taq*-DNA-Polymerase erfolgte über Anionenaustausch mittels DEAE-Cellulose im Kühlraum. Die Suspension des Chromatographie-Materials (ca. 1,0-1,5 g der DEAE-Cellulose in 8-10 ml Puffer 1) wurde in eine kleine Chromatographiesäule gegeben bis ein festes sedimentiertes Gelbett von 5ml entstand. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer 1 vorgewaschen. Der Enzym-Rohextrakt wurde auf die Säule aufgetragen und diese dann wiederum mit zweimal 10 ml Puffer 1 gewaschen. Nach vollständigem Absinken des Flüssigkeitsspiegels über dem Säulenmaterial wurde die Säule mit 6 ml Puffer 2 gespült. Nachdem der Miniskus wiederum vollständig abgesunken war, wurden 0,5 ml Puffer 3 auf die Säule gegeben. Mit weiteren 6 ml Puffer 3 wurde das Enzym eluiert. Die Lösung wurde zunächst mit einem Volumen eiskaltem 50%-Glycerin-Lagerpuffer und anschließend mit zwei Volumina 75%-Glycerin-Lagerpuffer vermischt (= 50% Glycerin Endkonzentration). Die Proben wurden dabei die ganze Zeit auf Eis gerührt und die Glycerin-haltigen Lösungen langsam tropfenweise zugegeben. Die so erhaltene *Taq*-Enzymlösung konnte in 1 ml-Aliquots anschließend bei -20°C gelagert werden.

2.3.5 Mikroskopie

2.3.5.1 Mikroskopie von *Rhynchosporium commune* auf Blattproben

Nach Inokulation von Gerstenpflanzen konnten Wachstum und Entwicklung des Pilzes auf den Primärblättern mikroskopisch verfolgt werden. Dazu wurden die infizierten Blätter zum Zeitpunkt der Analyse abgeschnitten und zweimal in einer Ethanol-Chloroform-Trichloressigsäure-Lösung (Entfärbelösung 1, s. 2.1.5) über Nacht entfärbt, bzw. „entchlorophyllisiert“. Am darauffolgenden Tag wurde die Entfärbelösung entfernt und die Blätter in einer Trypanblau-Färbelösung wiederum über Nacht gefärbt. Trypanblau färbt Chitin und macht damit die pilzlichen Zellwände auf der Blattoberfläche sehr gut sichtbar. Am dritten Tag wurde die Färbelösung abgegossen und die gefärbten Blätter in einer 1:1:1-Mischung aus Milchsäure, Glycerin und tridestilliertem Wasser entfärbt. Die Blätter konnten auch über einen längeren Zeitraum in dieser Lösung aufbewahrt werden. Zur Mikroskopie wurden die Blätter mit einer 50%igen Glycerin-Lösung auf Objektträger aufgebracht und am Hellfeldmikroskop „Axio Imager“ analysiert.

2.3.5.2 Mikroskopie von *Rhynchosporium commune* im Flüssigmedium

Um Myzel des Pilzes im Flüssigmedium zu mikroskopieren, wurden Objektträger mit zwei aufgesetzten Medien-Kammern („Lab-Tek™ Chamber Slide™ System“, Nunc GmbH) angesetzt. In die Kammern wurden jeweils 2 ml 1x FRIES-Medium pipettiert und 5×10^3 bzw. 10^4 Sporen des zu analysierenden *R.-commune*-Isolates zugegeben. Die Kammern wurden zugedeckt, mit Parafilm verschlossen und im Pilzanzuchtschrank bei 17°C und Dunkelheit angezogen. Zur Mikroskopie wurde das Flüssigmedium abpipettiert, die Kammern entfernt und die Proben mit einem Deckglas im Hellfeld- bzw. Fluoreszenzlicht am „Axio Imager“ analysiert.

2.3.5.3 Mikroskopie von *Rhynchosporium commune* auf Limabohnenagar

Für einige mikroskopische Aufnahmen von *R. commune* wurden Standard-Objektträger mit einem dünnen Film flüssigen Limabohnenagars versehen und getrocknet. War der Agar fest, wurden auf dessen Oberfläche 5×10^3 Sporen aufpipettiert und abermals unter der Sterilbank getrocknet. Die Objektträger wurden danach in Petrischalen mit einigen Tropfen sterilen Wassers überführt, mit Parafilm verschlossen und im Pilzanzuchtschrank bei 17°C und Dunkelheit inkubiert. Die Objektträger wurden zu verschiedenen Zeitpunkten im Hellfeld am „Axio Imager“ mikroskopiert.

2.3.6 Verwendete Software

Software	Verwendung	Firma
AxioVision LE	Mikroskopische Bildanalyse	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen, www.zeiss.com)
BioEdit v7.0.5	Erstellen und Editieren von Sequenzvergleichen	Tom Hall Ibis Therapeutics A division of Isis Pharmaceuticals 1891 Rutherford Road Carlsbad
CytoCalc™ Data Analysis System	Analyse und Auswertung von Fluoreszenz-Messungen	PerSeptive Biosystems
GeneSnap 6.05	Analyse und Auswertung von Agarosegelen	Syngene (Cambridge, UK, www.syngene.com)
ImageQuant™ TL	Analyse und Auswertung von Phosphorscreens, Membranen und Gelen	GE Healthcare (München, www.gehealthcare.com)
Leica Image Manager (LIM)	Mikroskopische Bildanalyse	Leica Microsystems GmbH (Wetzlar, www.leica-microsystems.com)
MEGA 4	Rekonstruktion von Phylogrammen auf Basis von Sequenzvergleichen	Center for Evolutionary Medicine and Informatics The Biodesign Institute, USA
MxPro™ ET	Analyse und Auswertung von QRT-PCR	Stratgene (La Jolla, USA, www.stratagene.com)
VectorNTi®	Konstruktion von Vektoren und Oligonukleotiden, Sequenzvergleiche, Auswertung von Sequenzierungen	Invitrogen GmbH (Karlsruhe, www.invitrogen.com)

Tabelle 2.4: Zusammenstellung der verwendeten Analyse-Software

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der REMI-Mutante LB20₅₇ und der REMI-Komplementationsmutante

3.1.1 Charakterisierung des REMI-Ereignisses durch DNA-Hybridisierung

Die apathogene REMI-Mutante LB20₅₇ stellte den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit dar. Unter Verwendung von PCR-Walking-Methoden und anschließender Sequenzierungen war die Insertion des pAN7-1-Vektors in eine *Bam*HI-Restriktionsstelle im 5'-Bereich eines Gens nachgewiesen worden, das als *PFPI* bezeichnet wurde. Die Identifizierung sich wiederholender Vektor-Sequenzen hatte zu der Annahme geführt, dass eine repetitive Vektorintegration in die *Bam*HI-Schnittstelle vorlag. DNA-Hybridisierungen hatten jedoch kein Ergebnis erbracht (Albert & Knogge, unveröffentlichte Ergebnisse).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollten diese Untersuchungen deshalb zunächst wiederholt werden, um Angaben über die Anzahl der integrierten Kopien des pAN7-1-Vektors und deren Insertionsrichtung in der REMI-Mutante LB20₅₇ zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurde Myzel des *Rhynchosporium-commune*-Wildtyp-Isolats UK7, der REMI-Mutante LB20₅₇ und der REMI-Komplementationsmutante in großen Petrischalen in Flüssigmedium angezogen. Nach zwei Wochen wurde das Myzel geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus dem Material wurde die genomische DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Jeweils 15 µg der DNA des Wildtyps sowie der Mutanten wurden mit Restriktionsenzymen über Nacht geschnitten. Die Enzyme wurden so gewählt, dass ihre Schnittstellen sowohl in der pAN7-1-Vektor-DNA als auch in der *PFPI*-Gensequenz lagen. Genutzt wurden die Restriktionsenzyme *Sal*I, *Nhe*I sowie *Bst*EII (*Eco*91I) (vgl. Abb. 3.2 sowie 3.3). Als Positivkontrollen dienten der Vektor pAN7-1 sowie ein pCR2.1-Vektorkonstrukt, das ein 1020 bp langes DNA-Fragment des 5'-untranslatierten Bereichs des *PFPI*-Gens enthielt (pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR; Abb. 3.4). Jeweils 3 µg der Vektoren wurden mit den oben genannten Enzymen (pAN7-1) bzw. mit dem Enzym *Eco*RI (pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR) ebenfalls über Nacht restrigiert. Die gesamte mit den Restriktionsenzymen behandelte genomische DNA des Wildtyps und der Mutanten sowie die linearisierten Vektoren wurden in jeweils identischer Reihenfolge auf zwei 1%igen Agarose-Gelen bei 30 V über Nacht aufgetrennt (vgl. Abb. 7.5.1).

Die DNA wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels Vakuum-Blot auf jeweils eine positiv geladene Nylon-Membran (Membranen 1 und 2) transferiert. Die

Hybridisierung erfolgte mit zwei unterschiedlichen Sonden. Als Sonde 1 diente ein 342 bp langes DNA-Fragment aus der kodierenden Sequenz der Hygromycin-B-Resistenzkassette (*HPH*). Das DNA-Fragment wurde mit den Oligonukleotiden HPH1s und HPH2as (#38/#39, s. 7.1) aus dem pAN7-1-Vektor amplifiziert und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Als zweite Sonde wurde der 5'-untranslatierte Bereich des *PFPI*-Gens genutzt. Das in den Vektor pCR2.1 klonierte 1020 bp lange DNA-Fragment wurde durch Restriktion mit dem Enzym *EcoRI* ausgeschnitten und ebenfalls auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Beide Fragmente wurden aus dem Gel eluiert und für die radioaktive Markierung mit α -[³²P]-dATP verwendet.

Die Hybridisierung fand über Nacht bei 60°C statt. Membran 1 wurde mit Sonde 1 (*HPH*), Membran 2 mit Sonde 2 (*PFPI*-5'-UTR) behandelt. Die nach der radioaktiven Markierung aufgelegten Phosphor-Screens wurden nach fünf Stunden Inkubation mittels Typhoon[®]-Scanner entwickelt. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 3.1a bzw. 3.1b.

Der Phosphor-Screen 1 zeigt die radioaktive Markierung des Hygromycin-B-Phosphotransferasegens (*HPH*) in der REMI-Mutante LB20₅₇ sowie in der REMI-Komplementationsmutante. Durch die vorangegangene Transfektion mit dem Pilzexpressionsvektor pAN7-1 sind diese Träger der Resistenzkassette. Als Positivkontrolle dient der linearisierte Vektor pAN7-1 selbst. Im Wildtyp UK7 ist die *HPH*-Gensequenz nicht vorhanden. Dieser zeigt demnach keine Markierung durch die Sonde.

Im zweiten Phosphor-Screen ist die radioaktive Markierung des 5'-untranslatierten Bereiches des *PFPI*-Gens sowohl in den beiden Mutanten als auch im Wildtyp UK7 dargestellt. Als Positivkontrolle dient das mit *EcoRI* restringierte Vektorkonstrukt pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR, das auch zur Sondenherstellung genutzt wurde. pAN7-1 enthält keine *PFPI*-Sequenzen und wird deshalb nicht markiert.

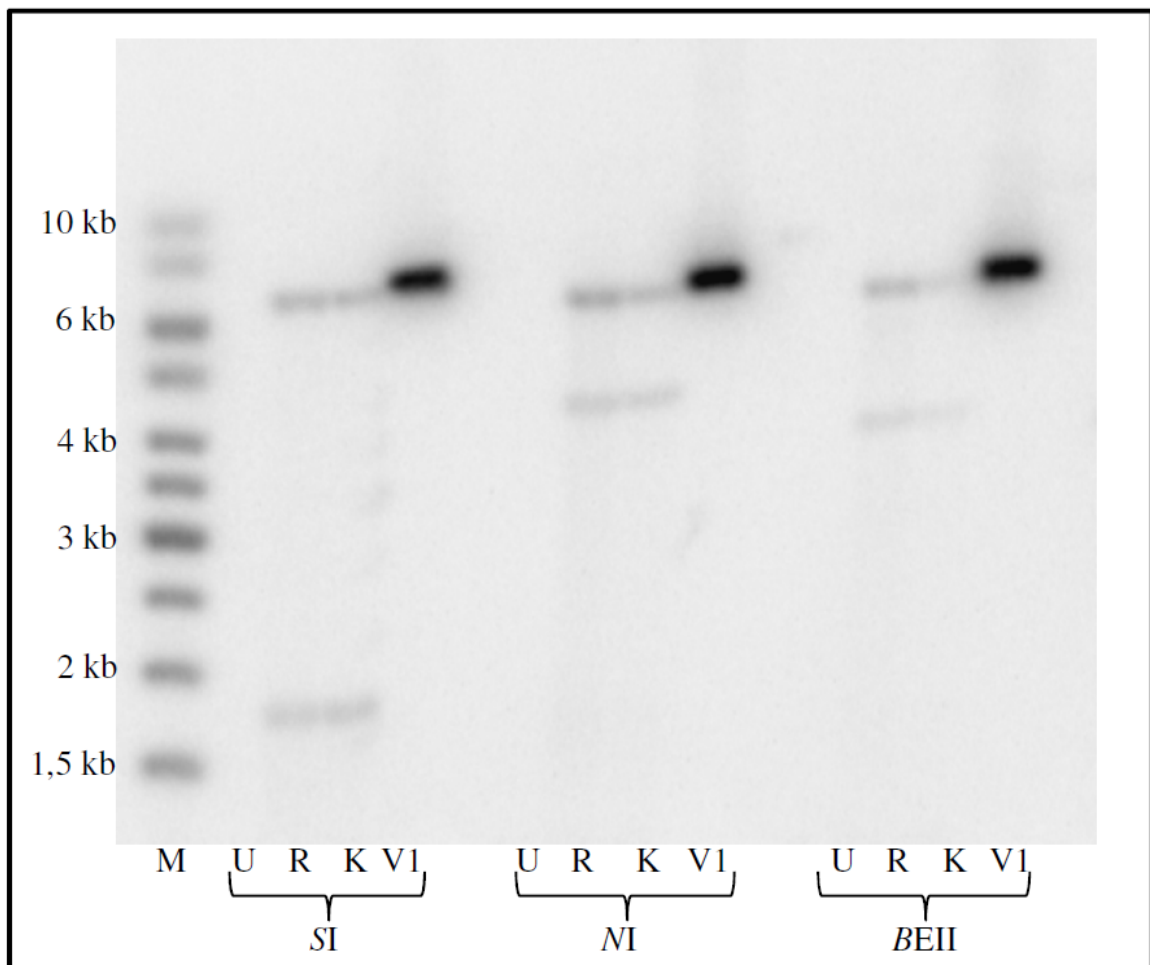


Abbildung 3.1a: Phosphor-Screen 1: Ergebnis der DNA-Hybridisierung 1 unter Verwendung der Sonde 1 (*HPH*).

Spezifische radioaktive Hybridisierung des Hygromycin-B-Phosphotransferasegens (*HPH*) in der genomischen DNA der REMI-Mutante LB20₅₇ (R), der REMI-Komplementationsmutante (K) sowie in der linearisierten Vektorkontrolle pAN7-1 (V1). Der Wildtyp UK7 (U) enthält das *HPH*-Gen nicht und zeigt deshalb keine Markierung. Alle Proben wurden mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt (siehe unterschiedliche Fragmentgrößen). *SI* – *SalI*; *NI* – *NheI*; *BEII* – *BstEII*. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

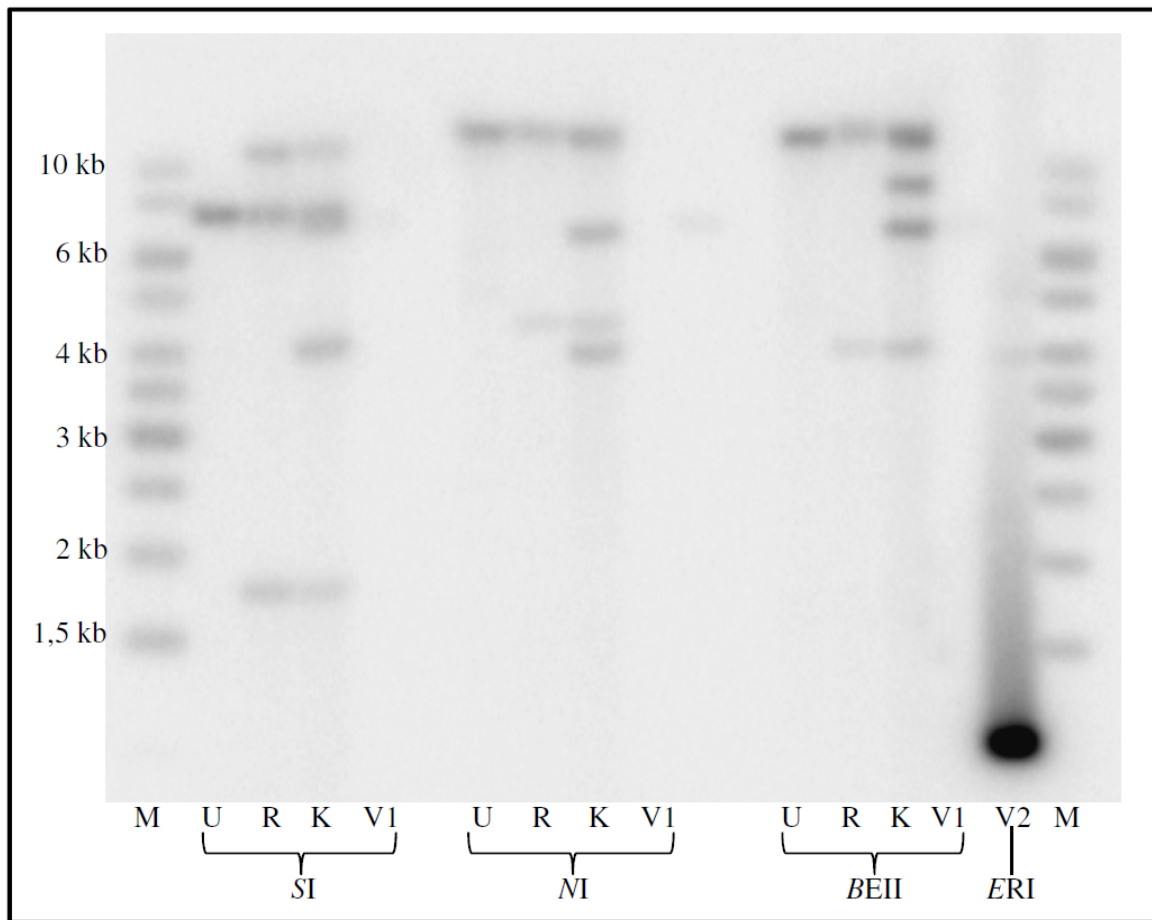


Abbildung 3.1b: Phosphor-Screen 2: Ergebnis der DNA-Hybridisierung 2 unter Verwendung der Sonde 2 (*PFPI*-5'-UTR).

Spezifische radioaktive Hybridisierung des 5'-untranslatierten Bereiches des *PFPI*-Gens im *R. commune*-Wildtyp UK7 (U), der REMI-Mutante LB20₅₇ (R) und der REMI-Komplementationsmutante (K). Als Positivkontrolle diente das mit *EcoRI* (*ERI*) restrigierte Vektorkonstrukt pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR (V2). Im Vektor pAN7-1 ist das *PFPI*-Gen nicht enthalten und zeigt deshalb keine Markierung. Alle Proben (bis auf V2) wurden mit den Enzymen *SalI* (*SI*), *NheI* (*NI*) sowie *BstEII* (*BEII*) restrigiert.

Größenstandard – 1 kb-DNA-Leiter (M).

Die Position der Erkennungsstellen der verwendeten Restriktionsenzyme, die erwarteten Fragmentgrößen sowie die daraus resultierenden Schlussfolgerungen über die Anzahl der Vektorkopien und deren Insertionsrichtung in der REMI-Mutante LB20₅₇ sind in der Abbildung 3.2 schematisch dargestellt. Die entsprechenden Situationen im Wildtyp UK7 zeigt die Abbildung 3.3. Die verwendeten Enzyme *SalI*, *NheI* und *BstEII* besitzen Restriktionsstellen im Promotorbereich (P_{gpd}) der Hygromycin-B-Resistenzkassette der pAN7-1-Vektor-Sequenz sowie im *PFPI*-Gen. Mit der *HPH*-Sonde konnten sowohl in der REMI-Mutante als auch in der Komplementationsmutante jeweils zwei DNA-Fragmente markiert werden, wobei die Größe des einen Fragments stets der Größe des kompletten pAN7-1-Vektors entspricht, die des anderen aber variabel ist (Abb. 3.1a). Die Markierung zweier DNA-Fragmente mit dieser Größenverteilung lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei dem REMI-Ereignis um eine doppelte Integration des pAN7-1-Vektors in die *BamHI*-Schnittstelle im Promotorbereich des *PFPI*-Gens handelt. Durch den Nachweis der Vektorgröße von 6756 bp ist es außerdem möglich, die Richtung der Insertion der pAN7-1-Sequenzen zu bestimmen. Demnach müssen die Vektoren in „Kopf-Schwanz“-Weise inseriert sein, da alle anderen möglichen Insertionsrichtungen entweder sehr viel kleinere Banden oder Fragmente der doppelten Vektorgröße ergeben hätten. Die Größe des jeweils zweiten markierten DNA-Fragments gibt zusätzlich Aufschluss über die Leserichtung der inserierten Vektorsequenzen. Demnach kommt nur eine Orientierung beider Vektorsequenzen in *sense*-Richtung in Frage, da die markierten Fragmente bei *antisense*-Ausrichtung wesentlich größer sein müssten (vgl. Abb. 3.2).

Abbildung 3.1b zeigt den Nachweis des *PFPI*-Gens im Wildtyp UK7 sowie in den beiden Mutanten. Die hier genutzte Sonde 2 bindet im 5'-untranslatierten Bereich des *PFPI*-Gens. Im Wildtyp konnte nur ein DNA-Fragment markiert werden, da die jeweils genutzte Restriktionsstelle nur einmal in der Sequenz vorkommt (vgl. Abb. 3.3). Sowohl die REMI- als auch die Komplementationsmutante zeigen mehrere Banden. In der REMI-Mutante ist die Bindungsstelle der *PFPI*-Sonde durch die Insertion der beiden pAN7-1-Vektorkopien unterbrochen. Deshalb kann die Sonde an zwei Fragmente binden: zum einen direkt vor der *BamHI*-Insertionsstelle, zum anderen direkt danach (vgl. Abb. 3.2). In der Komplementationsmutante können sowohl die Wildtyp-Banden nachgewiesen werden, als auch die für die REMI-Mutante spezifischen Fragmente. Zusätzlich dazu sind noch mehrere Fragmente unterschiedlicher Größe markiert, die sehr wahrscheinlich auf multiple Integrationen des Komplementationsvektors in das Genom der REMI-Mutante zurückzuführen sind.

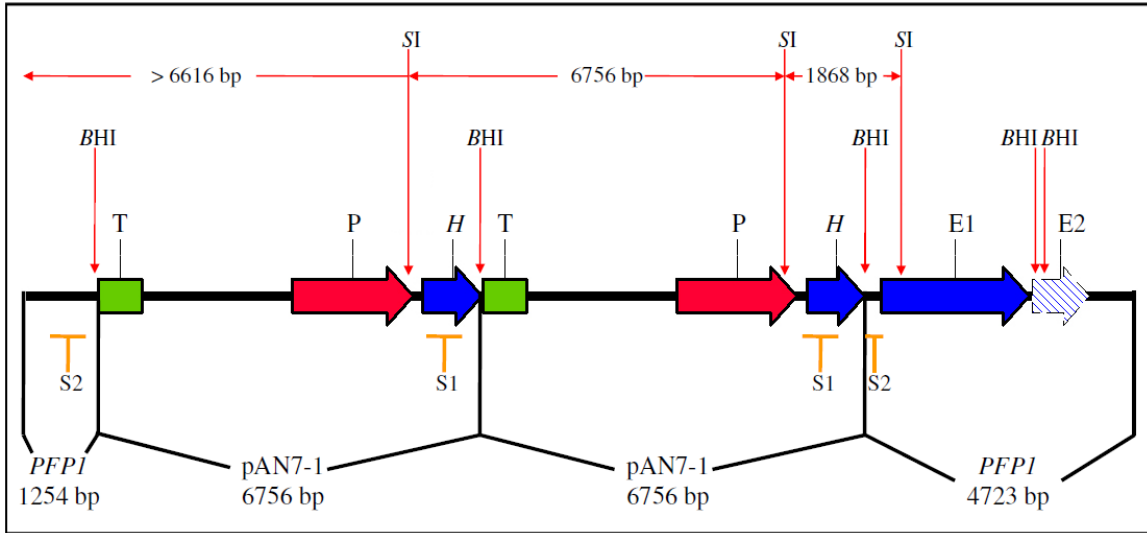


Abbildung 3.2a

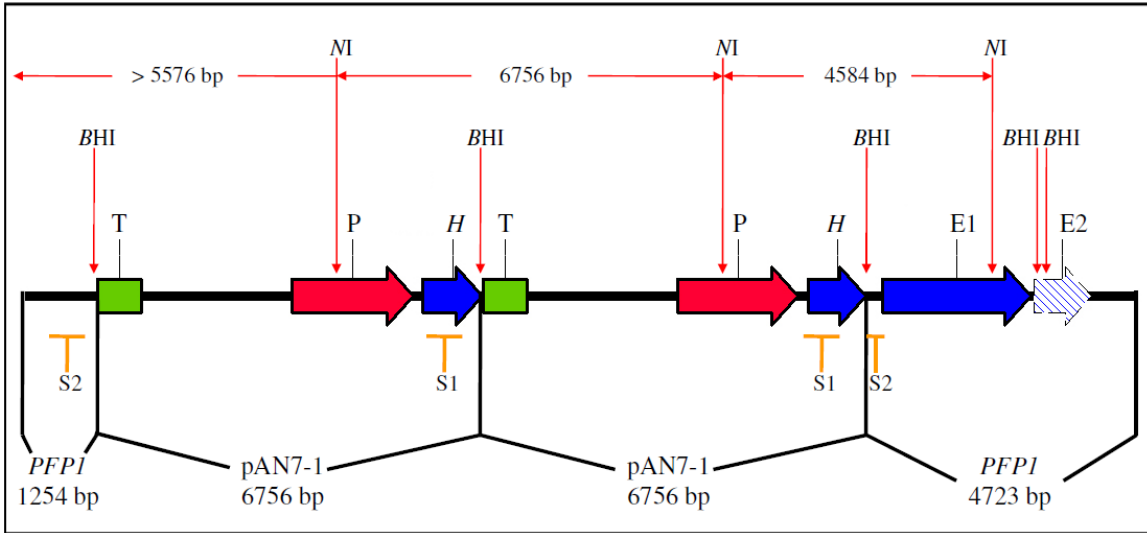


Abbildung 3.2b

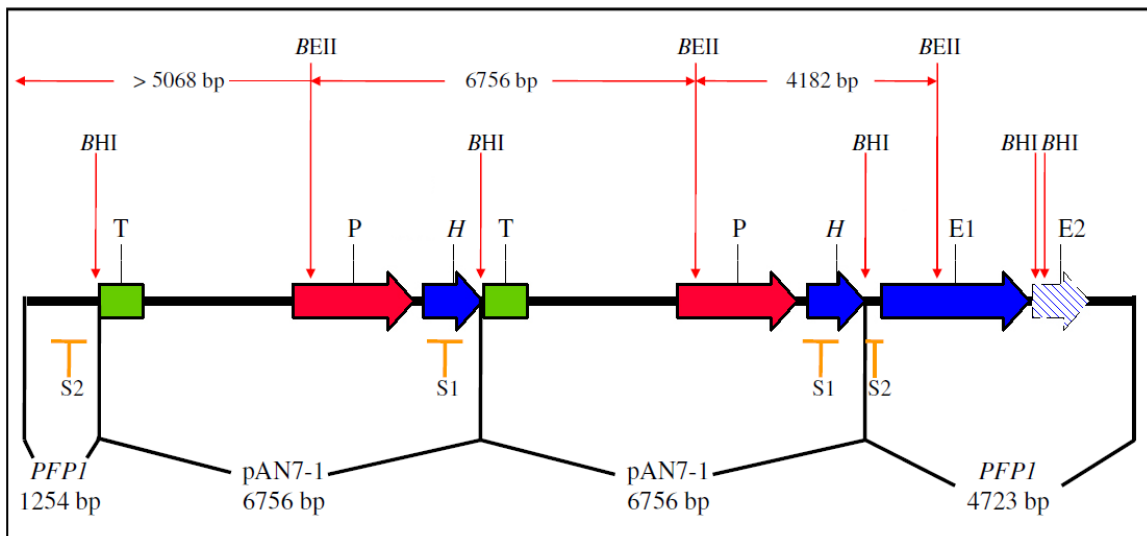


Abbildung 3.2c

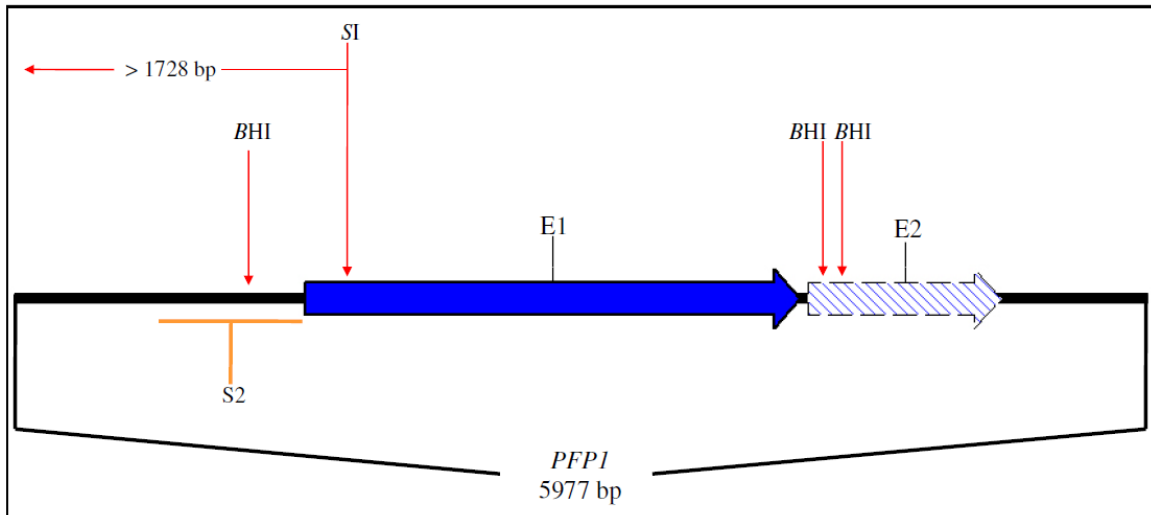


Abbildung 3.3a

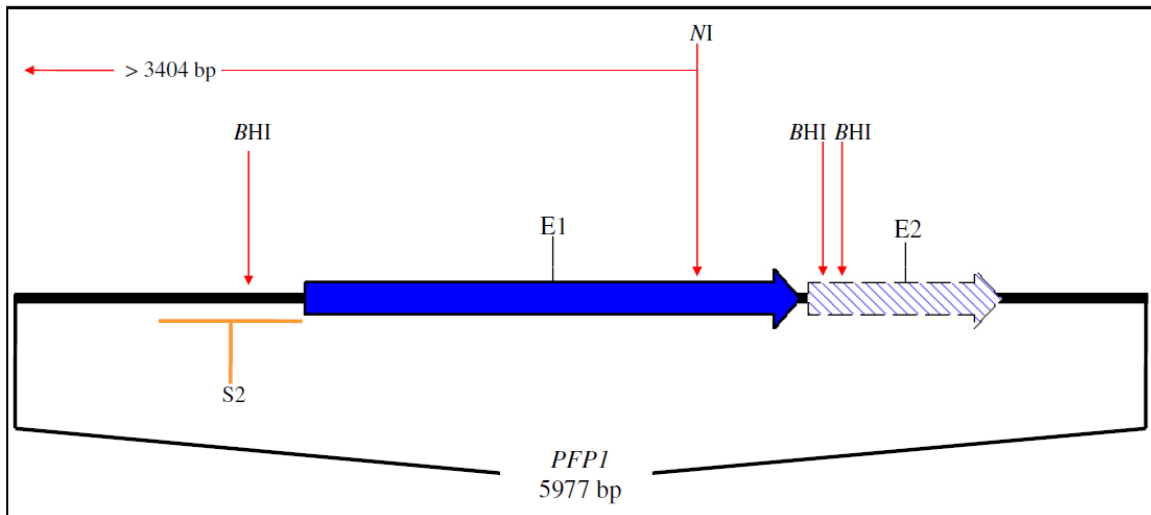


Abbildung 3.3b

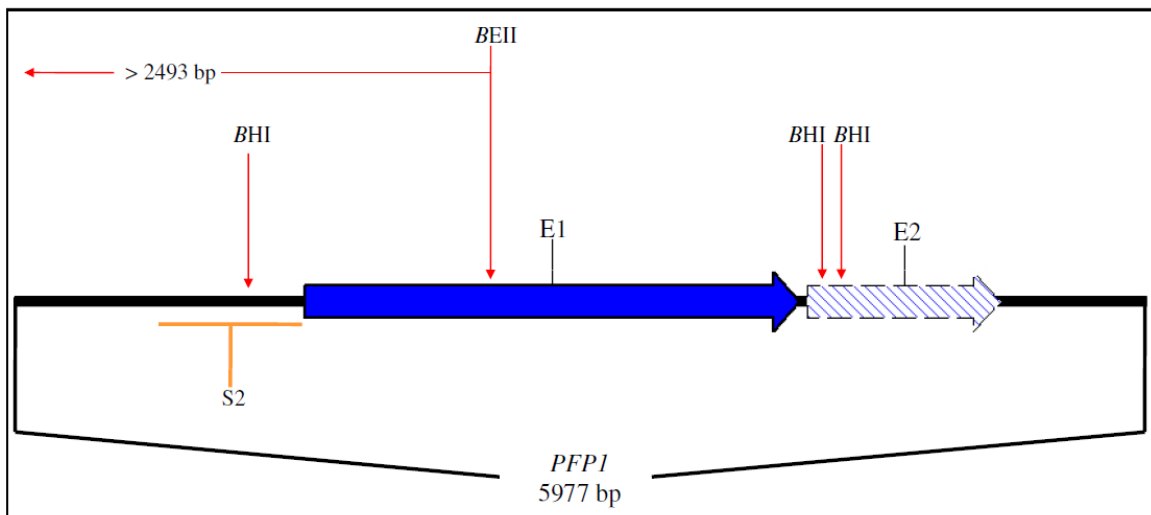


Abbildung 3.3c

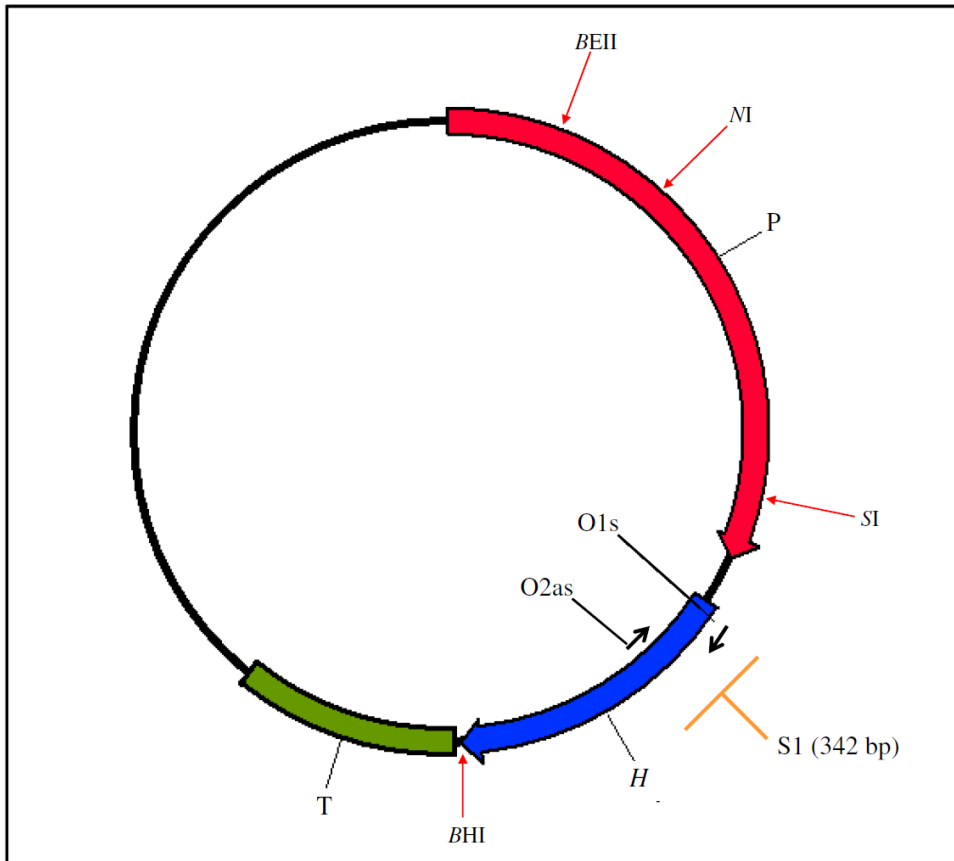


Abbildung 3.4a

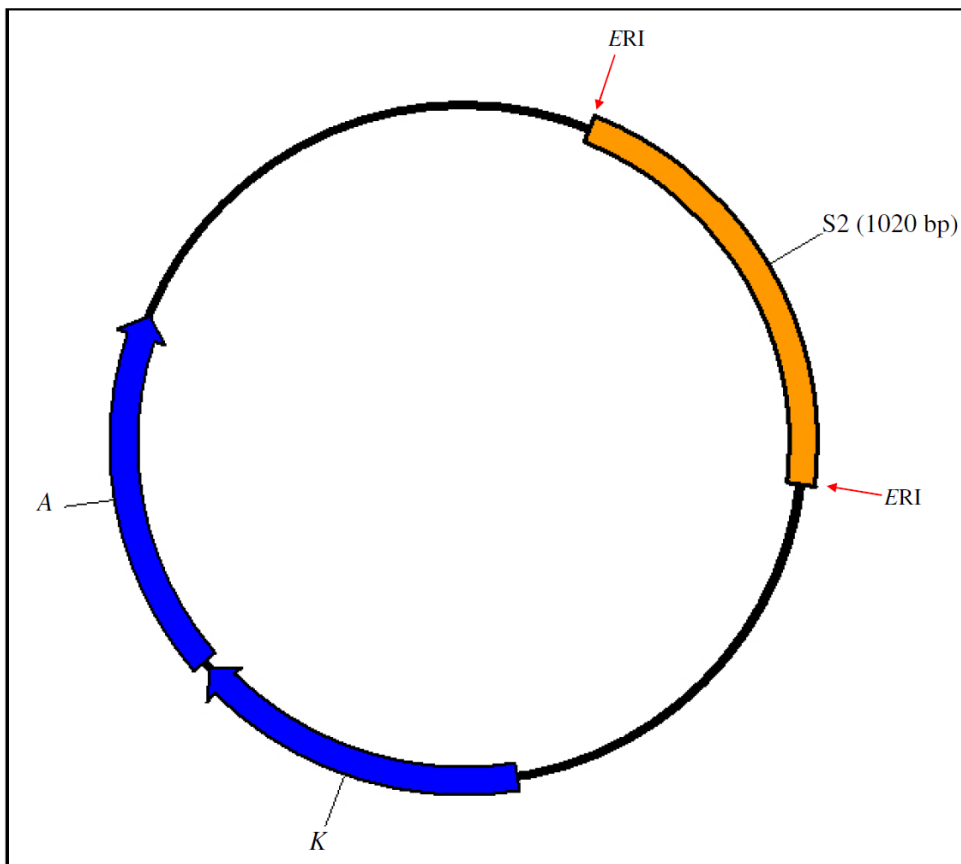


Abbildung 3.4b

Abbildung 3.2: Schematische Darstellungen der pAN7-1-Insertionsstelle im Promotorbereich des *PFPI*-Gens der REMI-Mutante LB20₅₇.

Die Abbildungen 3.2a-c zeigen die zweifache Integration des linearisierten pAN7-1-Vektors in den 5'-untranslatierten Bereich des *PFPI*-Gens. Blaue Pfeile zeigen die kodierenden Sequenzen sowie die Lese-Richtungen des Hygromycin-B-Phosphotransferase-Gens *HPH* (*H*) und der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Sequenz des *PFPI*-Gens (Exon 1, E1). Blau-weiß schraffiert ist das zweite Exon (E2) der kodierenden Sequenz des *PFPI*-Gens dargestellt, das erst später identifiziert wurde (s. 3.2.1.2). Mit roten Pfeilen markiert sind die Promotorsequenzen des Gens der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase P_{gpd} (*P*) aus *Aspergillus nidulans*. Grüne Boxen zeigen die Terminatorsequenzen T_{trpC} (*T*) des Strukturgens *TRPC* des Tryptophan-Operons ebenfalls aus *A. nidulans*. Mit senkrechten roten Pfeilen dargestellt, sind die Insertionsrestriktionsstellen des Enzyms *Bam*HI (*BHI*) sowie die Restriktionsstellen der für das DNA-Hybridisierungsexperiment verwendeten Enzyme *S*alI (*SI*, Abb. 3.2a), *N*heI (*NI*, Abb. 3.2b) und *B*stEII (*BEII*, Abb. 3.2c). Waagerechte rote Pfeile geben die erwarteten und im Hybridisierungsexperiment markierten Fragmentgrößen an. Die Bindungsstellen der verwendeten Sonden 1 und 2 (*S*1, *S*2) sind mit orangen Linien markiert.

Abbildung 3.3: Schematische Darstellungen der *PFPI*-Genstruktur im *R.-commune*-Wildtyp UK7.

Die Abbildungen 3.3a-c zeigen die Genstruktur des *PFPI*-Gens im Wildtyp UK7. Mit blauem Pfeil dargestellt ist die bis zu diesem Zeitpunkt bekannte kodierende Sequenz des Gens (Exon 1, E1). Der blau-weiß schraffierte Pfeil zeigt das erst später identifizierte Exon 2 (E2) (s. 3.2.1.2). Senkrechte rote Pfeile kennzeichnen die *Bam*HI (*BHI*)-Insertionsstellen sowie die Restriktionsstellen der für die DNA-Hybridisierung eingesetzten Enzyme (vgl. Abb. 3.2a-c). Waagerechte rote Pfeile geben die durch die jeweilige Restriktion entstehenden spezifischen Fragmentgrößen an. Die orange Linie gibt die Bindungsstelle der Sonde 2 (*S*2) an.

Abbildung 3.4: Schematische Darstellungen des Plasmids pAN7-1 und des Vektors pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR.

Die Abbildungen 3.4a und 3.4b zeigen die Vektoren pAN7-1 (a; 6756 bp) bzw. pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR (b; 4969 bp), die zur Herstellung der Sonden 1 und 2 für die DNA-Hybridisierungen genutzt wurden. Blaue Pfeile zeigen die kodierenden Sequenzen der Hygromycin-B- (*H*, Abb. 3.4a) sowie der Kanamycin- (*K*) und Ampicillin-Resistenzkassetten (*A*, Abb. 3.4b). Der rote Pfeil kennzeichnet die Promotorsequenz der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase P_{gpd} (*P*), die grüne Box die Terminatorsequenz des *TRPC*-Gens aus *A. nidulans* (vgl. Abb. 3.2a-c). Die schmalen roten Pfeile markieren die Restriktionsstellen der für die Hybridisierungen sowie zur Sondenherstellung verwendeten Enzyme. Die Sonden 1 und 2 sind orange dargestellt. Sonde 1 (*HPH*) wurde per PCR mit den Oligonukleotiden 1 und 2 (*O*1s & *O*2as entspr. *HPH*1s & *HPH*2as) aus dem pAN7-1-Vektor amplifiziert, Sonde 2 (*PFPI*-5'-UTR) wurde aus dem Vektorkonstrukt pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR mit *E*coRI (*ERI*) isoliert.

3.1.2 Untersuchungen zur Expression des *PFPI*-Gens

Wie in Kapitel 3.1.1 gezeigt, konnte in der Mutante LB20₅₇ ein eindeutiges REMI-Ereignis nachgewiesen werden. Der Vektor pAN7-1 integrierte zweimal direkt hintereinander in „Kopf-Schwanz“-Richtung in den 5'-untranslatierten Bereich des *PFPI*-Gens. Der bis dahin nachgewiesene offene Leserahmen des Gens von 2613 bp war nicht verändert, so dass keine Gendeletion vorlag. Jedoch konnte durch die Insertion die Expression des Gens betroffen sein. Diese Frage sollte mit zwei experimentellen Ansätzen überprüft werden.

3.1.2.1 Semiquantitative Expressionsanalysen durch RT-PCR

Zunächst wurden semiquantitative Expressionsanalysen durchgeführt. Aus zuvor in Flüssigmedium angezogenem 10 d altem Myzel der REMI-Mutante LB20₅₇, der REMI-Komplementationsmutante sowie des Wildtyps UK7 wurde Gesamt-RNA isoliert und diese durch reverse Transkription in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Expression des *PFPI*-Gens sollte mit einem konstitutiv exprimierten Gen aus *R. commune* verglichen werden. In diesem Fall wurde dazu das Gen für α -Tubulin (*α -TUB*) verwendet. Durch Amplifikation der cDNA mittels PCR konnte der Expressionsstatus der beiden Gene semiquantitativ nachgewiesen werden.

Die Länge der kodierenden Bereiche der beiden Gene sowie die Positionen der für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide ist in der Abbildung 3.5 schematisch dargestellt. Um den direkten Nachweis der Expression sowohl des *α -TUB*- als auch des *PFPI*-Gens zu erhalten, wurde die Methode der Multiplex-PCR angewendet, wodurch beide Gene im identischen PCR-Ansatz amplifiziert werden konnten. Für α -Tubulin wurden die Oligonukleotide atu3s und atu2as verwendet, *PFPI* wurde mit PFP27s und Fusion-Primer4as amplifiziert (#7/#8 & #64/#18, s. 7.1). Die PCR-Reaktionen wurden sowohl nach 23 als auch nach 24 Zyklen auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen. Sowohl α -Tubulin als auch *PFPI* konnten in allen Reaktionen amplifiziert werden, was für eine Expression beider Gene in den getesteten Mutanten und im Wildtyp UK7 spricht (Abb. 3.6). In der Komplementationsmutante wurde dieses Ergebnis erwartet, da diese mit der endogenen *PFPI*-Sequenz transfiziert wurde. In der REMI-Mutante spricht die im Vergleich zum Wildtyp anscheinend erhöhte Expression von *PFPI* für einen regulatorischen Effekt, der vermutlich durch die Insertion der pAN7-1-Vektor-DNA in den Promotorbereich des Gens bewirkt wurde.

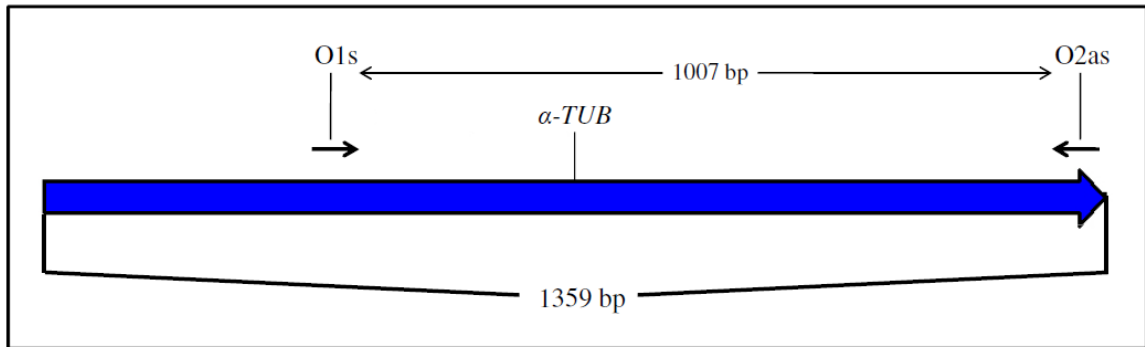


Abbildung 3.5a

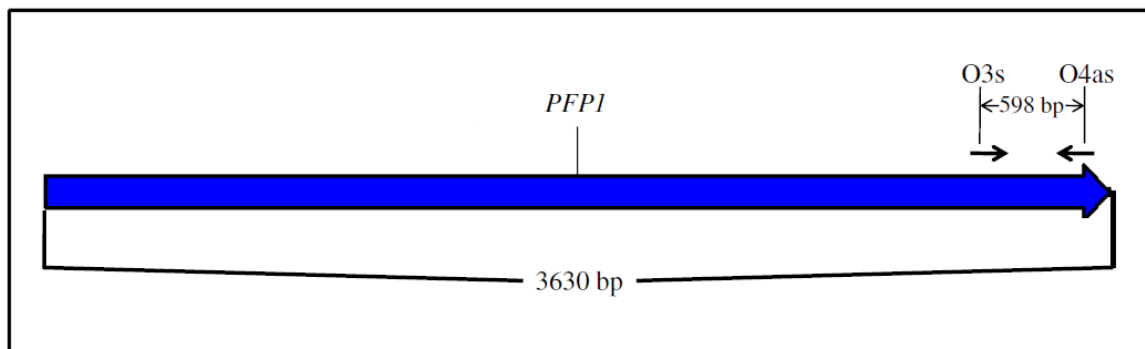


Abbildung 3.5b

Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche der Gene α -Tubulin (a; α -TUB) und PFPI (b) sowie der Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide.

Die blauen Pfeile kennzeichnen die Längen der kodierenden Bereiche der beiden Gene. Die waagerechten schwarzen Pfeile zeigen die Bindungsstellen der für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide (O1-O4) sowie die Längen der amplifizierten DNA-Fragmente (α -TUB – 1007 bp; PFPI – 598 bp).

O1s und O2as – atu3s und atu2as; O3s und O4as – PFP27s und Fusion-Primer4as.
s – sense; as - antisense

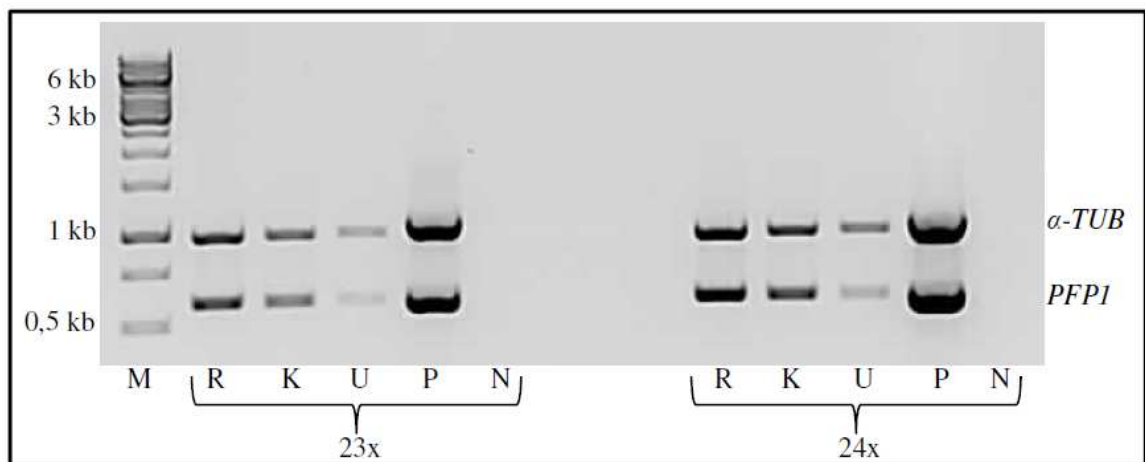


Abbildung 3.6

Abbildung 3.6: Gelelektrophoretische Auftrennung der Multiplex-PCR zur Amplifizierung der cDNA-Fragmente von α -*TUB* sowie *PFPI*.

Durch Multiplex-PCR wurden α -*Tub* und *PFPI* in identischen Ansätzen amplifiziert. Als Matrize wurde cDNA der REMI-Mutante LB20₅₇ (R), der REMI-Komplementationsmutante (K) und des Wildtyp-Isolats UK7 (U) eingesetzt. Als Positivkontrolle (P) der PCR diente genomische DNA von UK7. Die Negativkontrolle (N) enthielt keine Matrizen-DNA.

Die PCR-Reaktionen wurden sowohl nach 23 als auch nach 24 Zyklen auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA-Fragmente durch UV-Licht detektiert.

3.1.2.2 Quantitative Expressionsanalysen durch Real-Time-PCR

Zur genaueren Quantifizierung der *PFPI*-Transkriptmengen in der REMI- sowie REMI-Komplementationsmutante im Vergleich zum Wildtyp wurde eine quantitative Real-Time-PCR durchgeführt. Dafür wurde erneut Myzel der beiden *R.-commune*-Mutanten sowie des Wildtyps UK7 in drei unabhängigen biologischen Versuchen angezogen und jeweils Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkription in komplementäre DNA wurde diese für die Real-Time-PCR-Experimente in jeweils drei technischen Replikaten eingesetzt. Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (*GPD*) aus *R. commune* amplifiziert. Die kodierenden Bereiche beider Gene sowie die Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide sind in der Abbildung 3.7 schematisch dargestellt. Für die Real-Time-PCR wurden sehr kleine Fragmente ausgewählt (~ 100 bp). *GPD* wurde mit den Oligonukleotiden Gpd-RTs und Gpd-RTas, *PFPI* mit PFP1-RT1s und PFP1-RT1as amplifiziert (#34/#35 & #47/#48, s. 7.1).

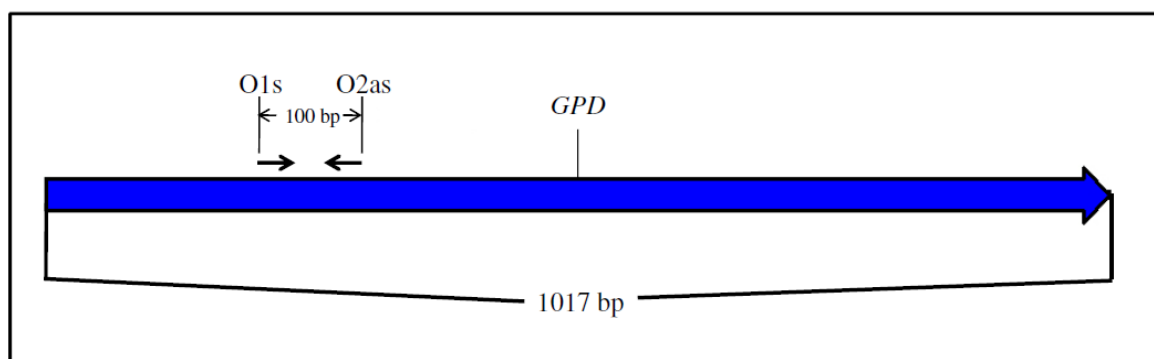


Abbildung 3.7a

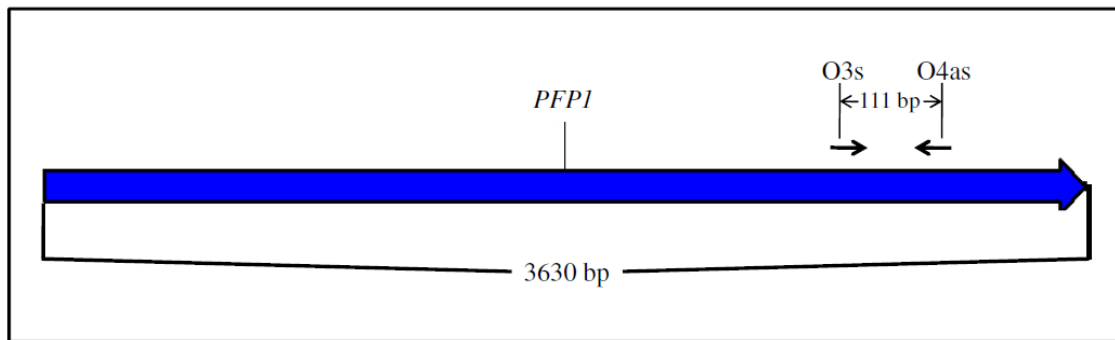


Abbildung 3.7b

Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der kodierenden Bereiche von *GPD* und *PFPI* sowie der Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide.

Die Abbildungen zeigen die Längen der kodierenden Genabschnitte von *GPD* und *PFPI* (blaue Pfeile). Waagerechte schwarze Pfeile geben die Bindungsstellen der Oligonukleotide (O1-O4), sowie die Längen der amplifizierten DNA-Fragmente an (*GPD* – 100 bp; *PFPI* – 111 bp).

O1s und O2as – Gpd-RTs und Gpd-RTas; O3s und O4as – PFPI-RTs und PFPI-RTas.

s – sense; as - antisense

Die Real-Time-PCR-Experimente wurden nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001) ausgewertet. Die ermittelten C_t -Werte beider Gene aus allen technischen und den biologischen Replikaten wurden gemittelt und für die Berechnung der relativen Expressionsrate eingesetzt. Dabei diente *GPD* als Referenzgen, *PFPI* als Zielgen oder als Gen, dessen Expressionsrate in der Probe bestimmt werden sollte. Dafür wurde der Quotient aus den C_t -Werten der Bezugsgröße und des Zielgens unter Einbeziehung der Spezifität der jeweils eingesetzten Oligonukleotide (E-Werte, Pfaffl, 2001) berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 grafisch dargestellt. Wie man sehr deutlich erkennen kann, zeigt die relative Expressionsrate des *PFPI*-Gens sowohl in der REMI- als auch in der Komplementationsmutante eine Erhöhung, welche unter Einbeziehung des statistischen t-Tests als signifikant gegenüber dem Wildtyp UK7 eingestuft werden kann. Die Daten zeigen eine 5-fache Erhöhung der *PFPI*-Expressionsrate in der REMI-Mutante und eine 7,5-fache Erhöhung in der Komplementationsmutante. Die vermehrte Expression von *PFPI* in der Komplementationsmutante entsprach den Erwartungen, da die endogene *PFPI*-Sequenz in mehreren Kopien in das Genom der REMI-Mutante integriert vorlag (s. auch 3.1.1). Ein erhöhter *PFPI*-Expressionslevel in der REMI-Mutante war unerwartet, bestätigte aber die bereits in 3.1.2.1 beschriebenen Ergebnisse. Die Resultate beider Expressionsanalysen gaben erste Hinweise auf eine mögliche übergeordnete regulatorische Funktion des *PFPI*-Gens in der Pathogenese des Pilzes. Der apathogene Phänotyp der REMI-Mutante LB20₅₇ auf suszeptiblen Gerstenpflanzen wurde also anscheinend nicht, wie zunächst angenommen, durch eine verminderte Expression

des *PFPI*-Gens ausgelöst, sondern steht vermutlich in Zusammenhang mit einer durch die pAN7-1-Insertion gestörten Genregulation. Für diese Interpretation spricht auch der beobachtete Phänotyp der Komplementationsmutante, welche trotz hoher *PFPI*-Expression stark verminderte Virulenz auf suszeptiblen Gerstenpflanzen zeigt.

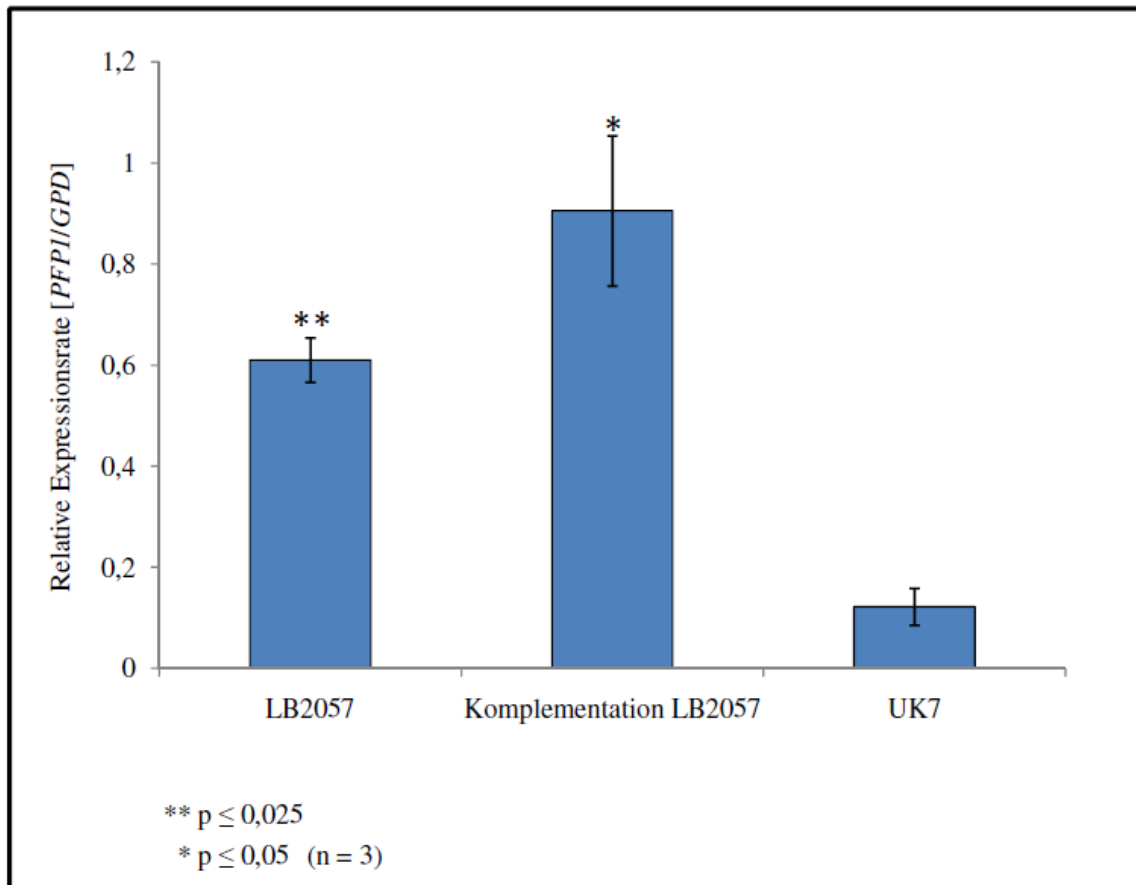


Abbildung 3.8: Grafische Darstellung der durch Real-Time-PCR-Experimente ermittelten relativen *PFPI*-Expressionsraten in der REMI-Mutante LB2057 sowie der REMI-Komplementationsmutante im Vergleich zum Wildtyp-Isolat UK7.

Die C_t -Werte wurden aus jeweils drei biologischen sowie drei technischen Replikaten gemittelt. Die Berechnung der relativen Expressionsrate von *PFPI* erfolgte nach Pfaffl (2001). Das konstitutiv exprimierte *GPD* diene als Referenzgen oder Bezugsgröße zum Zielgen *PFPI*.

p – Wahrscheinlichkeit der Signifikanz (t-Test); n – Freiheitsgrade (Anzahl biologischer Replikate)

3.2 Charakterisierung des *PFPI*-Gens

3.2.1 Aufklärung der *PFPI*-Genstruktur

In der REMI-Mutante LB20₅₇ konnte 274 bp stromabwärts der pAN7-1-Insertionsstelle ein offener Leserahmen von 2613 bp identifiziert werden. Mittels 5'- bzw. 3'-RACE-PCR wurden mehrere cDNA-Sequenzen analysiert. Vier der fünf cDNA-Sequenzen endeten auf 5'-Seite nur wenige Basenpaare stromabwärts der *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle, in die der Vektor pAN7-1 inseriert war. Die cDNA-Sequenz zeigte stromaufwärts vom putativen Translationsstart mehrere Stopptripletts. In 3'-Richtung konnten zwei cDNA-Sequenzen ausgewertet werden, wobei eine 44 bp stromaufwärts des putativen Translationsstoppcodons, die andere 44 bp stromabwärts davon endete (Albert & Knogge, unveröffentlichte Ergebnisse).

Um die exakte Exon-Intron-Struktur des *PFPI*-Gens zu identifizieren bzw. frühere Befunde zu verifizieren, wurde erneut RACE-PCR in 5'- sowie 3'-Richtung des Gens durchgeführt.

3.2.1.1 Identifizierung des 5'-Bereiches

Für die Amplifikation des 5'-Bereichs wurde ein SMART[™] RACE-PCR-Kit von Clontech Laboratories, Inc. verwendet. Diese Methode ermöglicht durch den Einsatz eines speziellen Oligonukleotids sowie einer Reversen Transkriptase aus dem Moloney Murinen Leukämie-Virus (MMLV RT) mit besonderen Eigenschaften die Anreicherung und Vervielfältigung von 5'-Enden der cDNA (siehe Herstellerangaben). Aus Myzel des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7 wurde Gesamt-RNA isoliert und für die cDNA-Herstellung eingesetzt. Um eine möglichst hohe Ausbeute an *PFPI*-cDNA zu erhalten, wurde für die Erststrangsynthese ein Gen-spezifisches Oligonukleotid in *antisense*-Richtung (PFP21as, #61, s. 7.1, vgl. Abb. 3.11) sowie ein SMART-II[™]-A-Oligonukleotid der Firma Clontech auf 5'-Seite eingesetzt (Sequenz siehe Handbuch des Herstellers). PFP21as diente anstelle des meist genutzten Oligo-dT als Startoligonukleotid für die Erststrangsynthese der cDNA. Das 3'-Ende der amplifizierten cDNA befand sich somit weiter stromaufwärts in der Gensequenz, was eine Amplifikation des 5'-Endes erleichterte. Für die nachfolgende Doppelstrangsynthese wurde wiederum PFP21as und ein im SMART[™]-RACE-PCR-Kit enthaltener *Universal Primer A Mix* (UPM, Sequenz siehe Handbuch des Herstellers) eingesetzt, welcher eine komplementäre Sequenz zum zuvor genutzten SMART-II[™]-A-Oligonukleotid enthielt. Auf die doppelsträngige cDNA wurden als letzte Amplifikationsschritte drei unabhängige PCR-Reaktionen angesetzt. Als Oligonukleotid auf 5'-Seite diente ein ebenfalls im RACE-PCR-Kit enthaltener *Nested Universal Primer A* (NUP, Sequenz siehe Handbuch des Herstellers), in *antisense*-

Richtung wurden drei verschiedene Oligonukleotide eingesetzt. Zum einen PFP21as, zum anderen zwei weiter stromaufwärts bindende Oligonukleotide (PFP22as und PFP23as, #63, s. 7.1, vgl. Abb. 3.11). Die drei PCR-Reaktionen wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.9). Wie deutlich zu erkennen ist, konnte nur in der PCR-Reaktion mit der Oligonukleotid-Kombination *NUP*/PFP23as ein DNA-Fragment von ca. 400 bp amplifiziert werden. Die Bande wurde aus dem Gel eluiert, über TA-Klonierung in den Vektor pCR2.1 ligiert und nachfolgend sequenziert.

Die Auswertung der Sequenzierung ist im Anhang in Abbildung 7.2.1.1 gezeigt. Der Sequenzvergleich zeigt deutlich die Homologie des 417 bp langen DNA-Fragments zum 5'-Bereich der *PFPI*-Gensequenz. Dabei konnten noch 239 Basenpaare über das putative Translationsstartcodon hinaus amplifiziert werden. Zusätzlich sind die Sequenz des Oligonukleotids PFP23as sowie alle im 5'-Bereich verwendeten Oligonukleotide (SMART-IITM-A-Oligonukleotid, *UPM*, *NUP*) im Sequenzvergleich markiert. Dabei bindet das SMART-IITM-A-Oligonukleotid direkt nach dem Ende der sequenzierten cDNA, was auf den Anfang des Transkripts an dieser Stelle hinweist. Das SMART-Oligonukleotid bindet ausschließlich an die Cytosin-Überhänge am 5'-Ende der amplifizierten cDNA, die durch die MMLV-RT angehängt werden (SMART-Technologie, siehe Handbuch des Herstellers) und bildet somit einen „Anker-Mechanismus“ zur vollständigen Identifikation des Anfangsbereichs transkribierter Gene. Die von der cDNA-Sequenz abgeleitete Protein-Sequenz zeigte zudem mehrere Stoppcodons stromaufwärts des putativen Start-Methionins, so dass ein Translationsstart an anderer Stelle der Gensequenz unwahrscheinlich ist.

Interessanterweise konnte der Beginn der cDNA-Sequenz und damit der Transkriptionsstart des *PFPI*-Gens nur wenige Basenpaare (31 bp) stromabwärts der *Bam*HI-Insertionsstelle lokalisiert werden. Dies gilt als ein weiterer Hinweis darauf, dass durch die Integration des pAN7.1-Vektors an dieser Stelle in der REMI-Mutante LB20₅₇ die Transkription des Gens möglicherweise entscheidend gestört wurde, und demnach der apathogene Phänotyp dieser Mutante nicht auf den Ausfall des Gens, sondern vermutlich auf eine gestörte Transkriptionsregulation zurückzuführen ist.

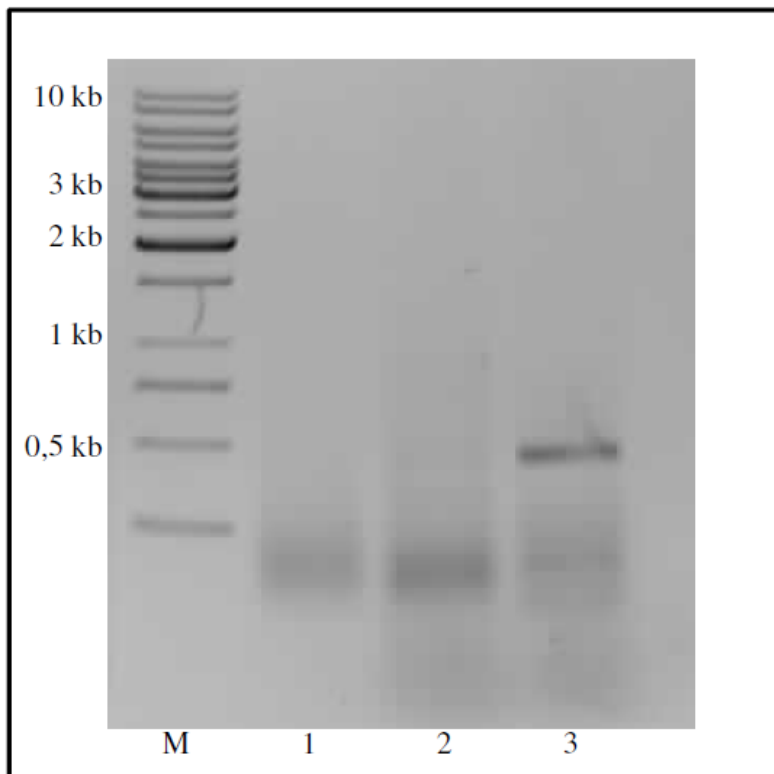


Abbildung 3.9: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR zur Amplifizierung des 5'-Bereiches der *PFPI*-Gensequenz.

Die Spuren 1, 2 und 3 zeigen die Ergebnisse der drei 5'-RACE-PCR. Ausschließlich in Spur 3 ist eine Bande von ca. 400 bp zu erkennen, welche mit der Oligonukleotid-Kombination *NUP/PFP23as* amplifiziert werden konnte.

1 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination *NUP/PFP21as*; 2 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination *NUP/PFP22as*; 3 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination *NUP/PFP23as*; M – 1 kb-DNA-Größenstandard.

3.2.1.2 Identifizierung des 3'-Bereiches

Um den 3'-Bereich des *PFPI*-Gens zu identifizieren, wurde wiederum Gesamt-RNA aus dem Myzel des *R.-commune*-Wildtyps UK7 isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die Erststrangsynthese wurde dazu ein Oligo-dT-*Primer* mit einer spezifischen Sequenz am 3'-Ende verwendet (Oligo-dT-spec, #44, s. 7.1). Die so erhaltene einzelsträngige cDNA wurde für die folgenden primären PCR-Reaktionen eingesetzt. Dabei wurde auf 3'-Seite der cDNA ein an die spezifische Sequenz des Oligo-dT-spec-*Primers* bindender *nested-Primer* (Oligo-dT-out, #45, s. 7.1) verwendet. In *sense*-Richtung wurden vier Genspezifische Oligonukleotide eingesetzt (PFP3s, PFP7s, PFP19s sowie PFP13s, #52, #54, #59, #55, s. 7.1, vgl. Abb. 3.11). Die doppelsträngige cDNA wurde in wiederum vier letzten PCR-Schritten mit verschiedenen *Primer*-Kombinationen amplifiziert. Auf 3'-Seite wurde erneut ein zum Oligo-dT-out komplementärer *nested-Primer* eingesetzt (Oligo-dT-in, #46, s. 7.1). Auf 5'-Seite wurden vier genspezifische jeweils weiter

stromabwärts bindende Oligonukleotide genutzt (PFP7s, PFP19s, PFP13s sowie PFP20s, #54, #59, #55, #60, s. 7.1, vgl. Abb. 3.11). Die Auswertung dieser PCR-Reaktionen erfolgte mittels 1%igem Agarosegel (Abb. 3.10). Nur in der PCR mit der Oligonukleotid-Kombination Oligo-dT-in/PFP13s (Spur 3) konnten zwei stärkere Banden bei ca. 1,7 kb bzw. 800 bp amplifiziert werden. Diese wurden aus dem Gel eluiert, in den Vektor pCR2.1 kloniert und anschließend sequenziert.

Beide Sequenzen zeigten Homologien zum 3'-Bereich des *PFPI*-Gens. Der Sequenzvergleich des 1,7 kb langen DNA-Fragmentes mit der *PFPI*-Gensequenz ist in Abbildung 7.2.1.2 im Anhang gezeigt. Das Fragment umfasst eine exakte Länge von 1691 bp, und wird begrenzt durch die in 5'- und 3'-Richtung verwendeten Oligonukleotide (PFP13s und Oligo-dT-spec/Oligo-dT-out/Oligo-dT-in). Bei einer Länge von 5407 bp der genomischen Sequenz ist das Poly[A]-Ende markiert, welches das 3'-Ende des Transkriptes darstellt. Da der *Primer* PFP13s in *sense*-Richtung noch vor dem 3'-Ende des bisher angenommenen offenen Leserahmens bindet, konnte die cDNA über das putative Stoppcodon hinaus amplifiziert werden. Wie allerdings im Sequenzvergleich sichtbar ist, schließt sich exakt an dieser Stelle eine Lücke in der Sequenzierung an, welche in der genomischen Sequenz des *PFPI*-Gens nicht angezeigt wird. Über die GT-AG-Grenzen der Sequenz kann dies als 45 bp langes Intron in der *PFPI*-Gensequenz identifiziert werden. Die nachfolgende Sequenz stellt somit ein zweites Exon in der Gensequenz dar, welches bis zum Stoppcodon bei 5204 bp (TGA) einen zusätzlichen Leserahmen markiert (vgl. Abb. 1.9). Bis zum Poly[A]-Ende können in der translatierten cDNA-Sequenz mehrere zusätzliche Stoppcodons nachgewiesen werden, so dass das identifizierte 3'-Ende als abgesichert betrachtet werden kann. Das Translationsende des *PFPI*-Gens liegt also nicht, wie zunächst angenommen bei 4141 bp, sondern bei 5203 bp der genomischen Sequenz. Abzüglich der Intron-Sequenz entspricht dies einer Verlängerung des offenen Leserahmens um 1017 bp.

Die Exon-Intron-Struktur des *PFPI*-Gens sowie die Position der verwendeten genspezifischen Oligonukleotide sind in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt. Das Gen umfasst nicht, wie zunächst angenommen, nur einen offenen Leserahmen, sondern besteht aus zwei Exons, die durch ein kurzes Intron getrennt sind. Die gesamte kodierende Sequenz des *PFPI*-Gens umfasst somit eine Länge von 3630 bp, was einer abgeleiteten Protein-Sequenz von 1210 Aminosäuren entspricht.

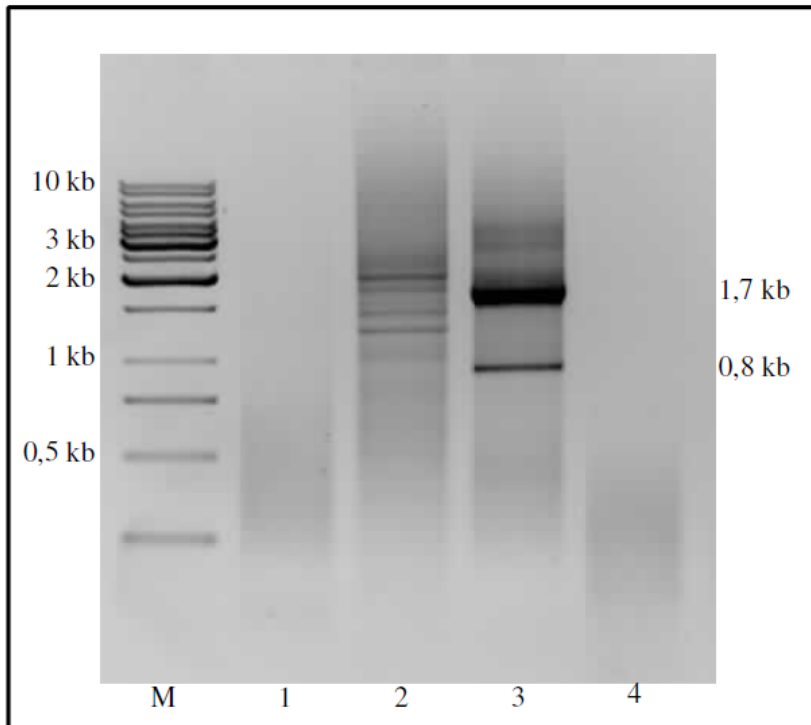


Abbildung 3.10: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte nach Amplifizierung des 3'-Bereiches der *PFPI*-Gensequenz.

Die Spuren 1-4 zeigen die Ergebnisse der 3'-RACE-PCR. Mit der Oligonukleotid-Kombination PFP13s/Oligo-dT-in (3) konnten zwei DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Fragmente wurden aus dem Gel eluiert und zur Sequenzierung eingesetzt.

1 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination PFP7s/Oligo-dT-in; 2 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination PFP19s/Oligo-dT-in; 3 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination PFP13s/Oligo-dT-in; 4 – PCR mit der Oligonukleotid-Kombination PFP20s/Oligo-dT-in; M – 1 kb-DNA-Größenstandard

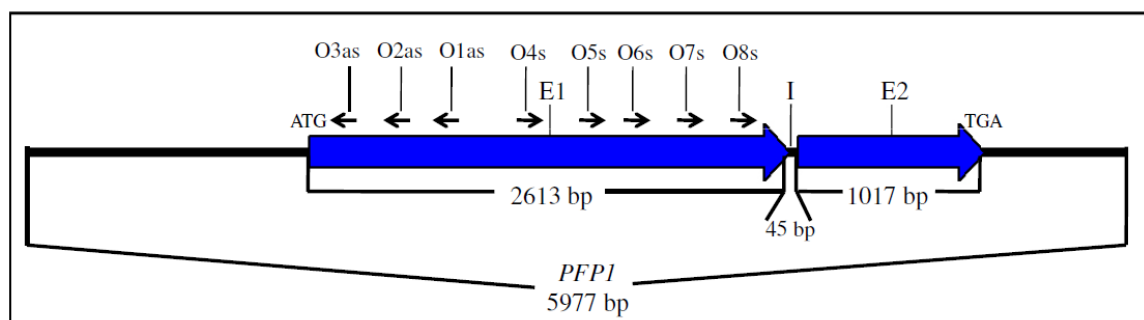


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der *PFPI*-Genstruktur.

Die Abbildung zeigt die Exon-Intron-Struktur des *PFPI*-Gens. Die gesamte bekannte Sequenz umfasst 5977 bp. Exon1 (E1, 2613 bp) und Exon2 (E2, 1017 bp) sind durch ein Intron (I, 45 bp) getrennt. O1as-O8s bezeichnen die für die Amplifikation des 5'- und 3'-Bereiches genutzten genspezifischen Oligonukleotide. O1as – PFP21as, O2as – PFP22as; O3as – PFP23as; O4s – PFP3s; O5s – PFP7s; O6s – PFP19s; O7s – PFP13s; O8s – PFP20s; ATG – Startcodon; TGA – Stoppcodon.

3.2.2 Expressionsstudien

3.2.2.1 Studien zum pilzlichen Wachstum sowie zur *PFPI*-Genexpression *in planta*

Die Expression eines Gens in Abhängigkeit von der Entwicklung eines Organismus stellt ein wesentliches Kriterium zu seiner funktionellen Charakterisierung dar. Aus diesem Grund wurden quantitative Untersuchungen zur Expression des *PFPI*-Gens während des Infektionsverlaufs (*in planta*) durchgeführt, um einen Einblick in den funktionellen Zusammenhang von Expressionskinetik und Pathogenese zu erhalten.

Für dieses Experiment wurden die Gerstensorten Ingrid (hoch suszeptibel), Atlas (moderat suszeptibel) sowie Atlas 46 (resistent) mit dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 infiziert. Die Infektionen aller Interaktionen wurden jeweils dreimal wiederholt, um den biologischen Fehler zu minimieren. Zu sieben verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation wurden infizierte Blattproben für die spätere Isolierung von Nukleinsäuren sowie zur Färbung für mikroskopische Aufnahmen genommen. Die Proben zur Nukleinsäure-Isolierung wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Blätter für die mikroskopischen Aufnahmen wurden zunächst geklärt („entchlorophyllisiert“) und danach mit Trypanblau angefärbt. Die Zeitpunkte umfassten: 0 d (1 Stunde nach Infektion), 1 d, 3 d, 6 d, 10 d, 14 d und 21 d nach Inokulation. Nach jeweils 14 (Ingrid) bzw. 21 Tagen (Atlas, Atlas 46) wurden die Blattsymptome fotografisch festgehalten.

Ziel des Experimentes war es, den Infektionsverlauf jeder untersuchten *Rhynchosporium*-Gerste-Interaktion sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch festzuhalten und das Wachstum des Pilzes *in planta* zu quantifizieren. Des Weiteren sollte die Expression des *PFPI*-Gens während der Pathogenese untersucht und somit seine mögliche Rolle im Krankheitsverlauf erörtert werden. Die quantitativen Analysen zur Wachstums- und Expressionskinetik wurden mittels Real-Time-PCR durchgeführt.

3.2.2.1.1 Wachstumskinetik

Um das Wachstum des Pilzes auf den verschiedenen Gerstensorten quantitativ zu analysieren, wurden mittels Real-Time-PCR sowohl ein Gersten- als auch ein Pilzgen zu den verschiedenen Zeitpunkten amplifiziert. Das Verhältnis aus der Menge der beiden Amplikons sollte zu jedem Zeitpunkt als Maß für die Menge an gebildetem Pilzmyzel stehen. Als Matrize für jede durchgeführte PCR wurde aus den Blattproben isolierte genomische DNA eingesetzt, die sowohl Gersten-DNA als auch DNA des Pilzes enthielt. Deshalb war es von großer Wichtigkeit, dass die ausgewählten Gene nur in jeweils einem der beiden Organismen vorhanden bzw. dass die verwendeten Oligonukleotide spezifisch für diese Gensequenzen waren. Dies wurde in Vorversuchen getestet (Daten nicht gezeigt). Auf Pflanzenseite wurde ein Fragment des Gens HO05J24 amplifiziert, dessen

mRNA zunächst in Transkriptomanalysen in der Epidermis der Gerstensorte Ingrid 6 und 24 Stunden nach Infektion mit dem Gerstenpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* identifiziert werden konnte (Zierold *et al.* 2005). Ähnliche Analysen wurden auch für *Rhynchosporium commune*-Gerste-Interaktionen 24 und 48 Stunden nach Infektion durchgeführt. Auch hier konnte das Transkript in den Epidermen der eingesetzten Gerstensorten (Atlas und Atlas 46) nachgewiesen werden (Basak, unveröffentlichtes Ergebnis). Sequenzvergleiche mit der Datenbank (NCBI, blastx 2.2.23, Altschul *et al.*, 1997) ergaben 77% Ähnlichkeit zu einem putativen Ankyrin-Repeat-Protein aus Weizen (*Triticum aestivum* L.). Vorversuche zeigten, dass das DNA-Fragment nur in den Gerstenproben amplifiziert werden konnte, nicht aber im Pilz, so dass eine Kreuzreaktion der Oligonukleotide in der Real-Time-PCR mit pilzlicher genomischer DNA auszuschließen war. Auf Pilzseite wurde ein Fragment der Gensequenz der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Rhynchosporium commune* (*GPD*) amplifiziert (s. 3.1.2.2), welches wiederum in den Gerstenproben nicht nachweisbar war. Die Struktur des Gerstengens (HO05J24) sowie die Position der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 3.12 schematisch dargestellt. *GPD* sowie die Bindungsstellen der Oligonukleotide wurden bereits in Abbildung 3.7 in Kapitel 3.1.2.2 gezeigt.

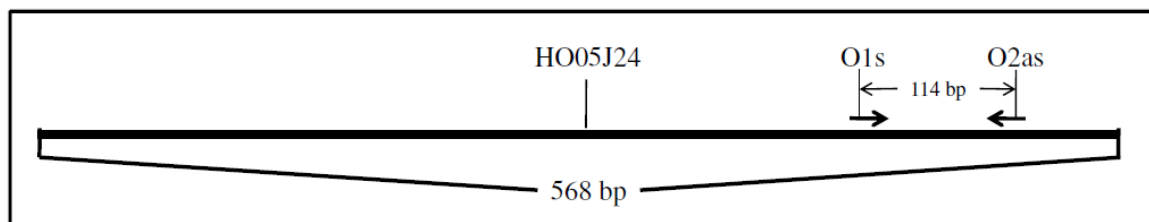


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des Gerstengens HO05J24 sowie die Positionen der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide.

Die Abbildung zeigt die vorläufig bekannte Genstruktur des 5'-Bereiches des Gerstengens HO05J24 (Genbank Acc CDO58235, EST cDNA-Klon), welches 568 bp umfasst. Die für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide (O1s und O2as) sind durch waagerechte schwarze Pfeile markiert und amplifizieren ein DNA-Fragment von 114 bp.

O1s und O2as – HO05J24F und HO05J24R (#36/#37, s. 7.1)

Für die Durchführung der Wachstumsanalysen mittels Real-Time-PCR wurden die Blattproben aus jeweils drei biologischen Replikaten der Infektionsexperimente aller Gerste-*R. commune*-Interaktionen aufgearbeitet. Die Nukleinsäure-Isolierung erfolgte mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma QIAGEN. Mit dieser Methode erhält man sehr saubere RNA, jedoch gleichzeitig auch einen großen Anteil ebenfalls sehr reiner genomischer DNA, die sich gut als Matrize für die Real-Time-PCR eignet. Für jede der drei untersuchten Interaktionen wurde für jeden der vorhandenen Zeitpunkte sowohl das

DNA-Fragment des gewählten Gerstengens (HO05J24) als auch des Pilzgens (*GPD*) mit dem exakt übereinstimmenden PCR-Programm in derselben Real-Time-PCR-Maschine amplifiziert. Die Reaktionen wurden für alle drei biologischen Replikate in jeweils drei technischen Wiederholungen durchgeführt. Die relative Wachstumsrate des *R.-commune*-Isolats UK7 auf den jeweils unterschiedlichen Gerstensorten wurde aus den ermittelten C_t -Werten der Real-Time-Daten nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001) berechnet. Dabei diente HO05J24 als Referenzgen, *GPD* als Zielgen. Die Abbildung 3.13 zeigt die grafischen Darstellungen der ermittelten Daten. Die Kurven zeigen die Zunahme der relativen Biomasse des *R.-commune*-Isolats UK7 auf den drei verschiedenen Gerstensorten über einen Gesamtzeitraum von 0 bis 21 Tagen nach Inokulation. Wie erwartet zeigt die Interaktion UK7-Ingrid die höchste Wachstumsrate, da die Pflanze hoch suszeptibel gegenüber dem Wildtyp-Isolat des Pilzes ist. Besonders ab Tag sechs bis zum Tag zehn nach Inokulation steigt die Biomasse des Pilzes im Blatt stark an und hat nach 21 Tagen noch nicht ihren Höhepunkt erreicht, da sich bereits nach 14 Tagen ein dichtes Pilz-Stroma im Blatt gebildet hat, welches immer wieder neue Konidiosporen nachbildet (s. 3.2.2.1.2). Die moderat suszeptible Sorte Atlas zeigt im Vergleich zur Sorte Ingrid ein stark verzögertes pilzliches Wachstum. Die ermittelten relativen Werte bleiben über den gesamten untersuchten Zeitraum unter 0,05. Erst 14 Tage nach Inokulation ist ein leichter Anstieg des pilzlichen Wachstums zu verzeichnen. Atlas 46 hingegen erlaubt als resistente Gerstensorte so gut wie kein Wachstum des Pilzes. Die anfänglich gegenüber der Atlas-Infektion leicht erhöhte Biomasse des Pilzes ist durch Schwankungen in der Sporenzahl während der Sprühinokulation zu erklären (Abb. 3.13b). Die Sporen keimen zunächst alle aus, was einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Biomasse des Pilzes zur Folge hat. Ab Tag drei nach Infektion sinken die Werte allerdings auf ein Minimum ab und bleiben über den gesamten Versuchszeitraum nahezu konstant gering.

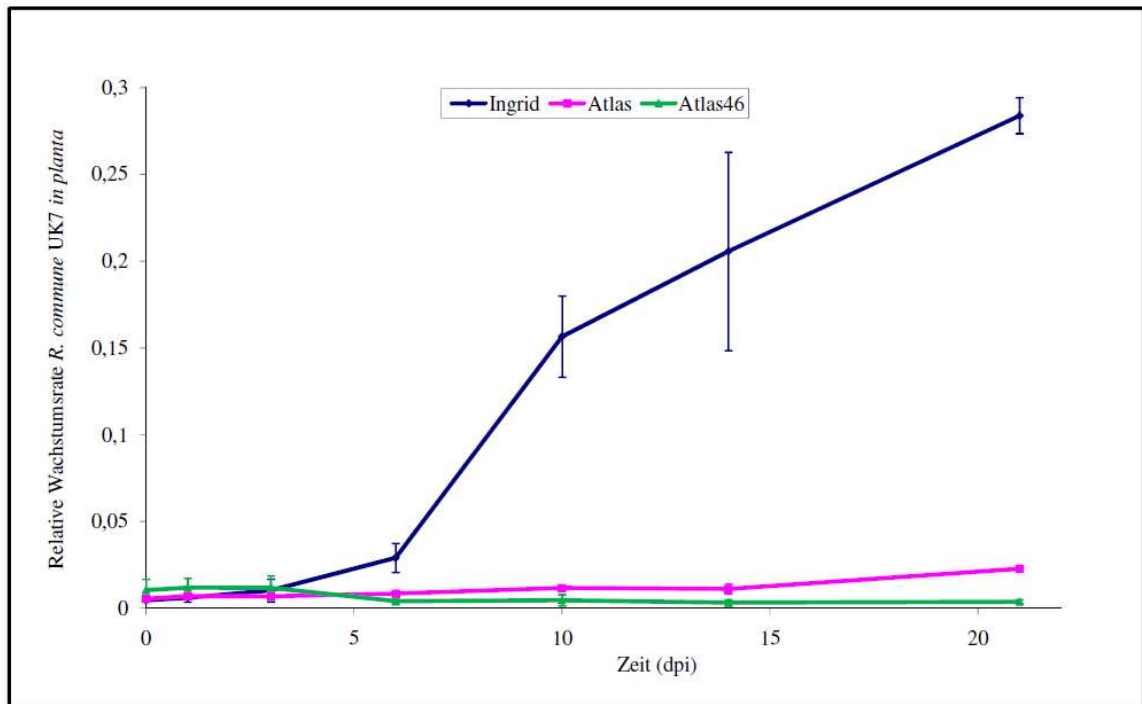


Abbildung 3.13a

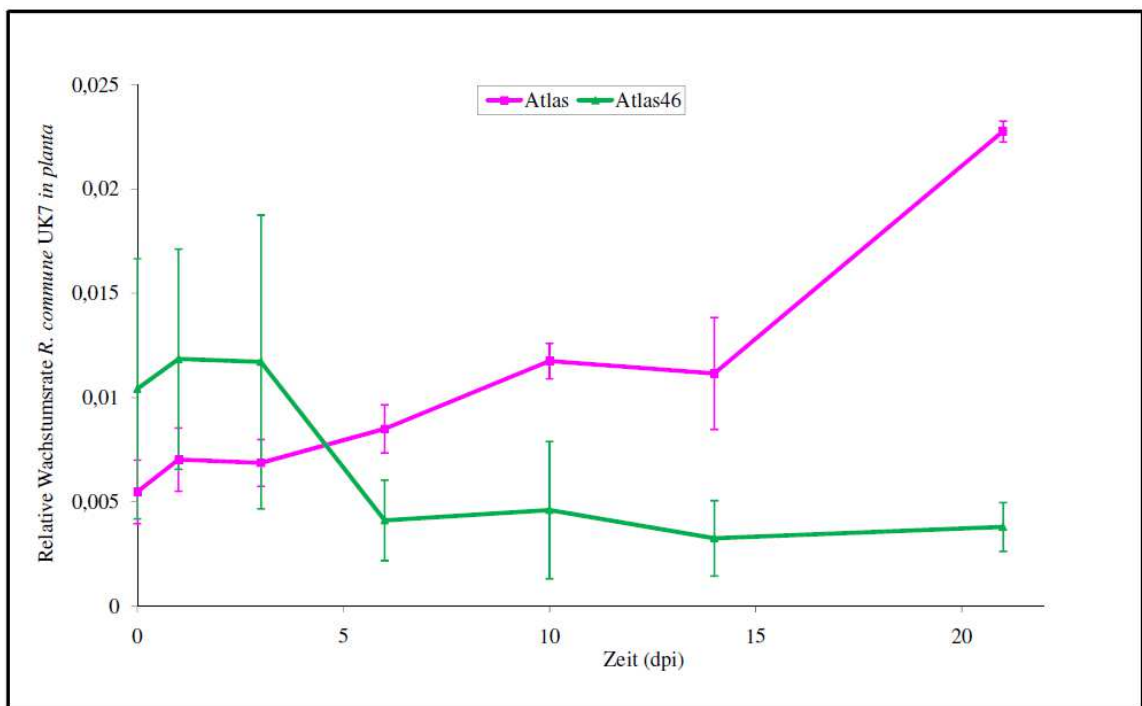


Abbildung 3.13b

Abbildung 3.13: Grafische Darstellung des pilzlichen Wachstums *in planta*.

Die Abbildungen zeigen die Zunahme der Biomasse des *R.-commune*-Isolats UK7 auf den Gerstensorten Ingrid, Atlas und Atlas 46 über einen Zeitraum von 21 d nach Inokulation. In Abbildung 3.13a sind alle drei Pilz-Pflanze-Interaktionen vergleichend dargestellt, 3.13b zeigt auf Grund der niedrigeren Werte sowohl die Atlas-, als auch Atlas 46-Interaktion in einer anderen Skalierung (y-Achse).

3.2.2.1.2 Makroskopische und mikroskopische Analysen

Zur visuellen Erfassung des pilzlichen Wachstums sowie des Krankheitsverlaufs *in planta* wurden während des gesamten Infektionsprozesses zu oben genannten Zeitpunkten mikroskopische Untersuchungen der Blattproben durchgeführt sowie anschließend die Symptomausbildung fotografisch festgehalten. Für die Mikroskopie wurden die Blätter zunächst in einer Ethanol-Chloroform-Trichloressigsäure-Lösung vom Chlorophyll befreit, danach in einer Trypanblau-Ethanol-Lösung über Nacht gefärbt, in Milchsäure-Glycerin entfärbt und schließlich in 50%-Glycerin-Lösung im Hellfeld mikroskopiert. Trypanblau gehört zur Gruppe der Azofarbstoffe. Es wird häufig für Vitalitätstests eingesetzt, da dieser saure Farbstoff nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird. Als Anion mit vier Sulfonatgruppen bindet er leicht an Proteine, aber auch Bindungen durch Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen an Cellulose sind möglich. Deshalb eignet sich Trypanblau gut zum Färben der pilzlichen Zellwände (Boedijn, 1956). Myzel von *R. commune* wird mit diesem Farbstoff dunkelblau angefärbt und hebt sich somit gut vom nicht gefärbten Blatthintergrund ab.

Um die Symptomausbildung auf den infizierten Blättern festzuhalten, wurden jeweils Fotos der Ober- und Unterseite dreier Primärblätter in 33 cm Abstand mit einer Digitalkamera vor schwarzem Hintergrund erstellt. Blätter der Gerstensorte Ingrid wurden 14 Tage, Atlas und Atlas 46 jeweils 21 Tage nach Inokulation fotografiert.

Die Abbildungen 3.14, 3.15 und 3.16 (jeweils A-H) zeigen die mikroskopischen Aufnahmen aller *R. commune*-Gerste-Interaktionen zu den untersuchten Zeitpunkten sowie die Blattsymptome.

Wie man deutlich erkennen kann, spiegeln die mikroskopischen Aufnahmen die mit Real-Time-PCR ermittelten Daten des pilzlichen Wachstums auf den jeweiligen Gerstensorten wieder. Die Abbildung 3.14a zeigt den Infektionsverlauf von UK7 auf der hochsuszeptiblen Gerstensorte Ingrid. Die Konidiosporen keimen innerhalb von 24 Stunden auf der Blattoberfläche aus (Abb. 3.14a, B) und beginnen bereits nach drei Tagen die Kutikula zu penetrieren (Abb. 3.14a, C). Sechs Tage nach Inokulation hat der Pilz die obere Wachsschicht des Blattes durchbrochen und beginnt die Epidermiszellen zu umwachsen (Abb. 3.14a, D). Dabei bildet *R. commune* schlanke, spärlich septierte Hyphen aus, die es ihm ermöglichen, in kürzester Zeit die gesamte epidermale Zellschicht zu durchwachsen. Bis zum Tag zehn nach Inokulation hat sich die Biomasse des Pilzes auf der Pflanze mehr als verfünffacht (Abb. 3.13a). Zu diesem Zeitpunkt beginnt der Pilz einen anderen Hyphentyp auszubilden, der häufiger septiert ist. Die Hyphen sind weniger schlank und lagern sich enger aneinander, was schließlich zur Ausbildung eines dichten Pilz-Stromas zwischen Kutikula und epidermaler Zellschicht (Abb. 3.14a, E) über das gesamte Primärblatt führt. Zu diesem Zeitpunkt zeigen sich auch die ersten Symptome, welche wässrigen Läsionen gleichen, die sich bis zum Tag 14 über das gesamte Blatt

ausbreiten. Das Blatt verfärbt sich gräulich und trocknet von der Spitze her aus (Abb. 3.14b). Nach 21 Tagen ist das Primärblatt gänzlich abgestorben.

Die Abbildung 3.15a zeigt die mikroskopischen Aufnahmen des Infektionsverlaufs auf der Gerstensorte Atlas. Im Vergleich zu Ingrid ist hier das Wachstum des Pilzes stark verlangsamt. Während *R. commune* auf Ingrid schon nach drei Tagen beginnt, die Kutikula zu penetrieren, sind die Sporen auf Atlas noch im Keimstadium (Abb. 3.15a, C). Bis zu zehn Tage nach Inokulation ist keine Penetration durch die Keimhyphen erkennbar (Abb. 3.15a, E). Pilzhyphen unter der Kutikula, welche die Epidermiszellen umwachsen, werden erst 14 Tage nach Inokulation sichtbar (Abb. 3.15a, F). Pilz-Stroma ist erst nach 21 Tagen zu erkennen und bleibt auf die Bereiche des Blattes beschränkt, in denen die Symptome makroskopisch sichtbar werden (Abb. 3.15a, G). Im Vergleich zur Gerstensorte Ingrid ist Atlas also nur moderat suszeptibel gegenüber dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7. Der Pilz ist erst 14 Tage nach Inokulation in der Lage die basale Abwehr der Pflanze zu durchbrechen, die Pflanze zu penetrieren und sich im Blatt auszubreiten. Dies erklärt auch den späten Anstieg an Biomasse des Pilzes nach 14 Tagen (Abb. 3.13b). Welche Mechanismen und Vorgänge in Atlas nach Pilzinfektion dazu führen, dass die Pflanze das pilzliche Pathogen zumindest zeitweise abwehren kann, sind bislang nicht bekannt. Auch die Symptomatik unterscheidet sich von der von Ingrid. Blattsymptome werden erst zwischen 14 Tagen und 21 Tagen nach Inokulation sichtbar. Im Vergleich zu Ingrid bilden sich statt Spitzen- eher Randsymptome an den Blättern aus. Die Nekrosen, meist mit einem dunkelbraunen Rand umgeben, sind häufiger im unteren Teil des Blattes nahe der Blattachsel zu finden (Abb. 3.15b).

Im Vergleich zu Ingrid und Atlas ist die Sorte Atlas 46 resistent gegenüber UK7. Sie wurde aus einer Kreuzung zwischen Atlas und der ebenfalls gegenüber dem *R.-commune*-Wildtyp UK7 resistenten Gerstensorte Turk generiert. Atlas und Atlas 46 sind daher nahezu isogene Linien (Habgood und Hayes, 1971). Ein wesentlicher Unterschied besteht nur darin, dass Atlas 46 das Resistenzgen *HvRRS1* exprimiert, welches auch in Turk nachgewiesen wurde (Hahn *et al.*, 1993). Gerstensorten, die dieses Gen tragen, sind resistent gegen eine Reihe von *Rhynchosporium*-Isolaten, welche das korrespondierende Avirulenzgen *AvrRRS1* tragen. Dieses exprimiert das Genprodukt Nip1, welches als spezifisches Elicitor-Protein vom Produkt des *RRS1*-Resistenzgens erkannt wird. Insofern stellt die Interaktion von *R. commune* mit Gerste eines der Modellsysteme für die Gen-für-Gen-Hypothese in Pflanze-Pilz-Beziehungen dar (Rohe *et al.*, 1995). UK7 ist Träger des Avirulenzgens *AvrRRS1* (*NIP1*) und wird deshalb von Atlas 46 als Träger des *RRS1*-Gens erkannt, ist also avirulent auf dieser Gerstensorte (s. 1.4.3.2). Die mikroskopischen Aufnahmen der UK7-Atlas 46-Interaktion sind in Abbildung 3.16a gezeigt. Wie man gut erkennen kann, sind die Sporen nach einem Tag noch nicht ausgekeimt (Abb. 3.16a, B). Keimschläuche sind erst am Tag drei nach Inokulation sichtbar (Abb. 3.16a, C). Bis zu diesem Zeitpunkt nimmt die Biomasse des Pilzes auf der Pflanze noch zu, sinkt dann aber bis zum Tag sechs auf ein Minimum ab (Abb. 3.13b). Dieser Umstand ist damit zu

erklären, dass der Pilz über den gesamten Infektionsverlauf nicht in der Lage ist, die pflanzliche Kutikula zu penetrieren. Auch 21 Tage nach Inokulation sind keine Hyphen zwischen den Epidermiszellen oder Pilz-Stroma zu erkennen (Abb. 3.16a, G). Der Pilz bleibt an der Blattoberfläche und stirbt vermutlich schlussendlich ab. Die fotografischen Aufnahmen der Primärblätter nach 21 Tagen zeigt Abbildung 3.16b. Auf der Blattoberfläche sind keinerlei Symptome zu erkennen. Die Interaktion zwischen UK7 und Atlas 46 ist inkompatibel.

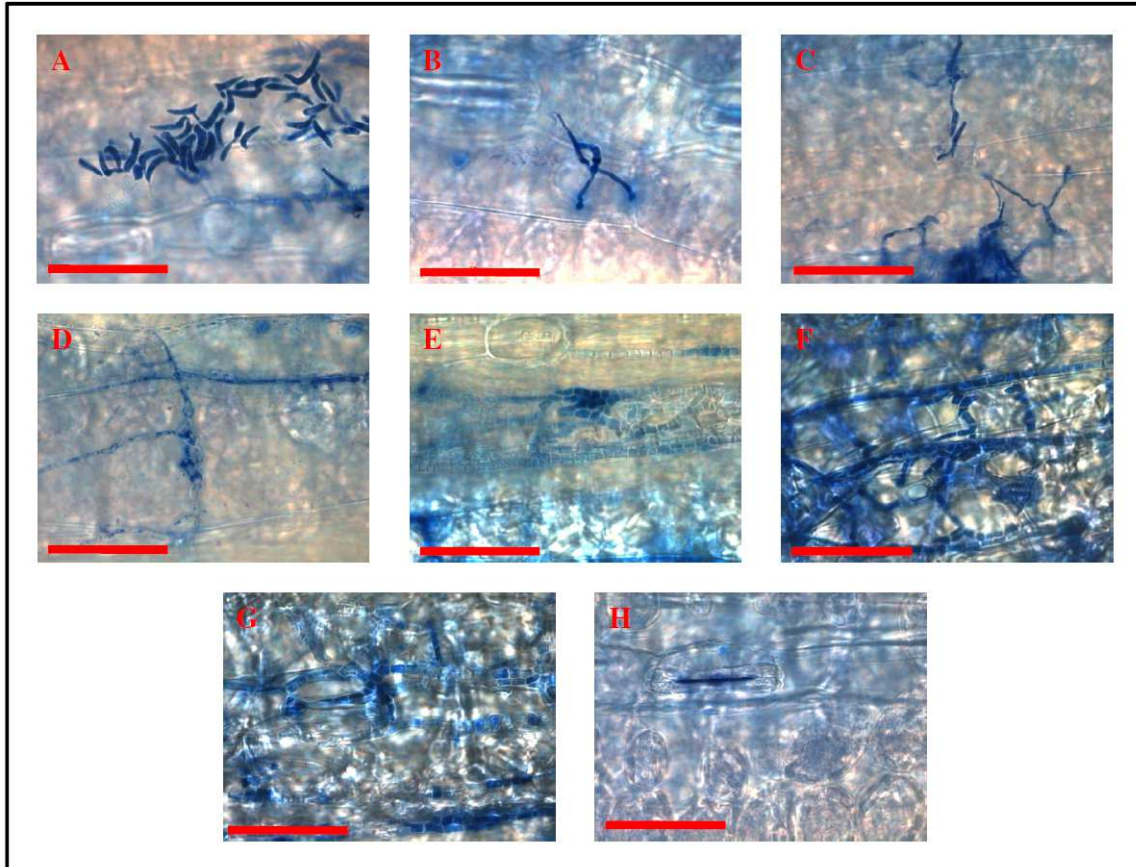


Abbildung 3.14a

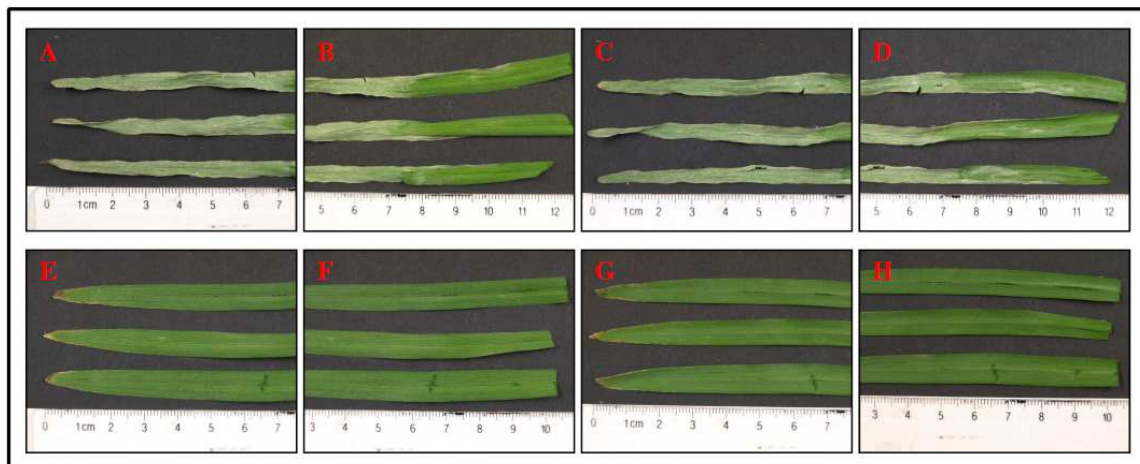


Abbildung 3.14b

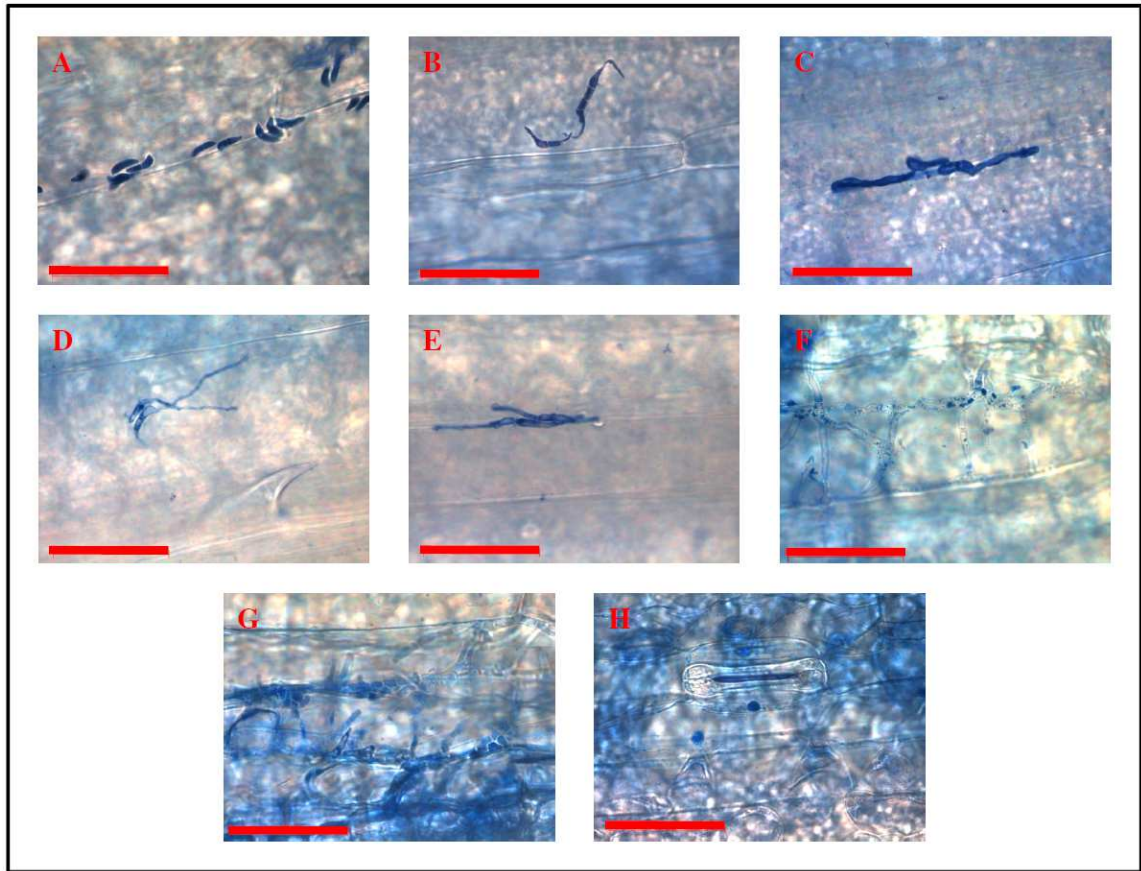


Abbildung 3.15a

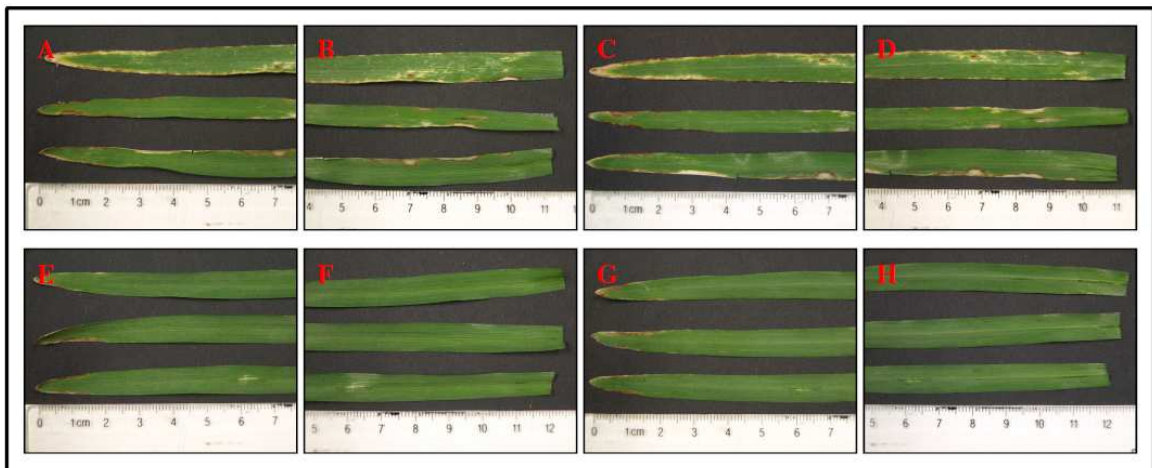


Abbildung 3.15b

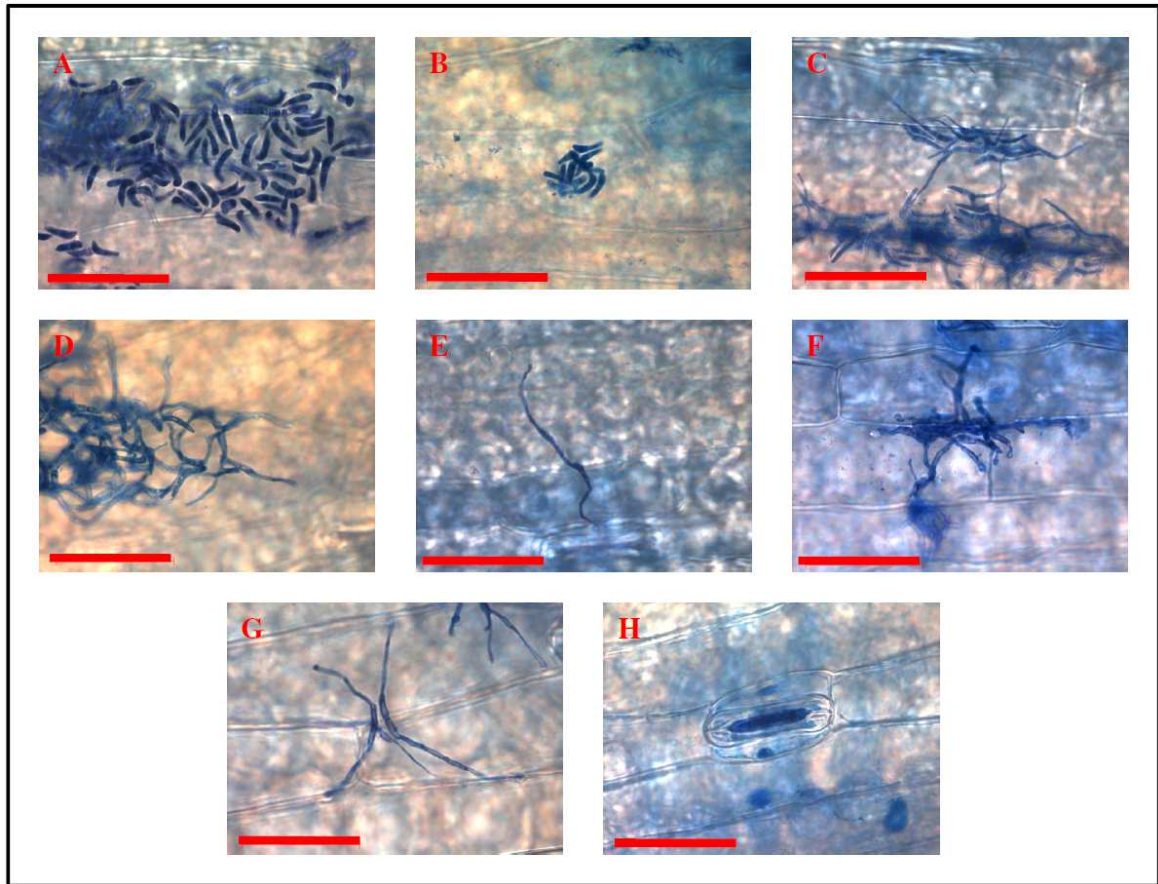


Abbildung 3.16a



Abbildung 3.16b

Abbildungen 3.14, 3.15 und 3.16: Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen sowie fotografische Dokumentation der Symptomausbildung nach Infektion der Gerstensorten Ingrid, Atlas und Atlas 46 mit dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7.

Die Abbildungen 3.14a, 3.15a und 3.16a (jeweils A-H) zeigen die mikroskopischen Analysen des Infektionsverlaufs von UK7 auf den Gerstensorten Ingrid (3.14), Atlas (3.15) und Atlas 46 (3.16) über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Inokulation in 1000facher Vergrößerung. Die Aufnahmen A-G entsprechen dabei jeweils den Zeitpunkten der Probennahme (0-21 Tage nach Inokulation), H zeigt die uninferzierte Kontrolle sechs Tage nach Inokulation.

In den Abbildungen 3.14b, 3.15b und 3.16b (jeweils A-H) ist die Symptomausbildung auf den Primärblättern der jeweiligen Gerstensorten gezeigt. Die Aufnahmen A-D zeigen jeweils mit UK7 infizierte Blattproben, E-H die uninferzierten Kontrollen. Die Blätter wurden in 33 cm Abstand mit einer Digitalkamera fotografiert. Dabei wurden sowohl die Blattoberseite (jeweils A und B bzw. E und F) und -unterseite (jeweils C und D bzw. G und H) als auch jeweils Blattspitze (A und C bzw. E und G) und Blattende (B und D bzw. F und H) aufgenommen. Die Symptome der Gerstensorte Ingrid wurden 14 Tage, die von Atlas und Atlas 46 21 Tage nach Inokulation fotografiert.

Maßstabsbalken – 50 µm

3.2.2.1.3 Expressionskinetik

Die Expression des *PFPI*-Gens während des Pilzwachstums *in planta* wurde während des Infektionsverlaufs mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Aus den infizierten Blattproben der drei biologischen Experimente wurde die Gesamt-RNA mit dem „RNeasy Mini Kit“ der Firma QIAGEN isoliert. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA in den Proben zu vermeiden, wurde die RNA danach einer DNase-Behandlung unterzogen. Aus der sauberen RNA wurde anschließend cDNA synthetisiert, welche dann für die Real-Time-PCR eingesetzt wurde. Die Expressionsrate des *PFPI*-Gens sollte im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen aus *R. commune* analysiert werden. In diesem Fall diente dazu wiederum das *GPD*-Gen. Referenzgene sollten zu jedem untersuchten Zeitpunkt ein annähernd gleiches Expressionslevel aufweisen. In Vorversuchen wurden deshalb drei Gene aus *R. commune* getestet, von denen angenommen wurde, dass sie im Infektionsverlauf konstitutiv exprimiert werden. Neben *GPD* wurde auch die Expression von Ubiquitin (*UBI*) und Aktin (*AKT*) *in planta* untersucht. Als Referenzgen hierfür diente das in Gerste konstitutiv exprimierte Aktin-Gen (*HvAKT*). Dabei wiesen nur *GPD* und *AKT* zu allen Zeitpunkten eine gleiche Expressionsrate auf. *UBI* zeigte eine transiente Expression und wurde deshalb nicht als Referenzgen in Betracht gezogen. Da bei der Real-Time-PCR für *AKT* zu viele Primer-Dimere die Reaktion störten, wurde auch dieses Gen nicht für die Expressionskinetik eingesetzt. Schlussendlich wurden alle ermittelten Expressionsdaten auf *GPD* als Referenzgen bezogen (Mönchmeier, 2011; unveröffentlichte Ergebnisse).

Zu jedem Zeitpunkt der untersuchten Interaktionen (jeweils drei biologische Wiederholungen pro *R. commune*-Gerste-Interaktion) wurden per Real-Time-PCR

Fragmente der Gene *GPD* und *PFPI* amplifiziert. Die PCR wurden jeweils dreimal wiederholt (drei technische Replikate). Die Strukturen der Gene sowie die Positionen der verwendeten Oligonukleotide sind bereits in Kapitel 3.1.2.2 in der Abbildung 3.7 gezeigt. Zusätzlich zu *PFPI* wurde in diesem Experiment die relative Expressionsrate des Effektors *NIP1* aus *R. commune* während des Infektionsverlaufs analysiert. Der kodierende Sequenzbereich von *NIP1* sowie die Bindestellen der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Abbildung 3.17 dargestellt.

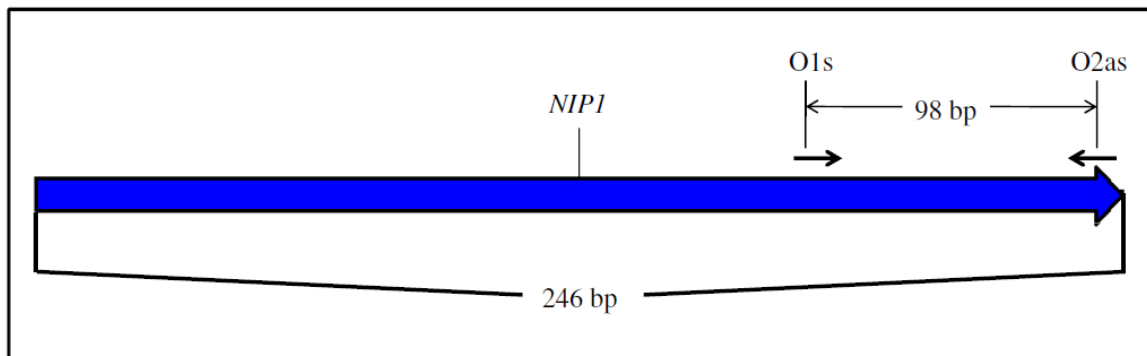


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung des kodierenden Bereiches des *NIP1*-Gens sowie Bindungsstellen der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide.

Die Abbildung zeigt die kodierende Sequenz von 246 bp des Gens *NIP1* (blauer Pfeil). Die waagerechten schwarzen Pfeile markieren die Positionen der für die Real-Time-PCR verwendeten Oligonukleotide (O1s, O2as) im 3'-Bereich des Gens. Sie amplifizieren ein DNA-Fragment von 98 bp.

O1s und O2as – *NIP1*-RTs und *NIP1*-RTas (#40/#41, s. 7.1).

Da das Nekrose-induzierende Protein Nip1 im Infektionsverlauf eine wichtige Rolle spielt, war es wichtig dessen Expression *in planta* nachzuweisen und vergleichend zur *PFPI*-Genexpression zu analysieren.

Die Abbildung 3.18 zeigt die ermittelten relativen Expressionsraten der beiden Gene in *R. commune in planta*. Zu jedem Zeitpunkt wurden die per Real-Time-PCR ermittelten C_t -Werte der Zielgene (*PFPI*, *NIP1*) ins Verhältnis zu den Werten des konstitutiv exprimierten Referenzgens (*GPD*) gesetzt. Unter Einbeziehung der Spezifität der jeweils verwendeten Oligonukleotide (E-Werte) wurden die relativen Werte der Expression aus dem Quotient aus Referenz- und Zielgen ermittelt ($\Delta\Delta C_t$ -Methode, Pfaffl, 2001).

Die grafischen Darstellungen zeigen, dass *PFPI* und *NIP1* während des Infektionsverlaufs sehr unterschiedlich exprimiert werden. Beide Transkripte sind bereits in den Konidiosporen eine Stunde nach Infektion nachzuweisen. Doch während die Expressionsrate von *PFPI* im weiteren Verlauf in allen Interaktionen sehr gering bleibt, steigt die Expressionsrate von *NIP1* zunächst an. Wächst der Pilz auf den suszeptiblen Gerstensorten (Ingrid und Atlas) liegt das Maximum der Expression bei sechs Tagen, um danach bis zum Tag 21 stetig abzunehmen (Ingrid, Abb. 3.18a) bzw. auf einem niedrigen

Grundlevel zu bleiben (Atlas, Abb. 3.18b). Auf der resistenten Gerstensorte Atlas 46 ist die maximale *NIP1*-Expressionsrate bereits nach einem Tag erreicht, sinkt bis zum Tag sechs schnell ab, um dann auf einem Basislevel weiter exprimiert zu werden. Erst nach zehn Tagen sinkt die Expressionsrate leicht ab (Abb. 3.18c). Während *NIP1* also über den gesamten Infektionsprozess eine transiente Expression zeigt, wird *PFPI* konstitutiv auf einem sehr niedrigeren Niveau exprimiert. Die Expressionsrate bleibt über die 21 Tage sehr gering. Nur der 6-Tage-Wert der Atlas-Interaktion und der 10-Tage-Wert der Atlas 46-Interaktion zeigen jeweils eine leichte Erhöhung, die allerdings auf Grund des erhöhten Standardfehlers als nicht signifikant eingestuft werden kann. Der Expressionsverlauf des *NIP1*-Gens deutet auf eine direkte Rolle während früher Phasen des Infektionsprozesses hin. Im Gegensatz dazu lässt die konstant niedrige Expressionsrate von *PFPI* entweder auf eine eher indirekte bzw. übergeordnete Rolle im Verlauf der Pilz-Pflanze-Interaktion schließen oder auf eine regulatorische Funktion, die unabhängig vom Infektionsprozess ist.

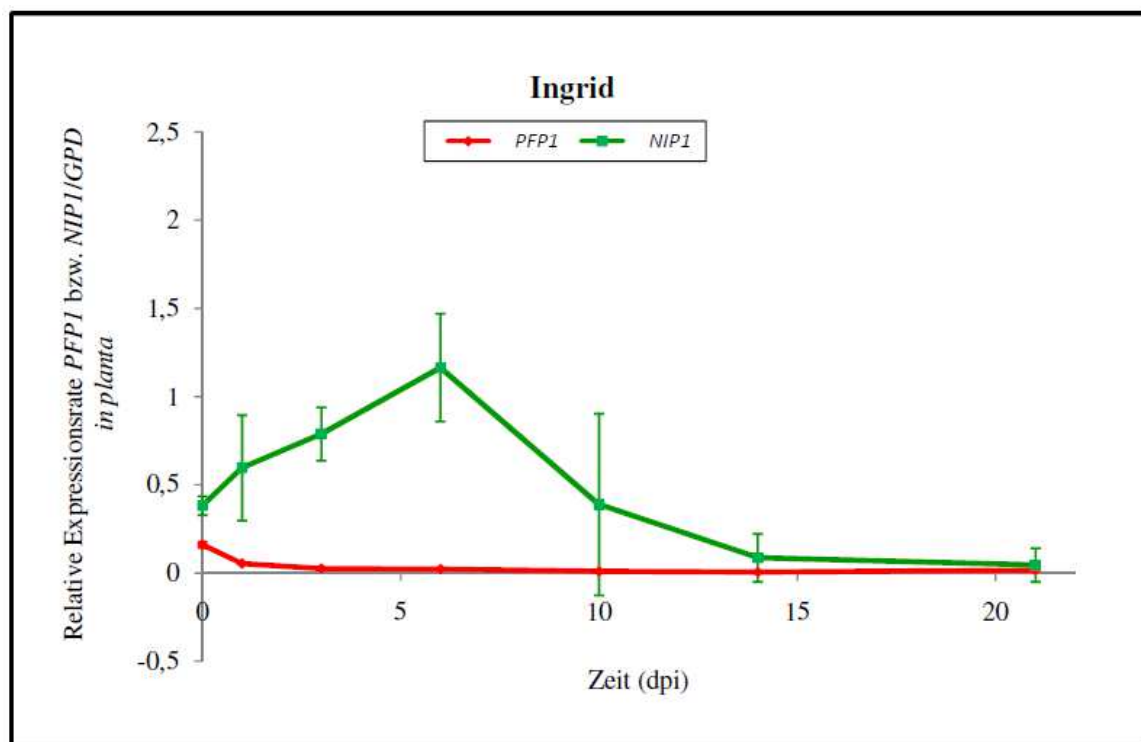


Abbildung 3.18a

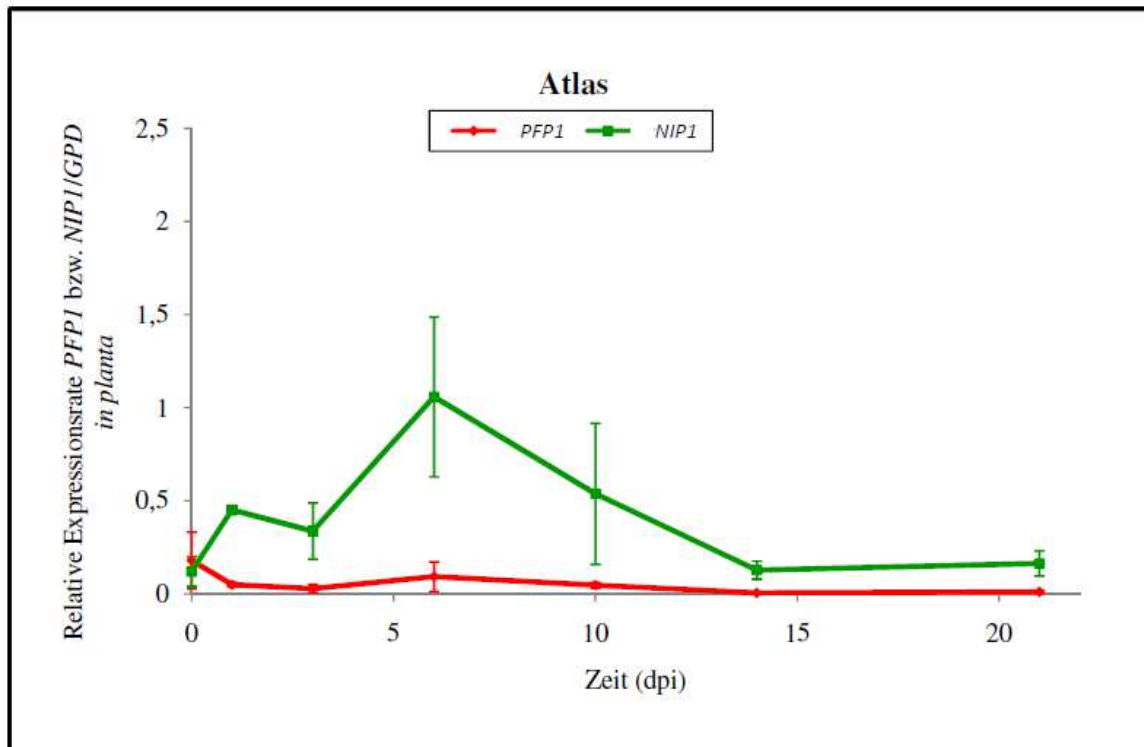


Abbildung 3.18b

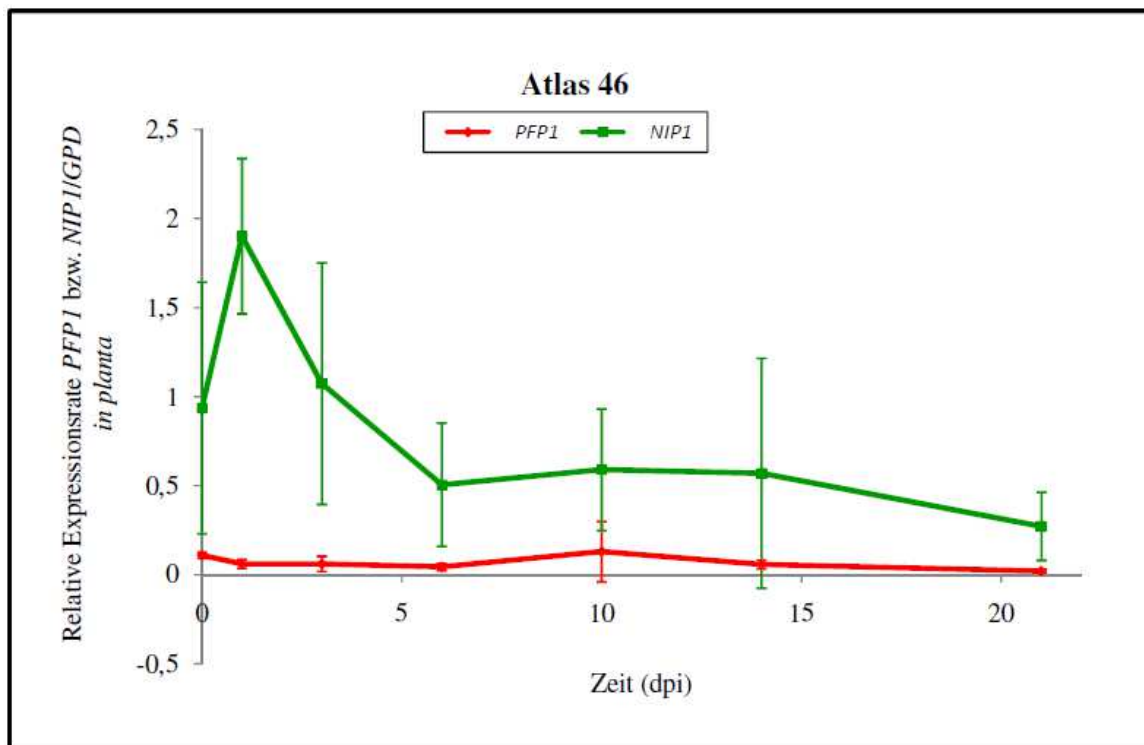


Abbildung 3.18c

Abbildung 3.18: Grafische Darstellung der relativen Expressionsraten von *PFPI* und *NIP1* bezogen auf *GPD in planta*.

Die Abbildungen a–c zeigen die relativen Expressionsraten der *R. commune*-Gene *PFPI* und *NIP1* bezogen auf das konstitutiv exprimierte Referenzgen *GPD* während der drei unterschiedlichen Pilz-Pflanze-Interaktionen (UK7-Ingrid [a], UK7-Atlas [b] und UK7-Atlas 46 [c]) über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Inokulation.

3.2.2.2 Studien zur *PFPI*-Expression *ex planta*

Um die Expression des *PFPI*-Gens auch *ex planta* überprüfen zu können, sollten Promotor-Reporter-gen-Studien durchgeführt werden. *In-silico*-Analysen des 5'-untranslatierten Bereiches des *PFPI*-Gens zeigten eine Vielzahl putativer pilzlicher Promotorelemente (vgl. Abb. 3.19 und Tab. 3.1), so dass die gesamte *PFPI*-Gensequenz bis zum Starttripllett als regulatorische Einheit des Gens angenommen wurde.

Für das Promotorfusionskonstrukt wurde der 1528 bp-lange 5'-Bereich der *PFPI*-Gensequenz mit den Oligonukleotiden PFP43s und PFP44as (#66/#67, s 7.1) amplifiziert und direkt vor die kodierende Sequenz des grün fluoreszierenden Proteins (*GFP*) aus der Quallenart *Aequorea victoria* (*AvEGFP*) in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt kloniert (vgl. Abb. 7.3.1.2). Für diese und alle im Folgenden beschriebenen Experimente wurde dabei eine durch künstlich eingeführte Mutationen verstärkte Variante des Gfp-Proteins genutzt (*eGfp*, *enhanced green fluorescent protein*, Thastrup *et al.*, 1995). Zur Selektion wurde zusätzlich die Sequenz für die Hygromycin-B-Resistenzkassette in den Vektor ligiert (vgl. Abb. 7.4.2). Die Abbildung 3.20 zeigt die Position der verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation des *PFPI*-Promotorbereiches sowie das Vektorkonstrukt pJET1.2/blunt- $P_{PFPI}::eGfp$.

Zur Durchführung des Experiments wurde zehn Tage altes Myzel des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7 protoplastiert und die Zellen mit dem Promotorfusionskonstrukt transfiziert. Als Positivkontrolle diente das binäre Plasmid pRcEGFP1, welches die kodierende Sequenz des *AvEGFP*-Gens unter der Kontrolle des Promotors für die Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* (P_{gpd}) enthält. Die Pilztransformaden wurden auf Hygromycin B selektiert, vereinzelt, und unter dem Binokular auf GFP-Fluoreszenz überprüft (Filter: LEICA 10446225; MZFLIII). Pilzkolonien, die eine Fluoreszenz zeigten wurden bis zur Sporulation erneut auf Limabohnenplatten angezogen und schließlich, wie für die *in planta*-Analysen, zu 0 d, 1 d, 3 d, 6 d, 10 d, 14 d und 21 d im Flüssigmedium (FRIES-Medium Nr. 3) mikroskopiert.

CGTATCTTGGCTTCCCAAGCAAGAGCTTGAGCAGTCCAAGACTGGAGCA	-1480				
ATTCTGACAGCGTCCACACCTCATTGTTTGAACAACATCTTGGGACAATA	-1431				
CGTTCTCAAGCCATCTTC	CGGCTTACTGTATGTTCCG	CTCTAGTTACCA	-1382		
T	CGGTGCGTCTAAGCACCG	GAAATGGCCAGGATTGCCACCAACATCAC	-1333		
CCTCGATGCTGTTTACTATCCACCCGTCACAAGCCTAGG	TAGATA	CCT	-1284		
GGCAGCAGAGAGGAATAGTGCTCAGGCCTGTGCCCTTTCGAAGCTGTTG			-1235		
AATTGCCGGGACTAA	CGGGG	TTTGAGAGTGTT	GATA	CGTAGAGCCAAC	-1186
AAACTGATGAATATTGTATGTCGCACTATTAGAAGGGAAGTGTGTCAGGCG				-1137	
ATCAAGAAGATTCAGCGGCCTAGAACAGAAAAAAGTT	GATA	AAGCACTA		-1088	
ATCGGTTAGCTTCTAATAATCTTGATGGCAGTTCGGGTATTGCGTTATG				-1039	
GATTGACCAGAGTAAGTCTGCAACAGCAGTCAACAGATCAACACCATCT				-990	
TTCGA	GATA	AAGCACCATAAGAGACGCTGCGACAACCACTGTGGCTGAC		-941	
GGACTGG	CAATTAGGTTTCCG	CGATGCTGTGCAACCCAGGTCTCCGTCC		-892	
CATTAGAGTGGTCTGGAAAGTCAGTCTTTGAGATGTCTTTCCATGGGTA				-843	
AGACTTGGCATGCAGGTCATTTAAC	CCGTCCC	GCAGGGCCG	CAGCGAAA	-794	
GCTTACTTCTGGTTCCACATATT	CAAGGG	GATA	ATAATGGCCACAGTT	-745	
CAAGCAGGTCTTCTCGCAAATTCAGACTAGGGTCTTG	CAATATA	ACCG		-696	
TGTTGGA	CAAT	GGATGTAATGACCATGGAAAGAACAGAGTACGAAGTAT		-647	
GTAT	CCCCT	AAAATTGCCTCGTCAGTGATCTCATATA	GATA	AAGCGGAA	-598
CTACTATAATTGCAACATGAGAAGTCGAAATACCTCTCACAAACAACAA				-549	
GATA	CTATGCCTCGAAGAGTGCTCGAAGAGGCTCGAAGAGGATGTAAC			-500	
GCTAGTCGTGATT	CGGGAAATAGAAGCCAGAAGTTT	GATGGATTACTC		-451	
CCG	TAATACTAGATTGCAGAGACAGCGATGGAAATTTCAAGTGT	CAAT		-402	
GAAAGAGACACCTGCACAGAGTATAAGCGGGCTCGCTTGCGTGAGC	GAT			-353	
A	CCTCATATCT	SCCAAG	CTTTTGCTATCATGTGATCTGCTTAGCAAGTT	-304	
ACATA	CCCCT	GTCCC	GGCTGTAGATGTTGGATCCTGAACGTCTCGCGAC	-255	
TGACTACAGAACGTTTGCTCATCAGTGGTACTGCGAGCTCATGTTTCAGC				-206	
ACGTTGTTTCGAGTAGACGGCTCAGATCAACTCGTCCTCAACCTGCGGTC				-157	
ACGCGTCAAGCGCGACAACCTTCA	TCGGCTCCTTCCG	ATGCGCTTAACTC		-108	
AAT	ACCGGGCAGCGACCTTGCACCTCA	CCCCT	AGGTCTCCACGCG	CCG	-59
AACCCCACTAGAATCCGTTCAACTTTCGACAGATTGCCCATACCG	ATTG			-10	
CAGAAGACG	ATG			1	

Abbildung 3.19: 5'-untranslatierter Bereich der *PFPI*-Gensequenz mit putativen regulatorischen Elementen.

Die Abbildung zeigt die 1528 bp lange Promotorsequenz des *PFPI*-Gens. Das erste translatierte Basentriplett ist mit 1 bezeichnet (ATG – rot markiert). Die Basen -1 bis -1528bp umfassen den 5'-untranslatierten Bereich des Gens. Farbige unterlegt sind durch *in silico*-Analysen identifizierte putative Promotorelemente (Erklärung siehe Tabelle 3.1).

Promotor-(cis-) Element (Erkennungssequenz)	Funktion in anderen Pilzen	Literatur
PRE- (<i>Pisatin responsive element</i>) ähnliches Motiv (3x CCG Triplets)	Pisatin-Detoxifizierung in <i>Fusarium solani</i>	Khan <i>et al.</i> , 2003
TATA-Box (TATAA)	Core-Promotorelement; Aflatoxin-Biosynthese in <i>Aspergillus parasiticus</i> ; Hyphenentwicklung in <i>Candida albicans</i>	Leng <i>et al.</i> , 1998 Miller <i>et al.</i> , 2005
CREA-Consensus-Sequenz (SYGGGG; S = C/G, Y = C/T)	Kohlenstoff-Sekundärstoffwechsel artenübergreifend	Cubero & Scazzocchio, 1994 Mathieu & Felenbok, 1994 Mathieu <i>et al.</i> , 2000
Palindrom-Sequenz (TCG(N₃)CGA); abgewandelte CGG-Triplett-Sequenz (CGG(N₃)CCG)	Mykotoxin-Biosynthese <i>Aspergillus nidulans</i>	Fernandes <i>et al.</i> , 1998
GATA-Box ([TA]GATA)	Stickstoff-Sekundärstoffwechsel artenübergreifend	Marzluf, 1997 Haas <i>et al.</i> , 1999 Feng <i>et al.</i> , 2000 Pérez-Garcia <i>et al.</i> , 2001 Soanes <i>et al.</i> , 2002 Snoeijers <i>et al.</i> , 2003 Mihlan <i>et al.</i> , 2003
(CAAT-Box ([C]CAAT)	Core-Promotorelement; Penicillin-Biosynthese <i>Aspergillus nidulans</i>	Brakhage <i>et al.</i> , 1999, 2005
Bristle response element BRE (MRAGGGR; M=C/A, R=G/A)	Entwicklung Regulierung der Sporulation <i>Magnaporthe grisea</i>	Chang & Timberlake, 1992 Soanes <i>et al.</i> , 2002
Stress-responsive element STRE (CCCCT)	Stressantwort <i>Neurospora crassa</i>	Girvitz <i>et al.</i> , 2000
Hexanukleotidsequenz (GCCAAG), PacC-Consensus = GCCARG; R = G/A	pH-Regulation <i>Aspergillus nidulans</i> ; Cephalosporin-Synthese und pH-Regulation <i>Acremonium chrysogenum</i>	Tilburn <i>et al.</i> , 1995 Espeso <i>et al.</i> , 1997 Schmitt <i>et al.</i> , 2001

Tabelle 3.1: Zusammenstellung und Position der *in silico* identifizierten putativen Promotorelemente des 5'-untranslatierten Bereiches der *PFPI*-Gensequenz.

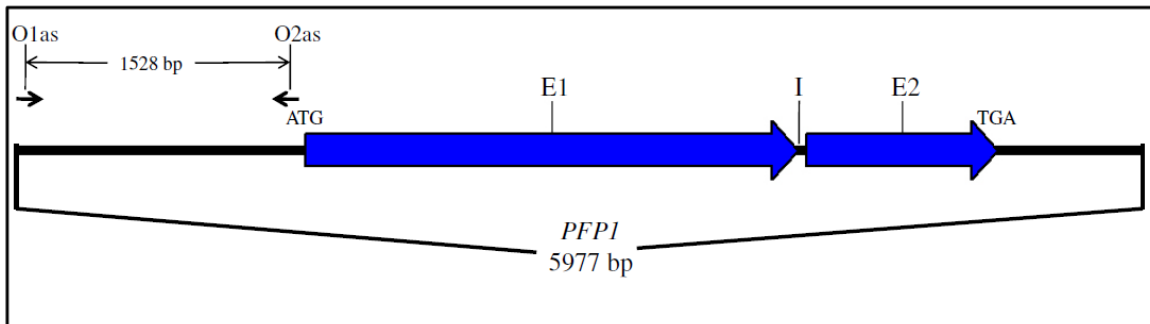


Abbildung 3.20a

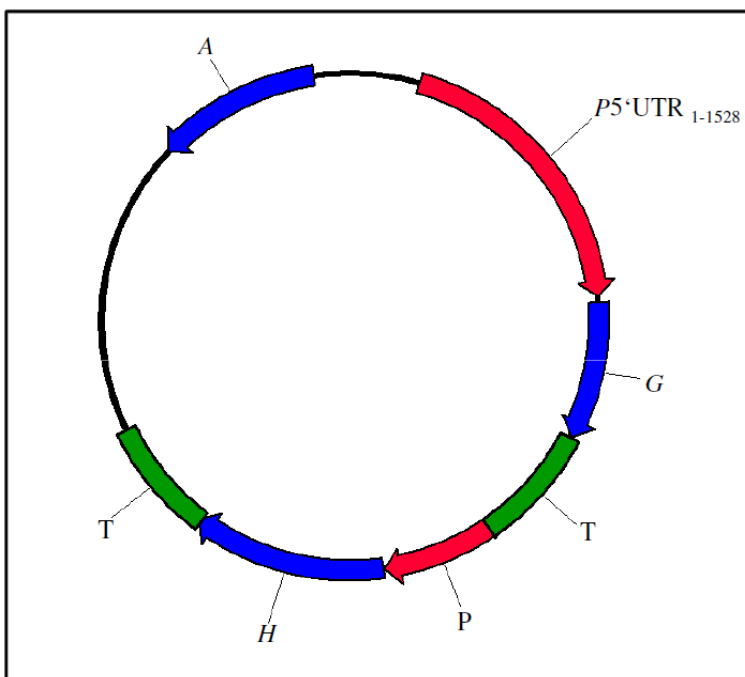


Abbildung 3.20b

Abbildung 3.20: Schematische Darstellungen der *PFPI*-Genstruktur und der für die Promotorfusion verwendeten Oligonukleotide sowie des Promotorfusionskonstrukts pJET1.2/blunt- $P_{PFPI}::eGfp$.

Abbildung 3.20a zeigt schematisch die gesamte bekannte genomische *PFPI*-Sequenz (5977 bp) sowie die Bindestellen der für die Amplifikation des 5'-untranslatierten Bereiches (1528 bp) verwendeten Oligonukleotide O1s und O2as (PF43s und PF44as).

E1 und E2 – Exon 1 und 2; I – Intron.

Das Promotorfusionskonstrukt pJET1.2/blunt- $P_{PFPI}::eGfp$ ist in Abbildung 3.20b dargestellt. Der gesamte 5'-untranslatierte Bereich des *PFPI*-Gens ($P5'UTR_{1-1528}$ bp) wurde vor die kodierende Sequenz des *AvEGFP*-Gens (*G*) kloniert, welche zuvor zusammen mit der Hygromycin-B-Resistenzkassette (*H*) in den Klonierungsvektor pJET1.2/blunt ligiert wurde.

T – Terminatorsequenz des *TRPC*-Gens aus *Aspergillus nidulans* (T_{trpC}), P – Promotorsequenz P_{gpdA} des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens aus *Aspergillus nidulans*, A – Ampicillin-Resistenzkassette (β -Lactamasegen *bla* [Ap^R]).

Die Abbildung 3.21 zeigt Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Pilzstrukturen die die Promotorfusion pJET1.2/blunt-P_{PFPI}::eGfp exprimieren sowie der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp (Vektor pRcEGFP1). Alle untersuchten Transformanden zeigten vergleichbare Resultate, so dass hier stellvertretend nur die Aufnahmen der Transformande #49 dargestellt sind. Wie man erkennen kann, wird *EGFP* über den gesamten Versuchszeitraum in den Pilzzellen der Positivkontrolle auf nahezu gleichem Niveau exprimiert. Betrachtet man im Vergleich dazu die Transformande #49, kann man eine starke Fluoreszenz zunächst in den Sporen erkennen, welche sich auch in den folgenden drei Zeitpunkten nachweisen lässt (Abb. 3.21a, A-D), jedoch im weiteren Versuchsverlauf bis zum Tag 21 abnimmt (E-G). Die Pilzhyphen zeigen nur noch eine schwache *EGFP*-Fluoreszenz unter UV-Licht, was zunächst auf eine abnehmende Promotoraktivität hinweist. Im Vergleich zur Positivkontrolle wird *EGFP* in der Transformande also offenbar nicht über den gesamten Versuchszeitraum in gleichbleibender Rate exprimiert.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass der 5'-untranslatierte Bereich des *PFPI*-Gens als Promotor fungiert und auch unter Kulturbedingungen die Genexpression reguliert. Daraus lässt sich schließen, dass *PFPI* auch *ex planta* exprimiert wird. Dies allerdings auf einem sehr geringen Niveau, was wiederum auf eine regulatorische Funktion des Pfp1-Proteins im Lebenszyklus des Pilzes schließen lässt, die unabhängig von der Interaktion mit der Wirtspflanze zu sein scheint.

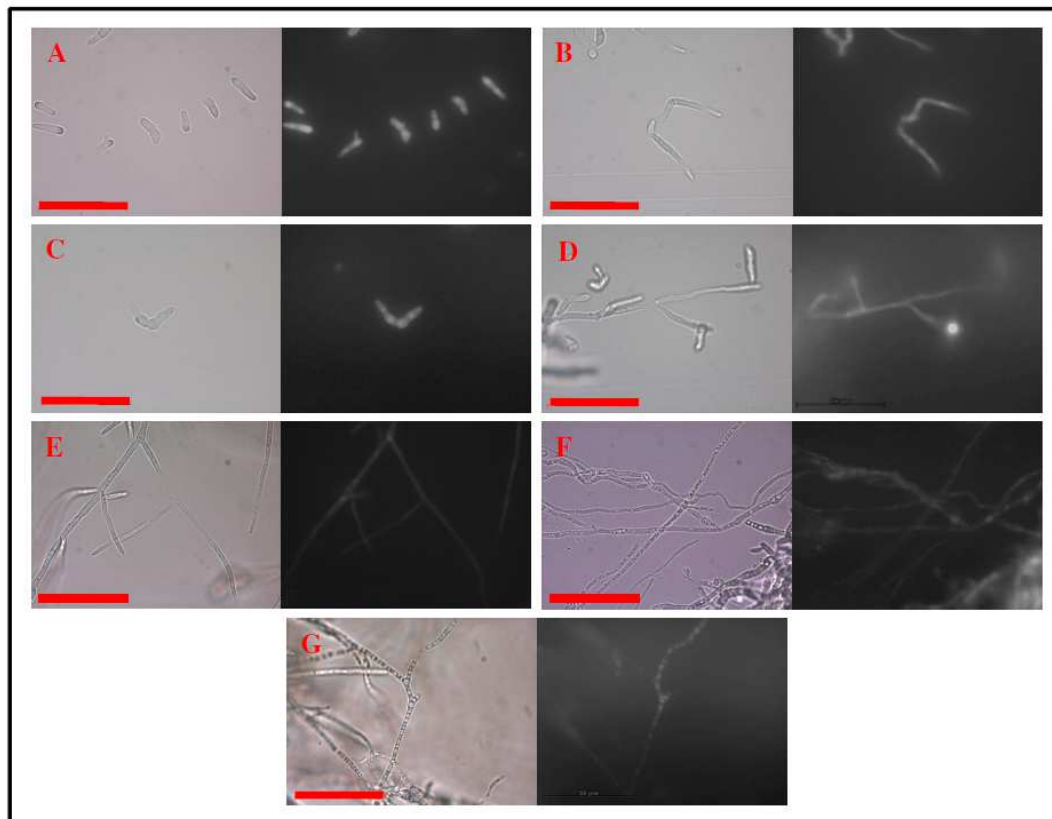


Abbildung 3.21a

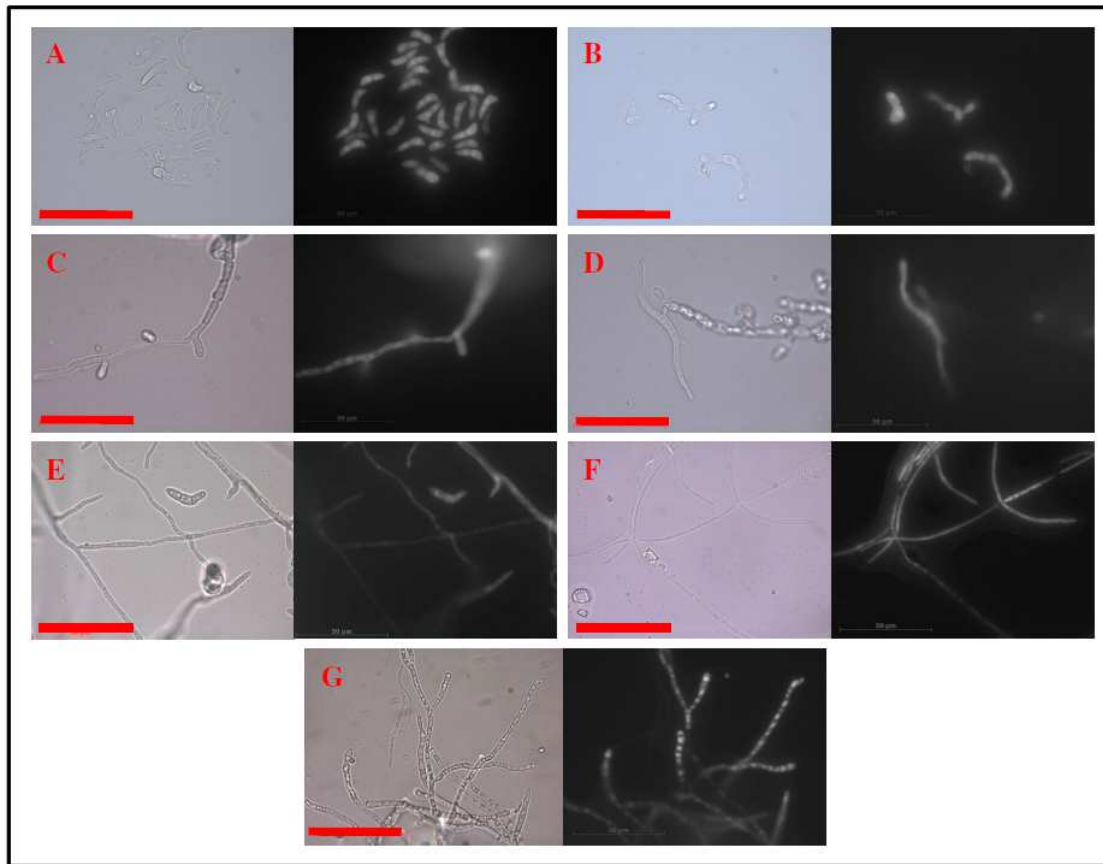


Abbildung 3.21b

Abbildung 3.21: Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transformante UK7-pJET1.2/blunt-P_{PFPI}::eGfp #49 und der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp *ex planta*.

Die Abbildungen zeigen die mikroskopischen Aufnahmen der die *PFPI*-Promotorfusion tragenden Transformante #49 (Abb. 3.21a) sowie der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp (Abb. 3.21b) sowohl im Hellfeld als auch unter UV-Licht (Ex450-490nm, Em515nm; Filterset 9; Axio Imager). A-G entsprechen den jeweils gewählten Zeitpunkten von 0 bis 21 Tagen nach Beimpfung des Flüssigmediums.

Maßstabsbalken – 50 µm

Um die Mutanten sowie die Positivkontrolle neben den mikroskopischen Untersuchungen auch quantitativ analysieren zu können, wurden *EGFP*-Fluoreszenz-Messungen durchgeführt. Dafür wurden drei der Transformanden (Promotorfusionen UK7-pJET1.2/blunt-P_{PFPI}::eGfp #22, #49, #67) und die Kontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp in einer Multiwell-Zellkulturplatte im Flüssigmedium über 21 Tage angezogen. Pro Well wurden 1×10^4 Konidiosporen angeimpft und die Platte bei 17°C und Dunkelheit inkubiert. Pro Transformande wurden sechs technische Replikate angesetzt. Mit der Positivkontrolle wurde ebenso verfahren. Die *EGFP*-Fluoreszenz des gewachsenen Pilzmyzels wurde mit einem CytoFluor™ II Fluoreszenz-Messgerät (PerSeptive Biosystems) bestimmt. Als Kontrollwert diente bei jeder Messung steriles Flüssigmedium. Alle gemessenen Werte der Einzelreplikate wurden schließlich zu jedem Zeitpunkt gemittelt und die für das Flüssigmedium bestimmte Eigenfluoreszenz davon abgezogen. Der zeitliche Verlauf der Messungen ist in Abbildung 3.22 grafisch dargestellt. Über den gesamten Zeitraum steigen die Fluoreszenz-Werte stetig an. Dabei zeigt die Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp den höchsten Anstieg. *EGFP* wird über den gesamten Versuchsverlauf mit steigender Biomasse des Pilzes konstitutiv exprimiert. Erst nach 21 Tagen ist ein leichter Abfall der Werte zu verzeichnen. Dies liegt höchstwahrscheinlich an dem langen Untersuchungszeitraum, in welchem der Pilz stetig wächst und demzufolge die Nährstoffe des Mediums nahezu verbraucht hat. Dies schränkt das Wachstum und schließlich auch die Genexpression ein. Die Transformanden zeigen ähnlich der Positivkontrolle auch einen stetigen Anstieg der gemessenen *EGFP*-Fluoreszenz. Die Werte sind aber geringer als bei der Kontrolle und deren Anstieg flacher. Anders als nach den Mikroskopie-Aufnahmen zunächst vermutet, ist der *PFPI*-Promotor demzufolge auch *ex planta* konstitutiv aktiv, exprimiert jedoch auf einem geringeren Niveau als der *GPD*-Promotor. Die ansteigenden Kurven reflektieren zudem das Wachstum der untersuchten Pilze. Die Expressionsrate bleibt damit unter Einbeziehung der sich sehr wahrscheinlich erhöhenden Biomasse zu jedem Zeitpunkt nahezu gleich. Die *EGFP*-Expression unter Kontrolle des *PFPI*-Promotors nimmt also nicht ab, wie zunächst angenommen wurde. Eine Erklärung dafür könnte die Tatsache sein, dass in der Multiwell-Platte die *EGFP*-Fluoreszenz des gesamten zu diesem Zeitpunkt vorhandenen Myzels gemessen wird. Unter dem Mikroskop jedoch nur ein Teil einer Hyphe betrachtet wird, deren Fluoreszenz bei geringerem Expressionsniveau häufig schwächer erscheint.

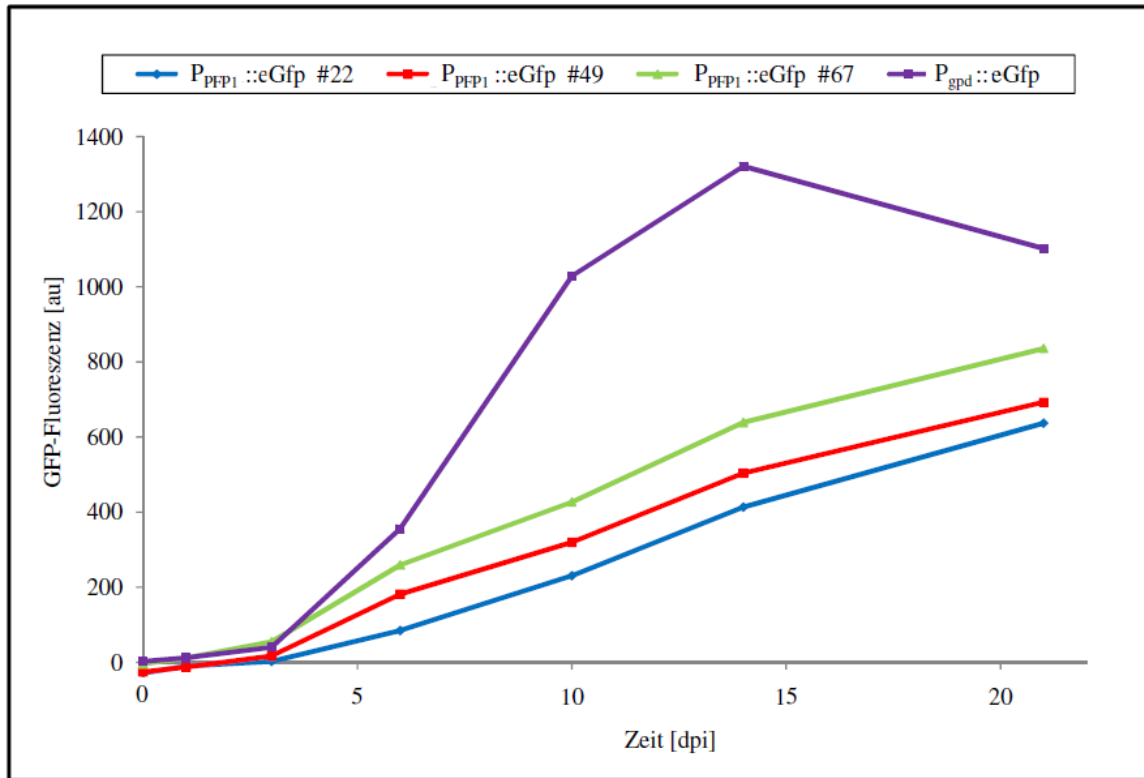


Abbildung 3.22: Grafische Darstellung der *EGFP*-Fluoreszenz der die Promotorfusion exprimierenden Transformanden UK7-pJET1.2/blunt-P_{PFP1}::eGfp #22, #49 und #67 sowie der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp.

Die Abbildung zeigt grafisch die Entwicklung der relativen *EGFP*-Fluoreszenz ([au] – *absorbance units*) über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Beimpfung des Flüssigmediums. Dargestellt sind die Promotorfusionen UK7-P_{PFP1}::eGfp #22, #49 und #67, sowie die Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp, welche das *EGFP*-Gen unter Kontrolle des *GPD*-Promotors aus *A. nidulans* exprimiert. Die Werte wurden jeweils aus sechs Einzelreplikaten gemittelt. Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus einem biologischen Experiment, da nur Sporen einer Isolierung zum Animpfen zur Verfügung standen.

3.3 Charakterisierung des Pfp1-Proteins

3.3.1 Charakterisierung der Proteinstruktur

Die *in silico*-Analyse der von *PFPI* abgeleiteten Proteinsequenz ergab bereits in Vorversuchen Hinweise auf eine PHD-Zink-Finger-Domäne sowie eine nukleäre Lokalisierung des Proteins. Daher wurde eine Rolle als Transkriptionsfaktor bzw. in der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen angenommen (Albert & Knogge, unveröffentlichte Daten).

Während der hier vorliegenden Arbeit konnte durch Analysen der Gensequenz (RACE-PCR) ein Intron von 45 bp Länge identifiziert werden, was zu einer Verlängerung der kodierenden Sequenz des Gens um 1017 bp (Exon 2) führte. Die abgeleitete Proteinsequenz des Pfp1 umfasst damit 1210 Aminosäuren.

Die gesamte Sequenz wurde mit bekannten Proteinen der NCBI-Datenbank verglichen (blastp 2.2.23, Altschul *et al.*, 1997 & 2005). Dabei zeigte sich, dass Pfp1 hohe Ähnlichkeit zu Proteinen der EPL-Superfamilie besitzt. EPL (*Enhancer of Polycomb-like*) bezeichnet eine Gruppe von Proteinen, die Homologien zum *Enhancer of Polycomb* [E(Pc)], einem konservierten Protein in Eukaryoten, aufweisen, welches zunächst für *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde (Stankunas *et al.*, 1998).

E(Pc) kodiert in der Fruchtfliege für ein ca. 220 kDa großes Protein, welches 2023 Aminosäuren umfasst. In Richtung des Amino-Terminus des Proteins konnte eine Strukturdomäne identifiziert werden, welche in allen Proteinen dieser Gruppe zu finden ist, und auch im Pfp1 durch *in silico*-Analysen nachgewiesen werden konnte. Das als Epc-N-Domäne (*Enhancer of the Polycomb-N-terminus*) bezeichnete Motiv ist durch eine Reihe konservierter Aminosäuren charakterisiert und als ein rechtsgerichtetes orthogonales Bündel aus vier α -Helices beschrieben, welche an beiden Enden der Sequenz durch β -Faltblätter verlängert sind (Perry, 2006; Abb. 3.23).

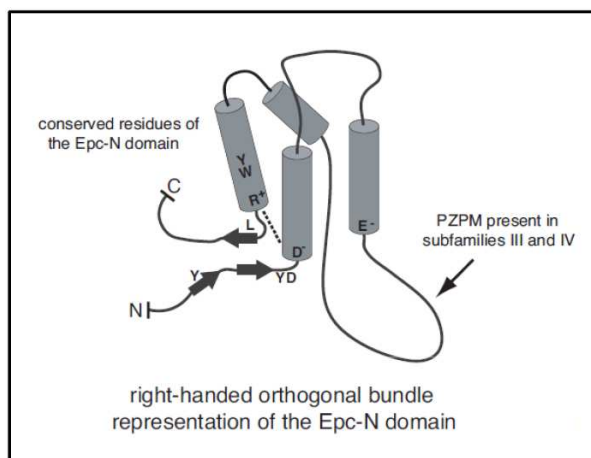


Abbildung 3.23: Hypothetische dreidimensionale Struktur der Epc-N-Domäne (Perry, 2006).

Die Struktur erscheint als rechtsgerichtetes orthogonales Bündel aus vier α -Helices (Zylinder, grau). N- und C-terminal schließen sich β -Faltblätter an (Pfeile, schwarz). Konservierte Aminosäuren sind markiert. Das PZP-Motiv der Untergruppen III und IV liegt zwischen Helix 2 und 3 und verbindet diese durch eine „Schleifen-Struktur“ (Pfeil).

Darüber hinaus umfasst die Domäne bei einigen Vertretern der EPL-Superfamilie drei weitere Motive. Eines davon ist das bereits oben erwähnte PHD-Zink-Finger-Motiv. Der PHD-Finger (von engl. *plant homeodomain*) ist ein weit verbreitetes Strukturmotiv in allen eukaryotischen Genomen. Er wurde zuerst von Schindler *et al.* (1993) im HAT3.1-Protein (*homeo box from Arabidopsis thaliana*) beschrieben. Die Proteindomäne umfasst ca. 60 Aminosäuren und ist gekennzeichnet durch eine charakteristische C4HC3-Signatur (4x Cystein – 1x Histidin – 3x Cystein). Des Weiteren ist bekannt, dass PHD-Finger über die Cystein- und Histidin-Reste zwei Zink-Ionen binden können (Bienz, 2006). Proteine mit PHD-Motiv sind meist kernlokalisiert. Ihnen werden Funktionen in der Chromatin-Erkennung und -Kontrolle oder bei der Transkription zugeschrieben. Zum anderen konnten neben dem PHD-Zink-Finger ein sogenannter *Zinc-knuckle* sowie ein weiteres PHD-ähnliches Motiv identifiziert werden. Die drei Motive werden gemäß ihrer Anfangsbuchstaben als PZP-Motiv (PZPM) zusammengefasst (Perry, 2006). Der *Zn-knuckle* enthält eine C2HC-Signatur, das PHD-ähnliche Motiv eine Erweiterung des bekannten PHD-Motivs (C4HC2H). Die PZPM-Domäne kann aufgrund ihrer Cystein-Histidin-Signatur fünf Zink-Ionen binden (vgl. Abb. 3.25).

Proteine, die eine Epc-N-Domäne enthalten, werden in zwei Familien eingeteilt. Jede dieser zwei Familien wird wiederum in zwei Unterfamilien (I-IV) unterschieden. Sie variieren neben ihrer phylogenetischen Abstammung vor allem dadurch, dass das zuvor erwähnte PZP-Motiv ausschließlich in Untergruppe III und IV zu finden ist. Es verbindet die α -Helices 2 und 3 durch eine „Schleife“ (Abb. 3.23). Des Weiteren unterscheiden sich die Proteine der vier Unterfamilien durch das Vorhandensein verschiedener anderer charakteristischer Proteindomänen zusätzlich zur Epc-N-Domäne (Perry, 2006; Abb. 3.24).

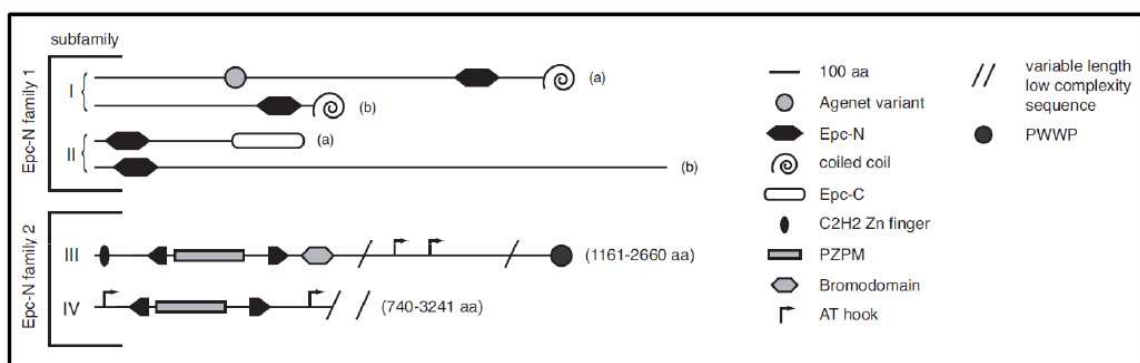


Abbildung 3.24: Domänenstruktur verschiedener Proteine mit Epc-N-Domäne (Perry, 2006).

Proteine mit Epc-N-Domänen werden in zwei Hauptfamilien eingeteilt, welche sich durch das Fehlen bzw. Vorhandensein des PZP-Motives unterscheiden. Die beiden Hauptfamilien sind zusätzlich in jeweils zwei Untergruppen eingeteilt (I-IV), die durch verschiedene zusätzliche Strukturdomänen charakterisiert sind. Die Unterfamilien I und II werden jeweils zusätzlich je nach Vorhandensein der Agetet- bzw. Epc-C-Domänen in zwei Gruppen unterteilt (a und b).

Abbildung 3.25 zeigt einen Sequenzvergleich der Epc-N-Domäne von Pfp1 mit denen einiger anderer Vertreter der EPL-Superfamilie. Alle konservierten Aminosäuren der Domäne sind im Pfp1-Protein markiert. Des Weiteren zeigt der Sequenzvergleich, dass das Protein alle Cystein-Histidin-Signaturen des PZP-Motives enthält und damit in die zweite Hauptfamilie der Epc-N-Proteine eingeordnet werden kann.

Die zweite Hauptfamilie umfasst die beiden Unterfamilien III und IV. Diese unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre unterschiedlichen, zusätzlich zur Epc-N-Domäne enthaltenen Struktur motive. Vertreter der Unterfamilie III enthalten zumeist noch mehrere andere Motive und Domänen (z.B. Bromodomäne, C2H2-Zink-Finger; vgl. Abb. 3.24). In der Unterfamilie IV sind zusätzlich meist nur sogenannte *AT-hooks* zu finden. Diese bezeichnen ein aus den Aminosäuren Glycin, Arginin und Prolin bestehendes Sequenzmotiv. Die Struktur tritt häufig in Verbindung mit anderen funktionellen Domänen in Chromatin-assoziierten Proteinen auf (Aravind & Landsman, 1998).

Auch im N-terminalen Bereich (Aminosäuren 235 bis 239) von Pfp1 konnte ein solcher *AT-hook* identifiziert werden, jedoch keine der anderen genannten Domänen. Auf Grund dieser Einteilung kann Pfp1 bislang der Epc-N-Untergruppe IV zugeordnet werden. Die Positionen der *in silico* nachgewiesenen Protein-Domänen von Pfp1 sowie deren Anordnung sind schematisch in Abbildung 3.26 gezeigt.

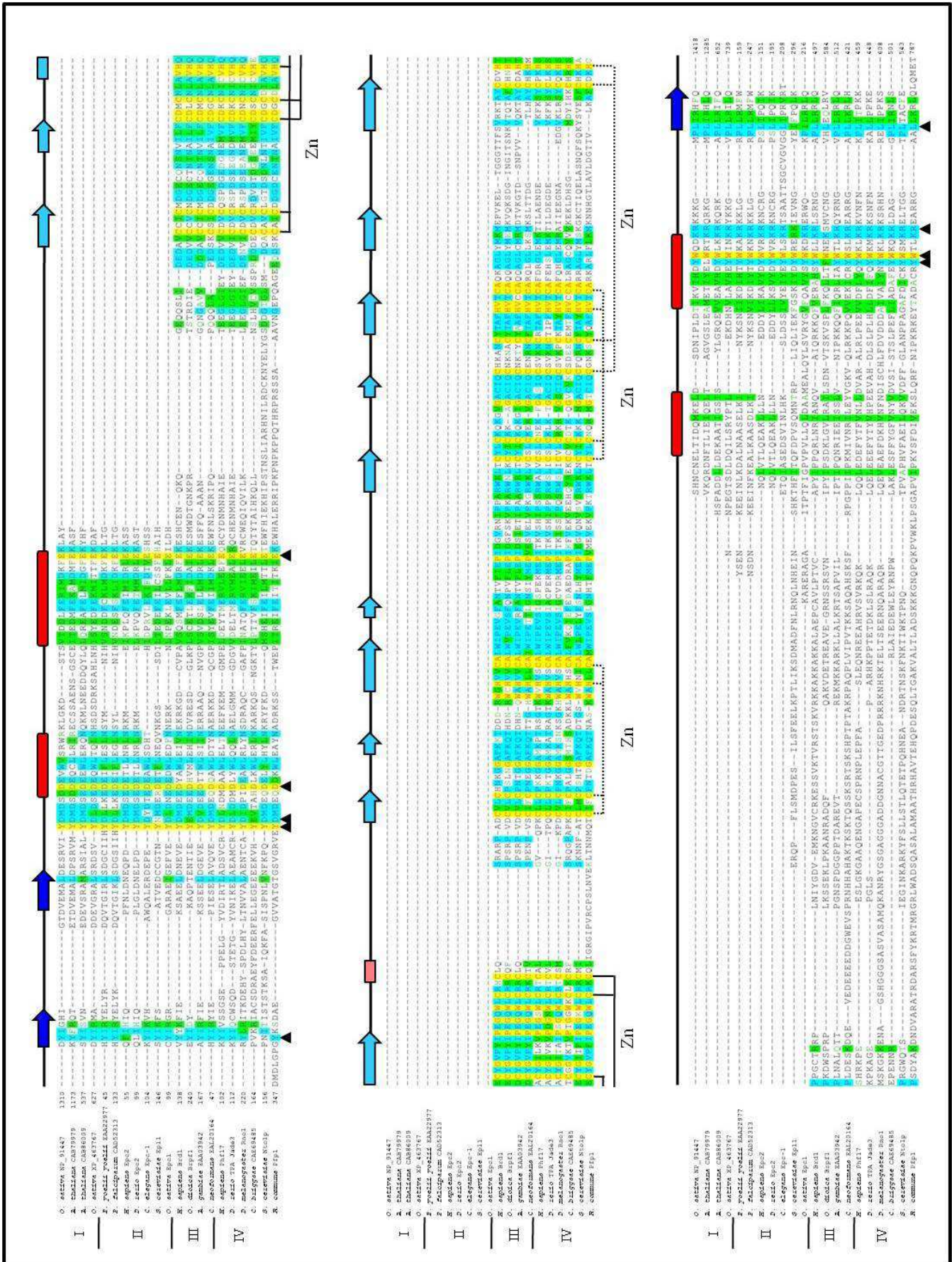


Abbildung 3.25

Abbildung 3.25: Sequenzvergleich der Epc-N-Domänen von Pfp1 und anderen Vertretern der Proteinfamilie (modifiziert nach Perry, 2006).

Hoch konservierte Aminosäuren sind rot markiert und mit gelben Balken unterlegt. Blau unterlegt erscheinen identische Aminosäuren, während funktional sehr ähnliche grün hervorgehoben sind. Leicht ähnliche sind zusätzlich grün markiert auf weißem Hintergrund. Hoch konservierte Aminosäuren der Epc-N-Domäne sind durch schwarze Dreiecke markiert. Rote Balken zeigen die α -Helices 1-4 der hypothetischen 3D-Struktur der Epc-N-Domäne. Blaue Pfeile markieren die β -Faltblätter. Schwarze Klammern zeigen die Zink-Finger-Motive der PZPM-Domäne (durchgängige Linien - PHD, unterbrochene Linien - *Zn-knuckle* und PHD-ähnliches Motiv) der Untergruppen III und IV. Deren β -Faltblätter sind als hellblaue Pfeile dargestellt.

Der Sequenzvergleich wurde mit VectorNTI Advance™ 11 unter Verwendung des AlignX/Clustal X-Moduls durchgeführt und ausgewertet (Lu & Moriyama, 2004).

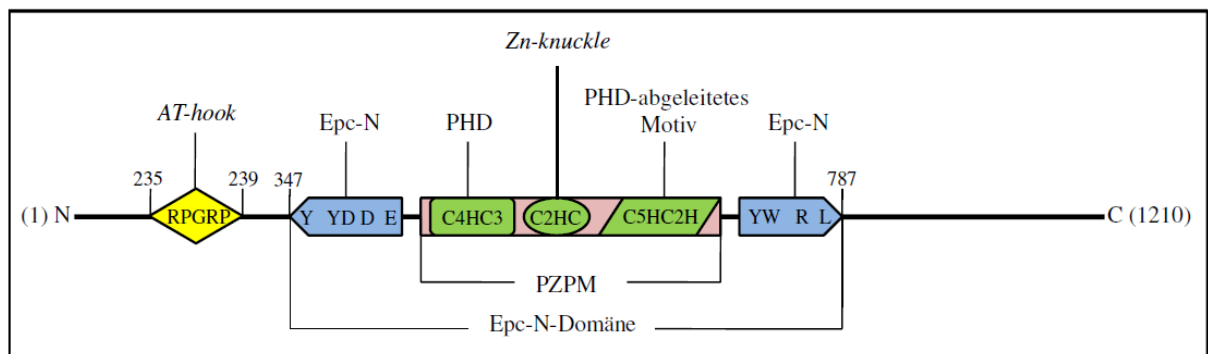


Abbildung 3.26: Schematische Darstellung der identifizierten Strukturdomänen in der Aminosäuresequenz von Pfp1.

Spezifische Protein-Domänen von Pfp1 mit den jeweils konservierten Aminosäuren. Blau dargestellt die kanonische Epc-N-Domäne (Aminosäuren 347-787), unterbrochen durch das PZP-Motiv (rosa; Aminosäuren 457-642) und die darin enthaltenen Zink-Finger-Motive (grün; PHD [Aminosäuren 457-501]; *Zn-knuckle* [Aminosäuren 527-550]; PHD-ähnliche Motiv [Aminosäuren 583-642]). In Richtung des N-Terminus gelegen, ist das *AT-hook*-Motiv welches gelb markiert ist (Aminosäuren 235-239).

3.3.2 Phylogenetische Einordnung von Pfp1

Abbildung 3.27 zeigt einen phylogenetischen Baum, der auf Basis der in Abbildung 3.25 dargestellten Proteinsequenzvergleiche erstellt wurde. Er zeigt die Abstammungs- bzw. Verwandtschaftsbeziehungen aller betrachteten Organismen auf Grund der ermittelten Sequenzähnlichkeiten der Epc-N-Domäne jener Proteine. Das Phylogramm wurde durch die Analyse-Software MEGA 4.0 (Kumer *et al.* 1994) unter Verwendung der *Neighbor-Joining*-Methode (Saitou & Nei, 1987) erstellt. Pfp1 zeigt die größte Nähe zu den Proteinen Nto1p aus *Saccharomyces cerevisiae* und einem hypothetischen Protein aus dem Basidiomyceten *Cryptococcus neoformans* (EAL20164), was auf eine nahe evolutionäre Verwandtschaft der pilzlichen Proteine schließen lässt. Für eine ausführlichere phylogenetische Betrachtung von Pfp1 sind jedoch mehr pilzliche Proteinsequenzen mit annotierten Epc-N-Domänen notwendig.

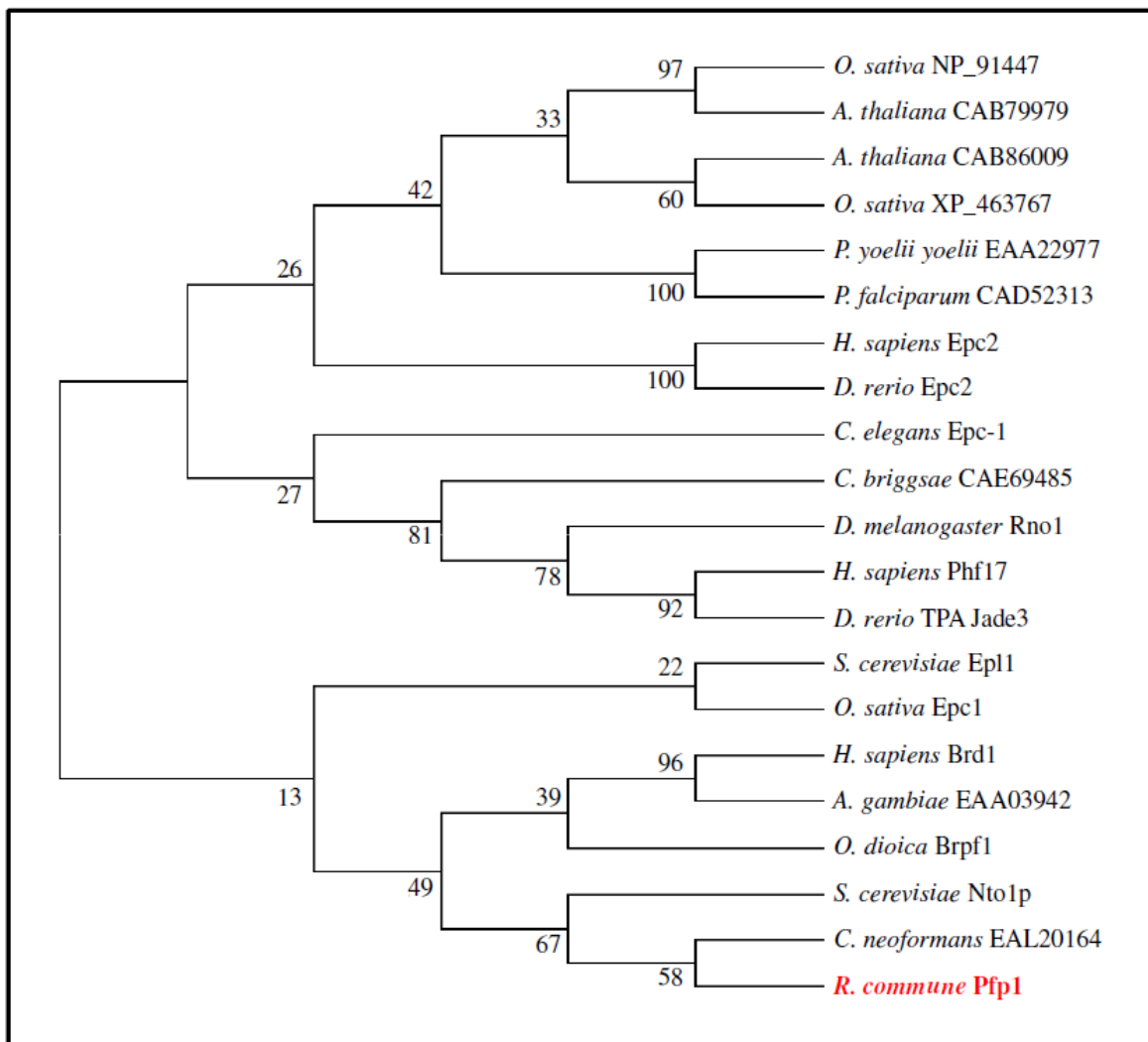


Abbildung 3.27: Phylogramm auf Basis der Aminosäuresequenzvergleiche verschiedener Proteine bei denen eine Epc-N-Domäne identifiziert werden konnte.





3.3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisierung des Pfp1-Proteins

Ein wichtiger Aspekt für die weitere Charakterisierung von Pfp1 stellte die Lokalisierung des Proteins in der Zelle dar. Um hierzu erste Hinweise zu bekommen, wurde die gesamte Sequenz von 1210 Aminosäuren mittels verschiedener Vorhersageprogramme *in silico* analysiert. Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Programm	Gewählter Organismustyp	Vorhersage der subzellulären Lokalisierung
PSORT I (Nakai <i>et al.</i> , 1999) (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form.html)	tierisch	Mitochondrium
PSORT II (Nakai <i>et al.</i> , 1999) (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html)	tierisch/Hefe	Nukleus
WoLF PSORT (Horton <i>et al.</i> , 2007) (http://wolfpsort.org/)	pilzlich	Mitochondrium
TargetP 1.1 (Emanuelsson <i>et al.</i> , 2000) (http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)	nicht-pflanzlich	Mitochondrium
MultiLoc2 (Blum <i>et al.</i> , 2009) (http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc2)	pilzlich	Mitochondrium
SherLoc2 (Briesemeister <i>et al.</i> , 2009) (http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/SherLoc2)	pilzlich	Nukleus
Predotar v. 1.03 (Small <i>et al.</i> , 2004) (http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html)	tierisch/pilzlich	Mitochondrium
BaCelLo (Pierleoni <i>et al.</i> , 2006) (http://gpcr.biocomp.unibo.it/bacello/pred.htm)	pilzlich	Mitochondrium
CELLO v. 2.5 (Yu <i>et al.</i> , 2004 & 2006) (http://cello.life.nctu.edu.tw/)	eukaryotisch	Nukleus

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der durchgeführten *in-silico*-Analysen zur subzellulären Lokalisierung des Pfp1-Proteins

Wie bereits zuvor erwähnt, sind Proteine, die Ähnlichkeiten zu Pfp1 zeigen, meist als kernlokalisiert in der Literatur beschrieben. Eine Lokalisierung des Proteins im Zellkern wurde auch durch eine Reihe der genutzten Programme vorhergesagt. Allerdings wurde häufiger eine mitochondriale Lokalisierung vorgeschlagen, welche im Gegensatz zum erwarteten Resultat der Untersuchung stand. Da die bioinformatischen Programme auf der Basis verschiedenster Vorhersage-Algorithmen arbeiten und somit untereinander nicht vergleichbar sind, sollten die Ergebnisse nochmals überprüft werden. Dabei kamen Vorhersage-Programme zur Anwendung, welche spezifisch zur Bestätigung mitochondrialer bzw. nukleärer Lokalisierungssignale entwickelt wurden. Die Resultate dieser *in-silico*-Untersuchungen sind in Tabelle 3.3 zusammengestellt.

Programm	Vorhersage	Position und Sequenz der das Erkennungssignal umfassenden Aminosäuren
PredictNLS (Cokol <i>et al.</i> , 2000) (http://cubic.bioc.columbia.edu/cgi/var/nair/resonline.pl)	kein NLS	--
cNLS Mapper (Kosugi <i>et al.</i> , 2008 & 2009) (http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)	monopartit	47/48-57 (E/PARKRRKYIP) 
	bipartit	658-692 (RDARSFYKRTMRGRLWADSQAS ALAMAATHRHAVT) 
NucPred (Brameier <i>et al.</i> , 2007) (http://www.sbc.su.se/~maccallr/nucpred/cgi-bin/single.cgi)	monopartit	50-54 (RKRRK) 
NLStradamus (2 Status-Hidden Markov Modell, statisch) (Nguyen <i>et al.</i> , 2009) (http://www.moseslab.csb.utoronto.ca/NLStradamus/)	„Viterbi-Algorithmus“	1197-1210 (KAKKGGKAKKKGRRR) 




	„Posterior-Algorithmus“	<p>42-59 (PRKRSEPARKRRKYIPGG) 232-241 (GKRRPGRPPK) 942-951 (KERRRLGKRI) 1196-1210 (SKAKKGKAKKKGRRR)</p> 
MITOPRED (Guda <i>et al.</i> , 2004) (http://bioapps.rit.albany.edu/MITOPRED/)	N-terminales mitochondriales Signalpeptid	keine Angaben
MitoProt II v.1.101 (Claros <i>et al.</i> , 1996) (http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html)	N-terminales mitochondriales Signalpeptid	<p>1-23 (MATLPSTPRRPASSRIRTTLPRS)</p> 
iPSORT (Bannai <i>et al.</i> , 2001 & 2002) (http://ipsort.hgc.jp/#predict)	N-terminales mitochondriales Signalpeptid	<p>1-30 (MATLPSTPRRPASSRIRTTLPRSV GSVQSD)</p> 

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der *in-silico*-Analysen zur vorhergesagten nukleären bzw. mitochondrialen Lokalisierung des Pfp1-Proteins sowie die schematische Darstellung der Positionen der Lokalisierungssignale

Wie aus Tabelle 3.3 ersichtlich, konnten durch die genutzten Vorhersageprogramme sowohl nukleäre, als auch mitochondriale Lokalisierungssignale bestätigt werden. Dabei wurden putative Erkennungssignale für den intrazellulären Transport am Carboxy- und ebenso am Amino-Terminus des Pfp1-Proteins vorgeschlagen. Eine mitochondriale Lokalisierung des Proteins stand im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Daten und erschien deshalb im Hinblick auf die bereits bekannten Funktionen ähnlicher Proteine zunächst unwahrscheinlich. Allerdings konnten auch zur angenommenen Kernlokalisierung des Proteins *in silico* keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, da je nach genutztem Programm sehr unterschiedliche oder gar keine Vorhersagen erhalten wurden.

Die *in-silico*-Daten sollten deshalb experimentell durch Proteinfusionsanalysen bestätigt werden. Dabei wurden sowohl ein Teil des 5'-Bereiches, als auch des 3'-Bereiches der

PFPI-Gensequenz in einem Leserahmen mit der kodierenden Sequenz (*EGFP*) des grün fluoreszierenden Proteins kloniert.

3.3.3.1 Amino-terminale Proteinfusionsanalysen

Da sowohl nukleäre als auch mitochondriale Erkennungssequenzen für den Amino-Terminus des Pfp1-Proteins postuliert wurden, sollte dieser für die Lokalisierungsstudien mit dem eGfp-Protein fusioniert werden. Dazu wurde zunächst ein 303 bp langes DNA-Fragment beginnend mit dem Starttriplett der *PFPI*-Gensequenz mit den Oligonukleotiden GFP-Fus-PFP1s und GFP-Fus-PFP2-2as2 (#30/#31, s. 7.1) per PCR amplifiziert (vgl. Abb. 3.28). Das Fragment wurde über Restriktions- und Ligationsansätze in einem Leserahmen mit der *EGFP*-Gensequenz kloniert (vgl. Abb. 7.4.1.1). Das Fusionskonstrukt sowie eine Hygromycin-Resistenz-Kassette (Hygromycin-B-Phosphotransferasegen, *HPH*) wurden in einen binären Vektor (pPZPtK8.10) kloniert (Abb. 3.28), mit dem der Agrobakterienstamm AGL0 transformiert wurde. Die Kolonien wurden vereinzelt und per Kolonie-PCR verifiziert (Daten nicht gezeigt). Diejenigen Kolonien, die einen Vektor trugen, wurden für die Agrobakterien-vermittelte Transfektion von Sporen des *R.-commune*-Wildtyps UK7 eingesetzt.

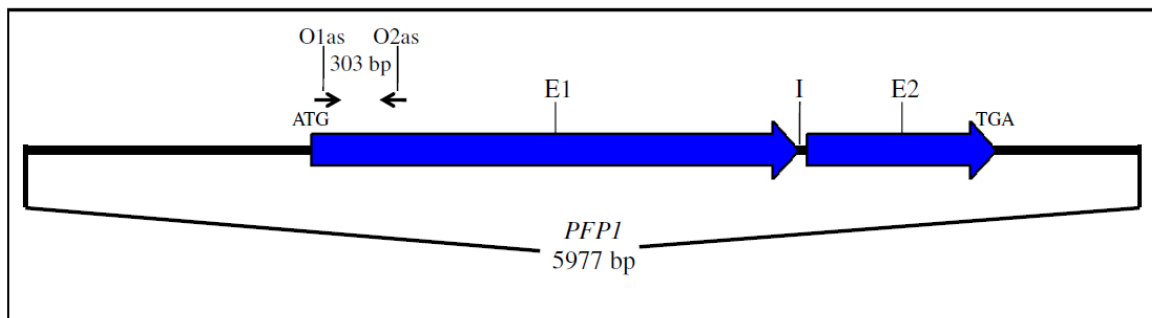


Abbildung 3.28a

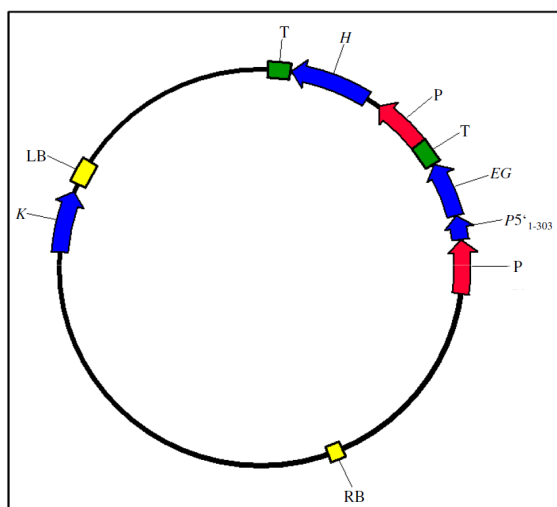


Abbildung 3.28b

Abbildung 3.28: Schematische Darstellungen des für die amino-terminale Proteinfusion genutzten *PFPI-5'*-Fragmentes sowie des binären Vektorkonstrukts pPZPtK8.10-Pfp1_N::eGfp.

Abbildung 3.28a zeigt die Positionen der für die Amplifikation des *PFPI-5'*-Fragmentes genutzten Oligonukleotide (O1s und O2as – GFP-Fus-PFP1s und GFP-Fus-PFP2-2as2). Das DNA-Fragment wurde zur Klonierung des binären Vektorkonstrukts pPZPtK8.10-Pfp1_N::eGfp (16006 bp) genutzt, welches in Abbildung 3.28b dargestellt ist. Das *PFPI-5'*-Fragment (*P5'*₁₋₃₀₃) sowie die kodierende Sequenz des *EGFP*-Gens (*EG*) wurden in einem Leserahmen kloniert (dargestellt als blaue Pfeile). Rote Pfeile markieren die Promotorsequenzen des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens P_{gpd} (P), Terminatorsequenzen T_{TRPC} (T) des Strukturgens *TRPC* des Tryptophan-Operons sind als grüne Boxen dargestellt. Beide Sequenzen stammen aus dem Ascomycet *Aspergillus nidulans*.

K – Kanamycin-Resistenz-Kassette; *RB* bzw. *LB* – rechte bzw. linke Border-Sequenz; *H* – Hygromycin-B-Phosphotransferasegen (*HPH*)

Die Pilz-Transformanden wurden auf Limabohnenagarplatten in Gegenwart von Hygromycin angezogen und visuell unter UV-Licht selektiert (Fluoreszenz-Mikroskop Leitz DMIL, Leica Microsystems GmbH). Fluoreszierende Kolonien wurden vereinzelt, in FRIES-Flüssigmedium überführt und 10 Tage bei 17°C und Dunkelheit angezogen. Insgesamt wurden elf Transformanden unter UV-Licht mikroskopiert („Axio Imager“, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Als Kontrolle diente ein transgener UK7-Stamm, welcher zuvor mit dem Plasmid pRcEGFP1 transfiziert wurde. Dieser binäre Vektor enthält ein *EGFP*-Konstrukt unter der Kontrolle des konstitutiven *GPD*-Promotors aus *Aspergillus nidulans* (s. 3.2.2.2)

Beispielhaft sollen hier nur Mikroskopie-Aufnahmen der Transformande UK7-Pfp1_N::eGfp #37 gezeigt werden, da die anderen untersuchten Mutanten vergleichbare Resultate zeigten. In Abbildung 3.29 sind sowohl Hellfeld- als auch Fluoreszenz-Mikroskopie-Aufnahmen der untersuchten Transformande #37 sowie der Positivkontrolle UK7- P_{gpd} ::eGfp dargestellt. Beide Pilze zeigen eine helle *EGFP*-Fluoreszenz unter UV-Licht, welche in der gesamten Hyphe verteilt ist. Bei der Positivkontrolle entsprach dies den Erwartungen, da das *EGFP*-Gen hier unfusioniert und konstitutiv exprimiert vorlag. Allerdings konnte auch bei der untersuchten Pilz-Transformande, die das Fusionskonstrukt enthielt, keine spezifisch lokalisierte Fluoreszenz festgestellt werden.

Aufgrund der aus den *in-silico*-Analysen erhaltenen Vorhersagen wurde eine Lokalisierung des Pfp1_N::eGfp-Fusionskonstrukts entweder in den Mitochondrien oder im Zellkern erwartet. Beide Organellen sind nicht markiert, so dass angenommen werden muss, dass das Fusionskonstrukt nicht spezifisch transloziert in der Zelle vorliegt. Ein Grund dafür könnte sein, dass der N-Terminus des Pfp1-Proteins auf Grund seiner Aminosäuresequenz sowie der daraus resultierenden Ladung von den genutzten Vorhersageprogrammen als mitochondriales Signalpeptid erkannt wurde, jedoch im Pfp1-Protein nicht diese Funktion erfüllt.

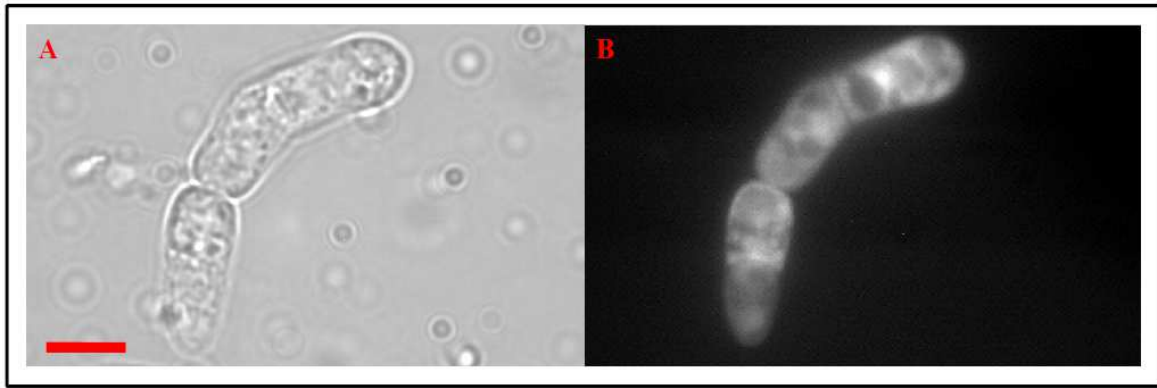


Abbildung 3.29a

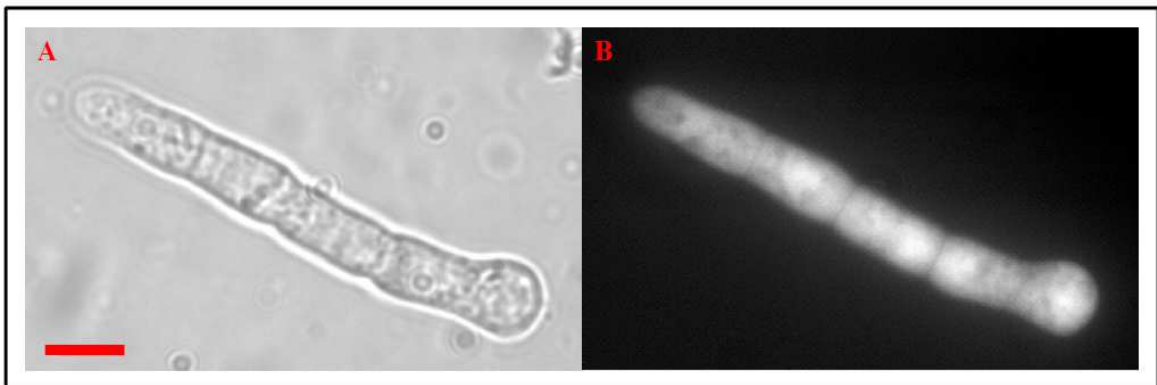


Abbildung 3.29b

Abbildung 3.29: Hellfeld- sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Transformante UK7-Pfp1_N::eGfp #37 und der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp *ex planta*. Die Abbildung 3.29a zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der Transformante UK7-Pfp1_N::eGfp #37 im Hellfeld (A) als auch unter UV-Licht (B; Ex450-490nm, Em515nm; Filterset 9; Axio Imager) in jeweils 1000facher Vergrößerung. Im Vergleich zur fluoreszierenden Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp (Abb. 3.29b, Hellfeld (A) und UV-Licht (B)) ist hier keine spezifische Lokalisierung des Fusionskonstrukts im Nukleus bzw. den Mitochondrien erkennbar.

Maßstabsbalken – 10 µm

Auch das vorhergesagte amino-terminale Nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) konnte durch die N-terminale Proteinfusion nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das nukleäre Erkennungssignal am N-Terminus des Proteins allein zu schwach ist um eine Lokalisierung des Fusionskonstrukts in den Zellkern zu bewirken. Durch das Vorhersageprogramm NLStradamus wurde zudem mit beiden genutzten Algorithmen ein putatives Kernlokalisierungssignal am C-Terminus vorgeschlagen. Um Hinweise auf dessen Funktionalität zu bekommen, sollten deshalb weitere Untersuchungen einer carboxy-terminalen Proteinfusion des Pfp1-Proteins mit eGfp durchgeführt werden.

3.3.3.2 Carboxy-terminale Proteinfusionsanalysen

Für die carboxy-terminale Proteinfusion wurde zunächst ein 113 bp langes DNA-Fragment des 3'-Bereiches der *PFPI*-Gensequenz mit den Oligonukleotiden NLS-Fus1s und NLS-Fus2as (#42/#43) amplifiziert (Abb. 3.30) und in einem Leserahmen mit der *EGFP*-Gensequenz in den pRcEGFP1-Vektor kloniert (vgl. Abb. 7.4.1.2). Der binäre Vektor – in Abbildung 3.30 schematisch dargestellt – wurde in den Agrobakterienstamm AGL0 transferiert. Die per Kolonie-PCR verifizierten Kolonien (Daten nicht gezeigt) wurden für die Agrobakterien-vermittelte Transfektion des *R.-commune*-Wildtyps UK7 verwendet.

Wie schon in Kapitel 3.3.3.1 beschrieben, wurden die fluoreszierenden Pilz-Transformanten, auf Hygromycin-B-Platten und visuell unter UV-Licht selektiert. Sieben Transformanten wurden in FRIES-Medium angezogen und das 10 Tage alte Myzel unter dem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert. Da auch hier alle untersuchten Pilz-Mutanten ähnliche Ergebnisse zeigten, sollen exemplarisch die Transformante UK7-eGfp::Pfp1_C #1 sowie die Positivkontrolle (UK7-P_{gpd}::eGfp) im Vergleich dazu gezeigt werden.

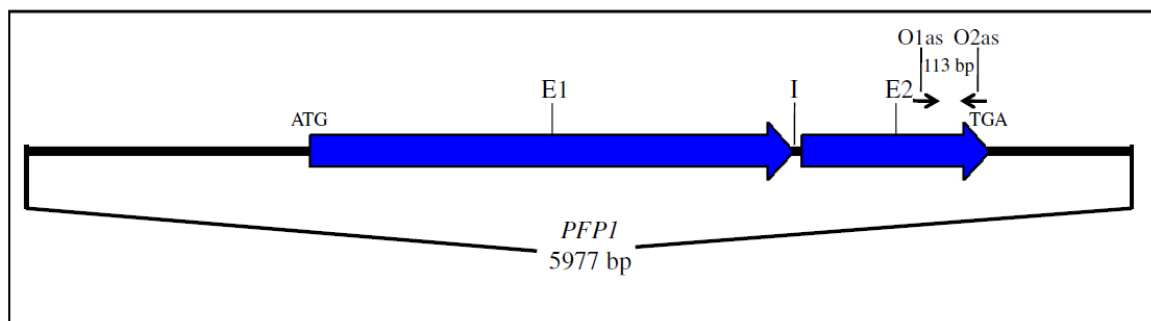


Abbildung 3.30a

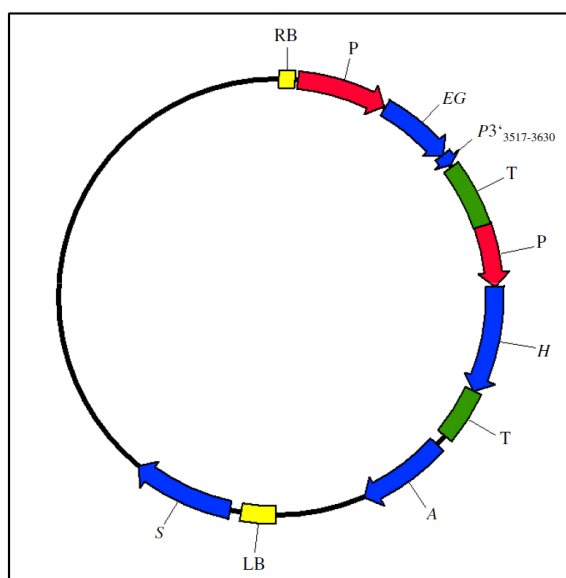


Abbildung 3.30b

Abbildung 3.30: Schematische Darstellungen des für die carboxy-terminale Proteinfusion genutzten *PFPI*-3'-Fragmentes, sowie des binären Vektorkonstrukts pRcEGFP1-eGfp::Pfp1_C.

Für das C-terminale Fusionskonstrukt wurde der 3'-Bereich der *PFPI*-Gensequenz (3517-3630 bp der kodierenden Sequenz) per PCR amplifiziert (Abbildung 3.30a, O1s und O2as – NLS-Fus1s und NLS-Fus2as), und das DNA-Fragment in einem Leserahmen mit der *EGFP*-Gensequenz (*EG*) in den binären Vektor pRcEGFP1 kloniert (Abbildung 3.30b; 12978 bp). Das Fusionskonstrukt ist, wie alle anderen kodierenden Sequenzen mit blauen Pfeilen dargestellt. Rote Pfeile und grüne Boxen markieren die Promotorsequenzen des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens, P_{gpd} (P), bzw. die Terminatorsequenzen, T_{TPC} (T), des Strukturgens *TRPC* des Tryptophan-Operons aus *Aspergillus nidulans*. A – Ampicillin-Resistenz-Kassette; S – Spectinomycin-Resistenz-Kassette; H – Hygromycin-B-Phosphotransferasegen (*HPH*); RB bzw. LB – rechte bzw. linke Border-Sequenz;

Die Ergebnisse der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der carboxy-terminalen Proteinfusion UK7-eGfp::Pfp1_C #1 sowie der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp sind in der Abbildung 3.31 gezeigt. Auch hier konnte keine spezifisch in der Hyphenzelle lokalisierte *EGFP*-Fluoreszenz beobachtet werden. Da die Lokalisierung des C-terminalen Fusionskonstrukts im Zellkern vermutet wurde, sollte zusätzlich eine Färbung der Pilz-Hyphen mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt werden. Dieser Farbstoff besitzt die Eigenschaft, in die DNA zu interkalieren, weshalb er häufig dazu genutzt wird, Zellkerne in lebenden Organismen anzufärben. Die Färbung wurde sowohl mit der Transformante #1 als auch mit der Positivkontrolle durchgeführt. Wie man in Abbildung 3.31 (jeweils Abbildung C) sehen kann, sind die Zellkerne gut zu erkennen. Die *EGFP*-Fluoreszenz lässt sich allerdings nicht auf diese Regionen in der Zelle beschränken, so dass auch bei der carboxy-terminalen Proteinfusion von einem nicht eindeutigen Ergebnis ausgegangen werden muss.

Über die Gründe kann bislang nur spekuliert werden. Sehr wahrscheinlich ist aber, dass ein putatives Nukleäres Lokalisierungssignal allein anscheinend nicht ausreicht, um das eGfp-Fusionskonstrukt in den Zellkern zu transportieren. In diesem Fall ist es möglich, dass nicht nur die N- und C-Termini des Pfp1-Proteins sondern die gesamte Sequenz an ein Reporterprotein fusioniert werden muss, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Mit dem genutzten Programm NLStradamus wurden zudem nicht nur ein, sondern vier Kernlokalisierungssignale in der Pfp1-Proteinsequenz vorhergesagt. Daher kann man annehmen, dass alle Erkennungssignale zusammen eine Lokalisierung des Proteins in den Zellkern bewirken können, eines allein jedoch zu schwach ist.

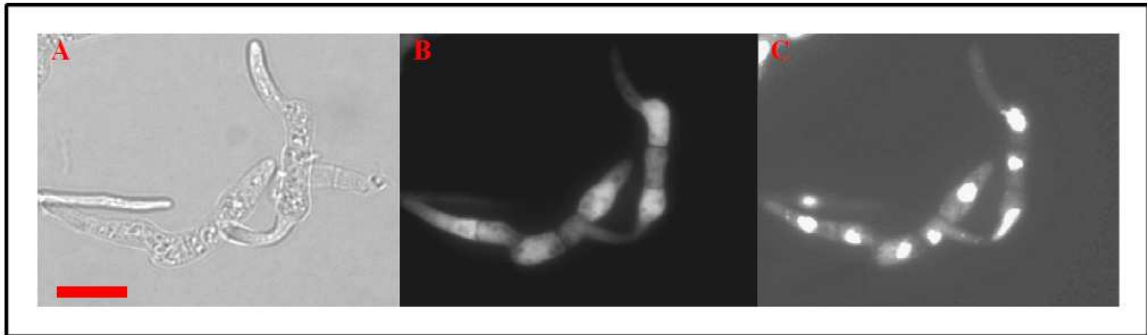


Abbildung 3.31a

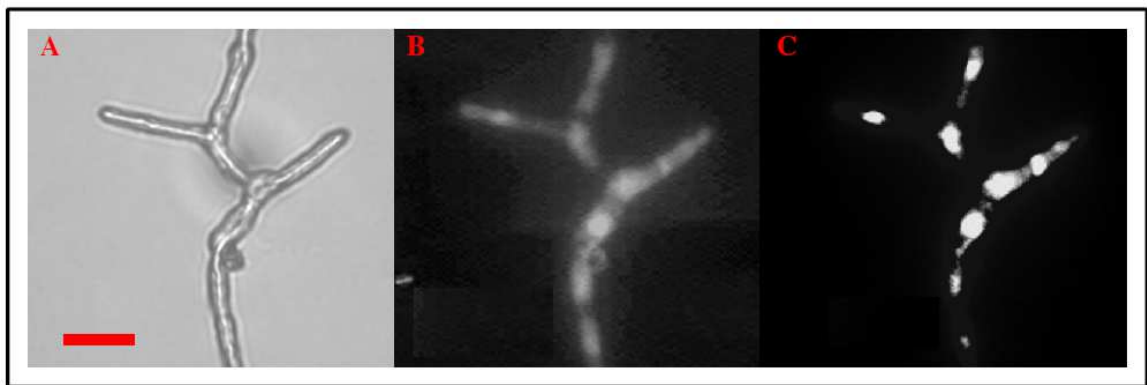


Abbildung 3.31b

Abbildung 3.31: Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie DAPI-Färbung der Transformante UK7-eGfp::Pfp1_C #1 und der Positivkontrolle UK7-P_{gpd}::eGfp *in vitro*.

Die Abbildung 3.31a zeigt mikroskopische Aufnahmen der Transformante UK7-eGfp::Pfp1_C #1 im Hellfeld (A), unter UV-Licht mit GFP-Filter (B; 450-490nm; Filterset 9; Axio Imager) sowie unter UV-Licht nach DAPI-Färbung und entsprechendem Filter (C; Ex365nm, Em445-450nm; Filterset 49; Axio Imager) in jeweils 1000facher Vergrößerung. Im Vergleich zur Positivkontrolle (Abbildung 3.31b A-C) zeigt die Transformante #1 keine spezifische Kernlokalisierung des C-terminalen eGfp-Fusionskonstruktes.

3.4 Generierung der *PFPI*-Deletionsmutanten

Ein wichtiger Schritt zur Charakterisierung eines Gens ist die Generierung einer Deletionsmutante sowie deren nachfolgende Analyse im Vergleich zum Wildtyp. Die apathogene REMI-Mutante LB20₅₇ zeigte eine doppelte Integration des Vektors pAN7-1 in den 5'-untranslatierten Bereich des *PFPI*-Gens stromaufwärts des offenen Leserahmens (s. 3.1). Die proteinkodierende Sequenz des Gens war somit nicht direkt betroffen, so dass die Auswirkung der Mutagenese eher auf einen regulatorischen Effekt zurückzuführen war. Bei einer Insertionsmutagenese wie der REMI-Mutagenese kann das verwendete Restriktionsenzym auch andernorts im Genom schneiden und damit DNA-Schäden hervorrufen. Zudem kann eine Integration des Vektors an anderen Orten des Genoms und somit in andere kodierende Gensequenzen nicht zwangsläufig ausgeschlossen werden. Eine gerichtete Deletion des *PFPI*-Gens war deshalb für die vorliegende Arbeit von großem Interesse.

Filamentöse Pilze werden hauptsächlich durch zwei Methoden transfiziert. Zum einen durch die Agrobakterium-vermittelte Transfektion (ATMT von engl. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation), zum anderen durch die Transfektion von Pilz-Protoplasten. Für die Generierung der *PFPI*-Deletionsmutanten des *R. commune*-Wildtyp-Isolats UK7 wurden beide Methoden angewandt und optimiert.

3.4.1 Agrobakterium-vermittelte Transfektion (ATMT) von *Rhynchosporium commune*

Die Transfektion von *Rhynchosporium commune* mittels *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach de Groot *et al.* (1998). In Vorversuchen konnte eine zufriedenstellende Transfektionseffizienz (0,005%) durch Einsatz einer Sporenkonzentration von 5×10^7 Sporen/ml erreicht werden. Dabei wurde das *R. commune*-Isolat UK7 unter Verwendung des Agrobakterien-Stamms AGL1 mit dem binären Vektor pRcEGFP1 transfiziert (vgl. Abb. 7.3.2.2). Dieses pPZP200-Derivat (Hajdukiewicz, 1994) enthält sowohl das Gen für die Hygromycin-B-Phosphotransferase (*HPH*) aus *Escherichia coli* (Punt, 1987) als auch die modifizierte Form der kodierenden Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (*EGFP*). Neben der Verwendung des Antibiotikums war so zusätzlich eine visuelle Selektion der Transformanten über *EGFP*-Fluoreszenz möglich. Alle analysierten UK7-Vektor-Transformanten wuchsen auf Hygromycin-B-Selektionsplatten und zeigten eine *EGFP*-Fluoreszenz unter UV-Licht (Kirsten *et al.*, 2011). Die Anwesenheit der *EGFP*-Gensequenz konnte durch PCR nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

Um diese Methode für die Generierung der *PFPI*-Deletionsmutante in *R. commune* anzuwenden, war es zunächst nötig, einen binären Vektor zu klonieren, der die Deletion

der *PFPI*-Gensequenz ermöglichen sollte. Als Ausgangsvektor wurde ebenfalls das binäre Plasmid pPZP200 genutzt. Es enthält neben rechter und linker Bordersequenz mit eingeschlossenem Polylinker eine Spectinomycin-Resistenzkassette (Gen für Adenylyltransferase (*AADA*) aus *E. coli*) zur Selektion im bakteriellen System (vgl. Abb. 7.3.2.1).

Zwischen die rechte und die linke Bordersequenz des Ausgangsplasmids wurde sowohl eine Phleomycin-Resistenzkassette (*ble*) aus dem Organismus *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt *et al.* 1990) als auch das *EGFP*-Gen kloniert. Beide kodierenden Sequenzen wurden unter der Kontrolle der schon zuvor erwähnten *GPD*-Promotor- sowie der *TRPC*-Terminator-Sequenzen aus *Aspergillus nidulans* exprimiert. Durch speziell konstruierte Oligonukleotide wurden die beiden Fragmente (*ble*- und *EGFP*-Kassette) so kloniert, dass am Beginn der Phleomycin-Kassette und zwischen den beiden Fragmenten Polylinker mit Sequenzen für mehrere Restriktionsendonukleasen eingefügt wurden (vgl. Abb. 3.32). Der neu entstandene Vektor wurde als pSS2(*ble*) bezeichnet und umfasst 11063 Basenpaare (vgl. Abb. 7.4.3).

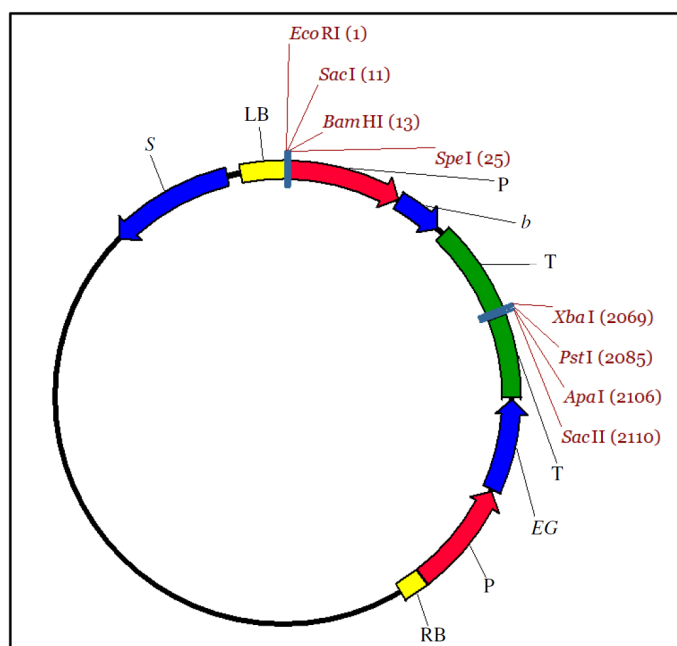


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung des binären Vektorkonstrukts pSS2(*ble*) (11063 bp).

Die Abbildung zeigt das aus dem binären Ausgangsvektor pPZP200 neu konstruierte Vektorkonstrukt pSS2(*ble*). Zwischen die linke und rechte Bordersequenz (LB bzw. RB) wurde eine Phleomycin-Resistenzkassette (*ble*), sowie eine *EGFP*-Kassette (*EG*) kloniert. Restriktionserkennungsstellen wurden durch spezielle Oligonukleotide eingefügt.

P – Promotorsequenz des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens (P_{gpd}) aus *A. nidulans*;

T – Terminatorsequenz des *TRPC*-Gens zur Tryptophanbiosynthese (T_{trpc}) in *A. nidulans*;

EG – kodierende Sequenz für grünfluoreszierendes Protein (*EGFP*) aus *A. victoria*;

b – kodierende Sequenz für Phleomycin-Resistenzgen aus *S. hindustanus* (*ble*);

S – kodierende Sequenz für Spectinomycin-Resistenzgen (Adenylyltransferasegen *AADA* aus *Escherichia coli*)

Durch die Konstruktion dieses Vektors wurde es möglich, die für eine homologe Rekombination notwendigen 5'- und 3'-Sequenzen des *PFPI*-Gens in die Polylinkerstellen vor und nach der Phleomycin-Resistenzkassette einzufügen (Abb. 3.33). Dafür wurden von der *PFPI*-Sequenz vor allem die nicht kodierenden Bereiche kloniert, so dass bei einem Austausch der Gensequenz gegen das neue Konstrukt kein vollständiges Genprodukt mehr entstehen konnte. Das eingefügte *ble*-Gen sollte zur Selektion der pilzlichen Transformanden dienen.

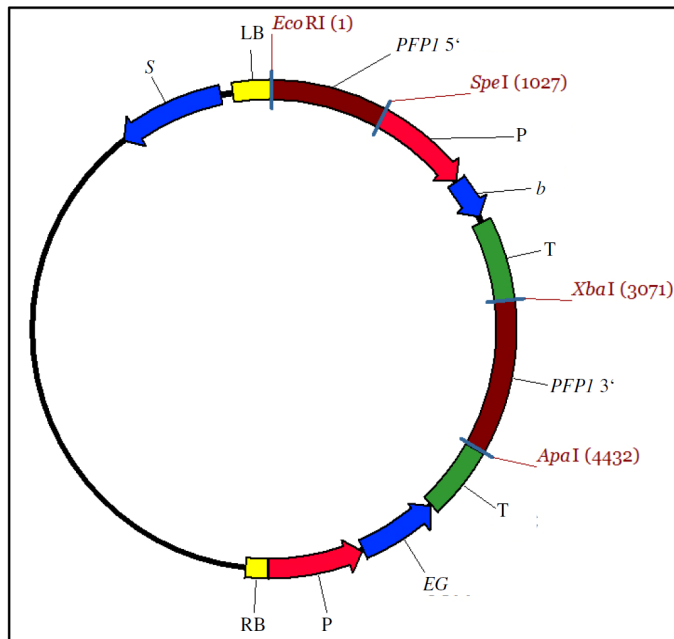


Abbildung 3.33: Schematische Darstellung des binären Deletionsvektors pSS2(ble)- Δ *PFPI* (13389 bp).

Die Phleomycin-Resistenzkassette (*ble*) umgrenzend wurden die 5'- und 3'-Sequenzen (*PFPI* 5', 1020 bp bzw. *PFPI* 3', 1306 bp) des *PFPI*-Gens kloniert. Für die Klonierung verwendete Restriktionsenzyme sind gekennzeichnet als *EcoRI*, *SpeI* (5'-Fragment), sowie *XbaI*, *ApaI* (3'-Fragment).

P – Promotorsequenz des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens (P_{gpd}) aus *A. nidulans*;

T – Terminatorsequenz des *TrpC*-Gens zur Tryptophanbiosynthese (T_{trpC}) in *A. nidulans*;

EG – kodierende Sequenz für grünfluoreszierendes Protein (*EGFP*) aus *A. victoria*;

b – kodierende Sequenz für Phleomycin-Resistenzgen aus *S. hindustanus* (*ble*);

S – kodierende Sequenz für Spectinomycin-Resistenzgen (Adenylyltransferasegen *AADA* aus *Escherichia coli*)

RB bzw. LB – rechte bzw. linke Bordersequenz

Bei einer homologen Rekombination zwischen *PFPI*-Sequenzen und dem konstruierten Deletionskonstrukt wird außerdem die *EGFP*-Kassette nicht mit übertragen. Dieser Umstand diente weiterhin zur visuellen Selektion der potentiellen Deletionsmutanten von allen anderen Transformanden. Bei einer erfolgreichen Klonierungs- und Selektionsmethode sollte dieses System auch für Deletionen anderer Gene genutzt werden (Abb. 3.34).

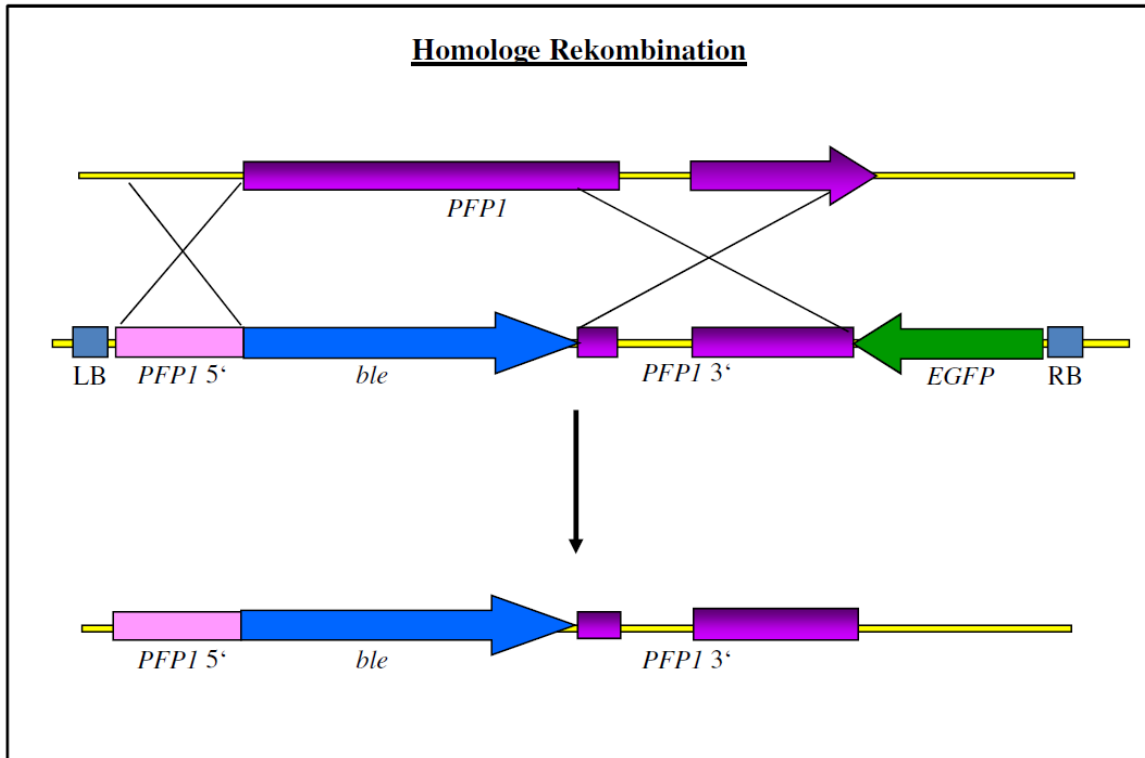


Abbildung 3.34a

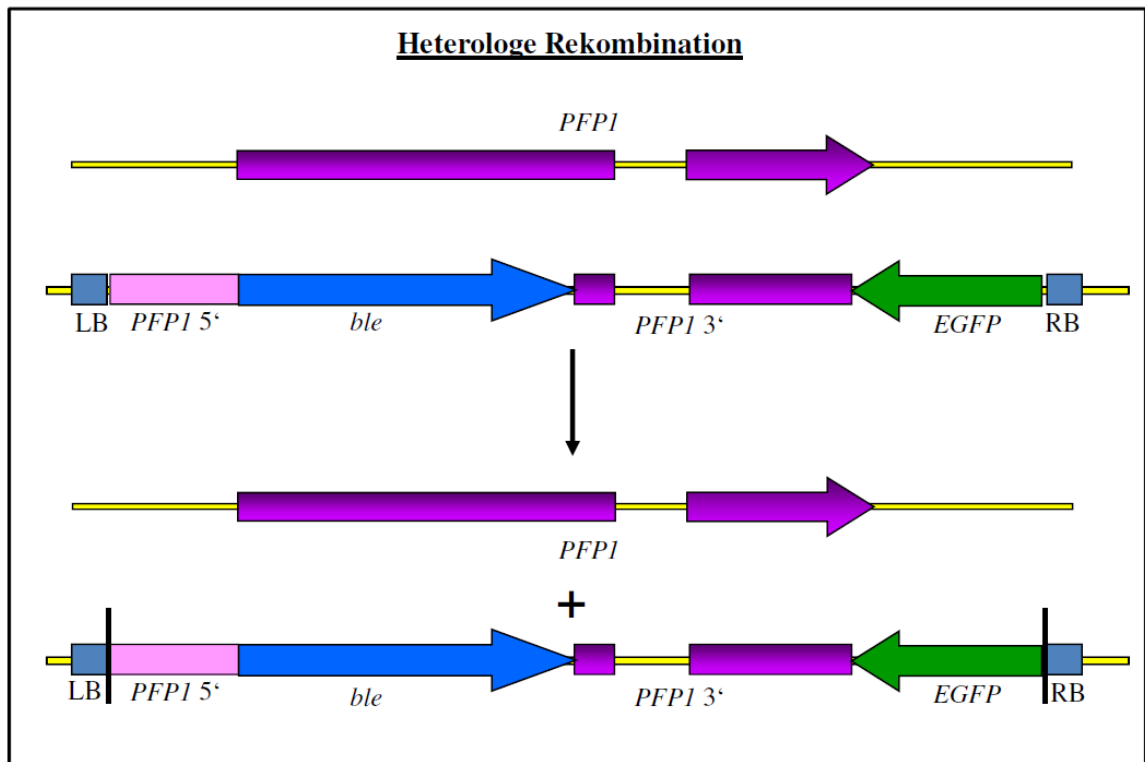


Abbildung 3.34b

Abbildung 3.34: Schematische Darstellungen der beiden möglichen Rekombinationsereignisse der Agrobakterium-vermittelten Transfektion von *R. commune* unter Verwendung des binären Deletionsvektorkonstrukts pSS2(ble)- Δ PFPI.

Bei einer homologen Rekombination findet ein Austausch zwischen den komplementären Sequenzen der PFPI-Gensequenz und des Deletionskonstrukts statt (PFPI 5' bzw. PFPI 3'). Die dazwischen liegenden Sequenzen werden durch die Phleomycin-Kassette (*ble*) ersetzt. Somit wird der Leserahmen der kodierenden Gensequenz unterbrochen und das Gen dadurch deletiert. Die EGFP-Kassette (*EGFP*) wird nicht übertragen. Die putativen Transformanten mit Gendeletion zeigen keine EGFP-Fluoreszenz (3.34a). Bei einer heterologen Rekombination findet kein Austausch komplementärer Sequenzen statt. Die gesamte T-DNA zwischen rechter und linker Bordersequenz (LB bzw. RB) wird häufig mehrfach im Genom von *R. commune* eingebaut. Die PFPI-Sequenz bleibt erhalten und die Transformanten zeigen eine EGFP-Fluoreszenz unter UV-Licht (3.34b).

Für die nachfolgende Agrobakterium-vermittelte Transfektion von *R. commune* wurde zunächst ein virulenter Agrobakterien-Stamm mit dem Deletionskonstrukt transformiert (AGL1). Die den Vektor tragenden Bakterien wurden mit Acetosyringon behandelt. Danach wurden diese im Verhältnis 1:1 mit Sporen des Wildtyps von *R. commune* (UK7) auf Nährmedium ausplattiert und inkubiert, um das Übertragen der T-DNA zu ermöglichen. Das Abtöten der Agrobakterien erfolgte mit dem Antibiotikum Cefotaxim; die Pilz-Transformanten wuchsen auf Selektionsmedien. Die entstehenden transgenen Pilzkolonien wurden danach auf neuen Platten mit Nährboden vereinzelt und schließlich auf ihre Fluoreszenz getestet. Nur Pilzkolonien, die keine grüne Fluoreszenz zeigten, wurden als potentielle Deletionsmutanten weiter vermehrt und per PCR auf das Vorhandensein der EGFP-Kassette (I), sowie der putativ deletierten Gensequenzen von PFPI (II) getestet (Abb. 3.35).

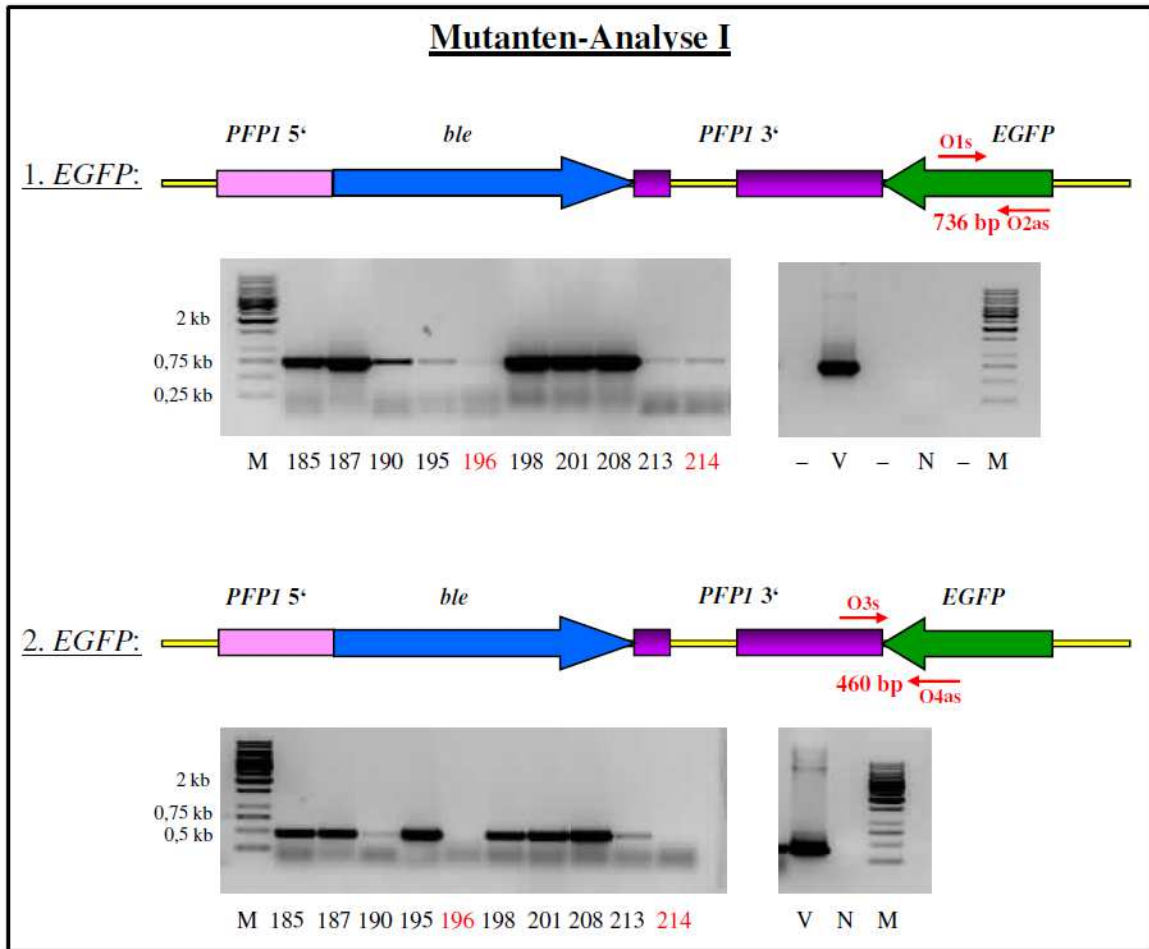


Abbildung 3.35a

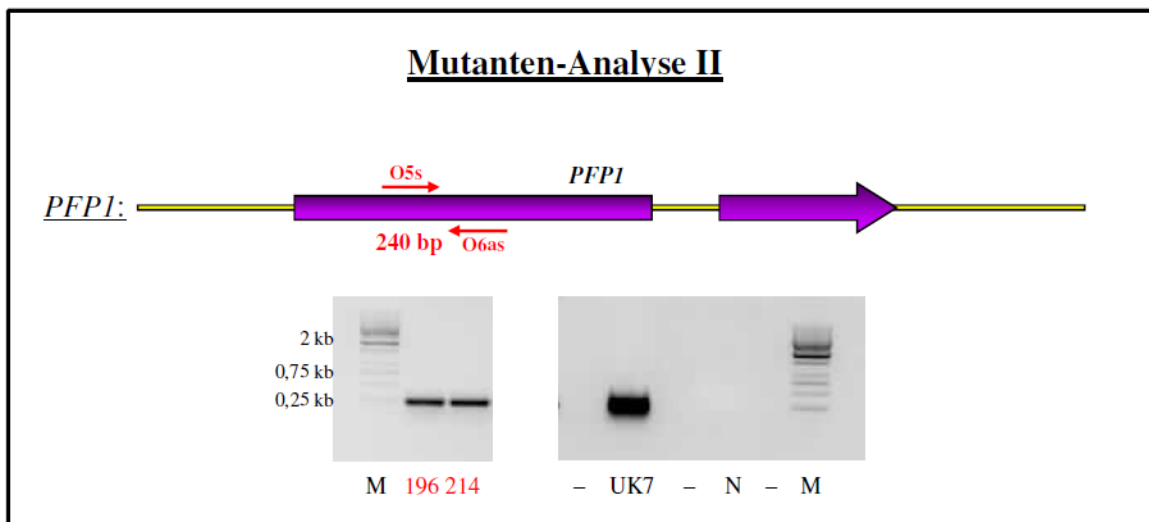


Abbildung 3.35b

Abbildung 3.35: Schematische Darstellungen der für die Mutanten-Analyse genutzten PCR sowie deren gelelektrophoretische Auftrennung.

Die Abbildungen zeigen am Beispiel der Pilz-Transformanden von #185 bis #214 die für das *Screening* genutzten PCR. Im ersten Teil der Mutanten-Analyse (I) wurden die Transformanden auf die Präsenz der *EGFP*-Kassette (*EGFP*) im Genom überprüft. Dabei wurde sowohl ein Fragment der kodierenden Sequenz (1. *EGFP*, O1s/O2as 736 bp) als auch der überlappende Bereich zwischen dem *PFPI* 3'-Fragment und der *EGFP*-Kassette (2. *EGFP*, O3s/O4as 460 bp) amplifiziert. Zeigten die Transformanden in mindestens einer der beiden Reaktionen kein PCR-Fragment, wurden sie auf das Vorhandensein der putativ deletierten *PFPI*-Gensequenz (*PFPI*, O5s/O6as 240 bp) überprüft (Mutanten-Analyse II). Alle getesteten Transformanden zeigten eine Wildtyp-Bande. Eine *PFPI*-Deletionsmutante konnte auch nach dreimaliger Wiederholung des Transfektionssystems nicht identifiziert werden.

M – 1 kb Größenstandard; V – Positivkontrolle Deletionsvektor pSS2(ble)- Δ *PFPI* als Matrize; N – Negativkontrolle ohne Matrize; UK7 – genomische DNA des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7 als Matrize; O1s und O2s – pSS2-GFP3s und pSS2-GFP4as (#78/#79); O3s und O4as – PFP29s und pSS2-MCS2-1s (#65/#80); O5s und O6as – PFP7s und PFP6as (#54/#53)

In der folgenden Tabelle (Tab. 3.4) sind die Arbeits- und Selektionsschritte der Transfektion von *R. commune* durch Agrobakterien zusammengefasst. Die Transfektion wurde dreimal durchgeführt. Für den ersten Ansatz wurden insgesamt 5×10^6 Sporen eingesetzt, da diese Konzentration zunächst als ausreichend angenommen wurde, eine bessere Verteilung der Kolonien auf den Filterplatten versprach und demzufolge eine bessere Vereinzelung. Allerdings ergab dieses Experiment eine sehr niedrige Transfektionseffizienz, so dass in den beiden folgenden Experimenten die Anzahl der eingesetzten Sporen um eine Zehnerpotenz auf 5×10^7 Sporen pro Transfektion erhöht wurde. Die Anzahl der transfizierten Pilzkolonien stieg dabei um das 25fache. Die Transfektionseffizienz blieb allerdings bezogen auf die Zahl der eingesetzten Sporen vergleichsweise gering. Durch visuelle Selektion konnten durchschnittlich zirka 90% der separierten Pilzkolonien als heterolog rekombinant eingestuft werden, da sie eine Fluoreszenz unter UV-Licht-Exposition zeigten. Die potentiellen nicht fluoreszierenden Deletionsmutanten wurden allerdings nach PCR-*Screening* als ausnahmslos falsch positiv identifiziert, da das *PFPI*-Wildtyp-Gen in allen Transformanden nachgewiesen werden konnte. Eine Deletion der *PFPI*-Gensequenz konnte somit auch nach dreimaliger Wiederholung des Experiments nicht erreicht werden.

Arbeitsschritt	Anzahl der Transformanden	Effizienz	Durchschnittswerte
Transfektion von <i>R. commune</i> Wildtyp UK7 (1. Selektion auf Phleomycin)	1. Transfektion 107/5x10 ⁶ Sp.	0,0021%	--- } 0,0051%
	2. Transfektion ~2550/5x10 ⁷ Sp.	0,0051%	
	3. Transfektion ~2550/5x10 ⁷ Sp.	0,0051%	
2. visuelle Selektion durch GFP-Fluoreszenz	1. Transfektion 17/107	15,88%	--- } 9,26%
	2. Transfektion 67/1008	6,65%	
	3. Transfektion 68/572	11,88%	
Identifizierung der Deletionsmutanten	1. Transfektion 0/17	} 0%	
	2. Transfektion 0/67		
	3. Transfektion 0/68		

Tabelle 3.4: Zusammenfassung und Auswertung der Agrobakterium-vermittelten Transfektion von *R. commune* mit dem binärem Deletionsvektor pSS2(ble)- Δ PFPI.

3.4.2 Transfektion von *R. commune* nach Protoplastierung

Mit der Methode der Agrobakterium-vermittelten Transfektion von *R. commune* konnten keine *PFPI*-Deletionsmutanten generiert werden. Die Charakterisierung einer *PFPI*-Mutante stand allerdings noch immer im Fokus der Arbeit, so dass es nötig war, neue Methoden hinsichtlich der Transfektion sowie der Klonierungsstrategien zu testen.

Die T-DNA der Agrobakterien wird vorzugsweise in gerade zum Zeitpunkt der Transfektion hoch exprimierte Bereiche der genomischen DNA des Pilzes inseriert (Chyi *et al.* 1986; Koncz *et al.* 1989). Dies kann ein Grund für den Misserfolg der ATMT-Methode sein, da hierbei Sporen von *R. commune* eingesetzt werden. Die Real-Time-PCR-Analysen sowie die Untersuchungen der *PFPI*-Promotorfusionen standen zu diesem Zeitpunkt noch aus, so dass noch keine Angaben über die Expression des Gens in diesem Entwicklungsstadium des Pilzes gemacht werden konnten. Demnach konnte zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass das *PFPI*-Gen bzw. die das Gen umgebenden Loci nicht zu den hoch transkribierten Bereichen im Genom des Pilzes gehören, was einen Einbau der T-DNA unwahrscheinlicher macht. Für die Transfektion mittels Protoplasten wird anstelle von Konidiosporen im Flüssigmedium angezogenes Myzel von *R. commune* verwendet. Diese Methode sollte für die Generierung der *PFPI*-Deletionsmutante optimiert und angewendet werden.

3.4.2.1 Optimierung der Protoplastierung

Die Protoplastierung des Myzels wurde zunächst nach Rohe *et al.* (1996) durchgeführt. Das Myzel wurde drei Wochen in FRIES-Medium in großen Petrischalen bei 17°C angezogen. Acht Gramm dieses Myzels wurden dann in einem 50 ml-Reaktionsröhrchen bei Raumtemperatur (20°C) zwei Stunden mit einer Enzym-Mischung aus Chitinasen und Cellulasen (*Lysing Enzyme Trichoderma harzianum*, SIGMA) behandelt. Jedoch konnte mit dieser Methode die erforderliche Gesamtanzahl von mindestens 5×10^7 Protoplasten pro ml nicht erreicht werden, was eine nachfolgende Transfektion nicht zuließ. In mehreren anschließenden Versuchen zeigte sich, dass das Alter des eingesetzten Pilzmyzels, die Temperatur sowie die Länge der Reaktion und die Stärke, mit der die Probe geschwenkt wurde, eine maßgebliche Rolle bei der Optimierung der Protoplastierung spielte. In den Vorversuchen A bis C wurden nacheinander verschiedene Parameter verändert. Die Zahl der jeweils gebildeten Protoplasten pro Gramm eingesetzten Pilzmyzels in Abhängigkeit von der Zeit ist in Abbildung 3.36 grafisch dargestellt.

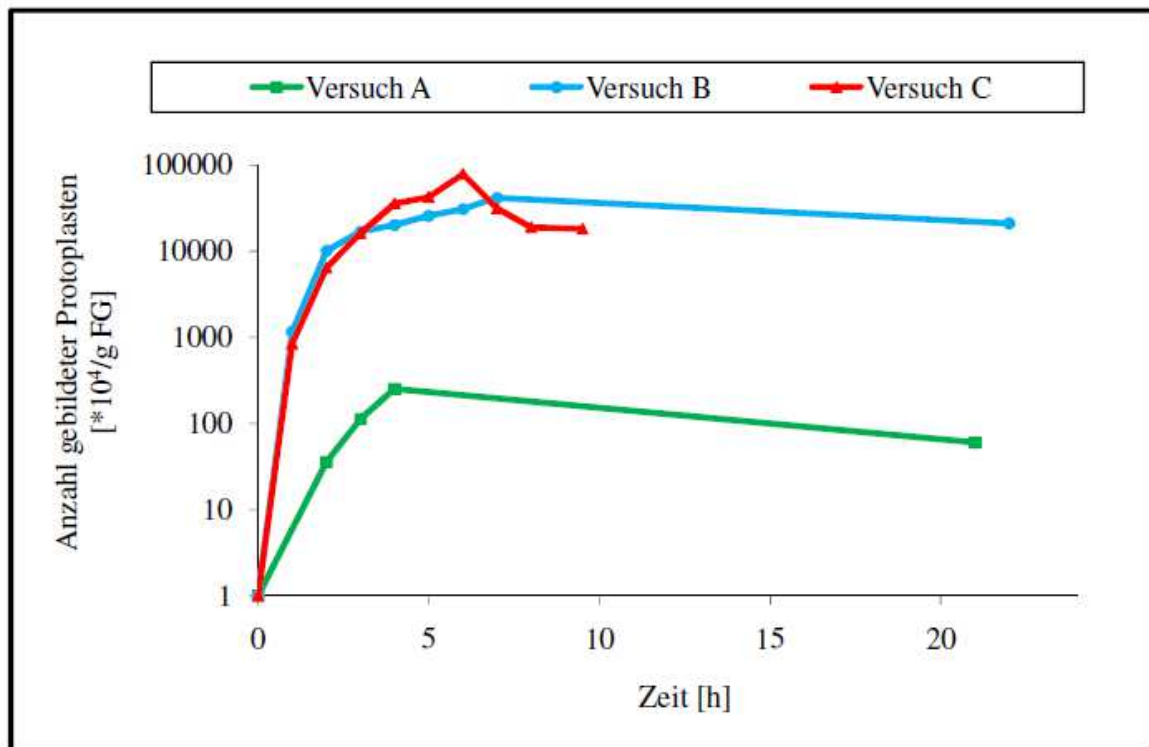


Abbildung 3.36: Grafische Darstellung der Vorversuche A bis C zur Optimierung der Protoplastierung von *R.-commune*-Myzel.

Die Graphen zeigen den Verlauf der Protoplastierung des Myzels von *R. commune* über einen Zeitraum von bis zu 22 Stunden nach Zugabe der Enzym-Mischung. In den Versuchen A bis C wurden nacheinander verschiedene Parameter verändert (Erklärungen siehe Text) und die Protoplastierung in Abhängigkeit von der Zeit durch Auszählung der gebildeten Protoplasten verfolgt. Die Anzahl wurde pro Gramm eingesetztem Pilzmyzel berechnet und logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Jeder Versuch umfasst zwei technische Wiederholungen. Die Auszählung der Protoplasten erfolgte mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer.

In Tabelle 3.5 sind die durchgeführten Vorversuche A bis C und deren Bedingungen zusammengestellt. Die jeweils veränderten Parameter sind farblich markiert. Die Erhöhung der Temperatur von 20°C/28°C auf 29°C, das Schwenken der Probe während der Protoplastierung bei 40 rpm sowie die Reduzierung des pro Reaktionsröhrchen eingesetzten Pilzmyzels von acht auf zwei Gramm erbrachten eine Steigerung der Protoplastenausbeute um zwei Zehnerpotenzen (vgl. Versuch B). Der kritischste Schritt war jedoch der Einsatz von 10 Tage anstelle von 21 Tage gewachsenem Pilzmyzel. Wie die Kurve in Versuch C zeigt, konnte hier innerhalb einer relativ kurzen Zeitspanne (6 h) die Höchstzahl an Protoplasten freigesetzt werden ($\sim 8 \times 10^8$ P/g FG). Diese hohe Zahl ist notwendig, da erfahrungsgemäß beim nachfolgenden Filtrationsschritt, welcher die Myzelreste von den protoplastierten Zellen trennt, eine große Zahl an Protoplasten (bis zu einer Zehnerpotenz) verloren geht.

Versuch	Arbeitstemperatur [°C]	Schüttelvorgang [rpm]	Alter des Myzels [d]	Eingesetztes Pilzmyzel [g]
Versuch A	2 h 20 danach 28	ohne Schütteln	21	8
Versuch B	29	40	21	2
Versuch C	29	40	10	2

Tabelle 3.5: Zusammenstellung der jeweils geänderten Bedingungen der Vorversuche A bis C zur Protoplastierung von *R.-commune*-Myzel.

„Junge“ Zellwände lassen sich demnach sehr viel besser abbauen, als „ältere“. Zehn Tage gewachsenes Myzel ist weniger kompakt als drei Wochen gewachsenes Myzel. Es zeigt im Normalfall eine höhere Zahl an Verzweigungsstellen der Pilzhyphen und damit eine größere Oberfläche. Die Protoplastierung kann so besser und schneller vonstatten gehen, da sich für die Zellwand-abbauenden Enzyme eine größere „Angriffsfläche“ bietet. Die Reduzierung der Menge an eingesetztem Myzel von acht auf zwei Gramm pro Reaktionsröhrchen verhinderte eine zu große Aggregation der Myzelstücke und damit wiederum eine optimalere Protoplastierung. Das leichte Schwenken der Röhrchen in waagerechtem Zustand förderte zusätzlich die Durchmischung des Reaktionsansatzes und damit die Protoplastierung.

3.4.2.2 Optimierung der Transfektion

Die Protoplastierung wurde im Folgenden stets nach den in Tabelle 3.5 für Versuch C angegebenen Parametern durchgeführt. Für die anschließende Transfektion der Protoplasten wurde zunächst der pilzliche Expressionsvektor pAN7-1 eingesetzt und das Protokoll nach Rohe *et al.* (1996) angewendet. Die Protoplasten-Suspension wurde in einem 15 ml-Reaktionsröhrchen mit 10 µg des zuvor linearisierten Plasmids 20 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) inkubiert. Danach wurden 1,4 ml einer 50%igen PEG-6000-Lösung zugegeben und die Mischung 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die transfizierten Protoplasten wurden gewaschen und zentrifugiert, um sie vom PEG zu befreien, und danach in einem 1 M Sorbit enthaltenden Puffer mit 10x FRIES-Medium drei Tage bei 17°C zur Regeneration inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert.

Abb. 3.37a zeigt die auf den Selektionsplatten gewachsenen (A) sowie die später vereinzelt Kolonien (B) nach der Transfektion. Der Einsatz von 1×10^7 Protoplasten pro Transfektionsansatz erbrachte insgesamt ca. 800 bis 1000 Kolonien, was einer Transfektionseffizienz von 0,008% bis 0,01% entspricht. Die Kolonien auf den Selektionsplatten waren allerdings sehr klein und wuchsen während der gesamten Inkubationszeit nicht merklich. Nach Vereinzeltung der Kolonien auf neuen Selektionsplatten starben 80% bis 90% von ihnen ab, was die Transfektionseffizienz stets

auf ein Minimum senkte (vgl. Abb. 3.37a, B). Über die Ursachen kann bislang nur spekuliert werden. Scheinbar waren die vereinzelt Kolonien nicht stabil transfiziert, so dass die Fremd-DNA nicht vollständig in das Genom der Pilzzellen eingebaut wurde. Ein anderer Grund könnte die Instabilität des Antibiotikums in den Selektionsplatten sein. Der Vektor pAN7-1 ist Träger der Hygromycin-B-Resistenzkassette. Dieses Antibiotikum ist nach Herstellerangaben jedoch nur höchsten vier Wochen in Agarplatten haltbar. Da die Platten bei 17°C mindestens zwei Wochen inkubiert werden, könnte ein Teil des Antibiotikums schon abgebaut sein, bevor die Transformanten auf den Platten wachsen, womit der Selektionsdruck erheblich vermindert wird. Durch erneutes Umsetzen der Transformanten auf frisches Selektionsmedium sterben nicht stabil transfizierte Kolonien ab.

Es war deshalb wichtig die Methode zu optimieren, um den ständigen Verlust an Transformanten zu minimieren. Ein erster Ansatzpunkt war dabei, die Zeitspanne der PEG-Behandlung zu verlängern, um eine möglichst stabile Transfektion zu erreichen. In mehreren Arbeiten zu diesem Thema wurden sowohl die Protoplastierungen von zahlreichen *Streptomyces*-Arten (Gaisser, 1998; Faust, 2000; Weitnauer, 2002) als auch von *Ustilago maydis* (Hillig, 2005) und *Colletotrichum graminicola* (Rauchhaus, 2002) beschrieben. Bei den Transfektionen dieser Organismen wurden die Protoplasten nach Zugabe der DNA und der PEG-Lösung sofort auf Platten ohne Antibiotikum ausplattiert und mindestens 24 Stunden inkubiert. Das Selektionsmedium wurde erst nach dieser Inkubationszeit auf den Platten verteilt. Diese Methode sollte auch für die Transfektion von *R.-commune*-Protoplasten getestet werden.

In zwei Versuchsansätzen (Versuche I und II) wurden 10 µg des Vektors pAN7-1 sowohl linearisiert als auch zirkulär für die Transfektion von jeweils $1 \times 10^7 / 200$ µl Protoplasten eingesetzt. Das Protoplasten-DNA-Gemisch wurde mit jeweils 500 µl 50%iger PEG-6000-Lösung versetzt und sofort auf vier (jeweils 175 µl) Limabohnenagarplatten mit Saccharose ausplattiert. Zwei der Platten wurden nach einem Tag (Versuch A bzw. C), die anderen zwei nach weiteren 24 Stunden (Versuch B bzw. D) mit einer Hygromycin-B-Lösung überschichtet (Endkonzentration 100 µg/ml) und 14 Tage bei 17°C inkubiert. Abbildung 3.37b zeigt als Beispiel nur eine der Selektionsplatten nach 14-tägiger Inkubation (A). Alle anderen Platten sahen dieser sehr ähnlich, unabhängig davon, ob mit linearisiertem oder zirkulärem Plasmid transfiziert wurde oder ob das Selektionsmedium nach einem oder zwei Tagen auf die Platten aufgebracht wurde. Wie man im Vergleich zur Platte in Abbildung 3.37a erkennen kann (A), sind hier neben einer Vielzahl sehr kleiner Kolonien (ähnlich denen in Abb. 3.37a, A) vor allem auch eine Anzahl große Kolonien gewachsen, welche schon die typische rosa Myzelfärbung zeigen. In Tabelle 3.6 ist die Auswertung der vier Versuchsansätze zusammengefasst. Von den Selektionsplatten wurden jeweils alle groß gewachsenen Kolonien isoliert. Dazu wurden dann jeweils so viele der kleinen Kolonien bis zur Gesamtzahl 100 vereinzelt. Die Kolonien wurden erneut auf Hygromycin-B-Selektionsplatten vereinzelt und 14 Tage bei

17 °C inkubiert (vgl. Abb. 3.37b, B). Danach wurden die überlebenden Kolonien ausgezählt und zusätzlich mittels PCR auf das Vorhandensein der Hygromycin-B-Resistenzkassette überprüft. Diese konnte ausnahmslos in allen Transformanten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Auszählung der Kolonien zeigte, dass die bereits auf den ersten Selektionsplatten groß gewachsenen Kolonien auch auf den zweiten Platten fast alle anwuchsen, während der Großteil der kleinen Kolonien auf den neuen Selektionsplatten abgestorben war. Dies zeigt, dass die großen Kolonien mit hoher Wahrscheinlichkeit stabil transfiziert wurden. Sie konnten bereits zu Beginn der Inkubationszeit auf den ersten Selektionsplatten dem Selektionsdruck ausweichen, weil sie von Anfang an in der Lage waren das Hygromycin-B in den Platten abzubauen und damit zu wachsen. Deshalb erscheinen sie auch größer als alle nachwachsenden Kolonien. Die große Anzahl an abgestorbenen Zellen zeigt, dass diese nicht stabil transfiziert wurden und erst später auf den ersten Selektionsplatten wachsen, wenn ein Teil des Antibiotikums auf Grund der langen Inkubationszeit bei 17°C schon im Abbau begriffen ist.

Die Optimierung der Methode verlief dahingehend positiv, als dass stabil transfizierte Pilzkolonien von nicht stabil transfizierten besser zu unterscheiden waren. Dies ersparte im Folgenden unnötige Arbeit und Zeitaufwand, da von den Selektionsplatten nach der Transfektion nur noch die großen, mit hoher Wahrscheinlichkeit transfizierten, Kolonien auf neuen Platten vereinzelt wurden. Eine Erhöhung der Transfektionseffizienz konnte allerdings auch bei dieser Methode nicht erreicht werden. Möglicherweise ist dazu der Einsatz höherer Konzentrationen an Protoplasten pro Transfektionsansatz notwendig. Wie aber die folgenden Versuche zeigen, war dies zum Erreichen der jeweiligen Versuchsziele nicht erforderlich.

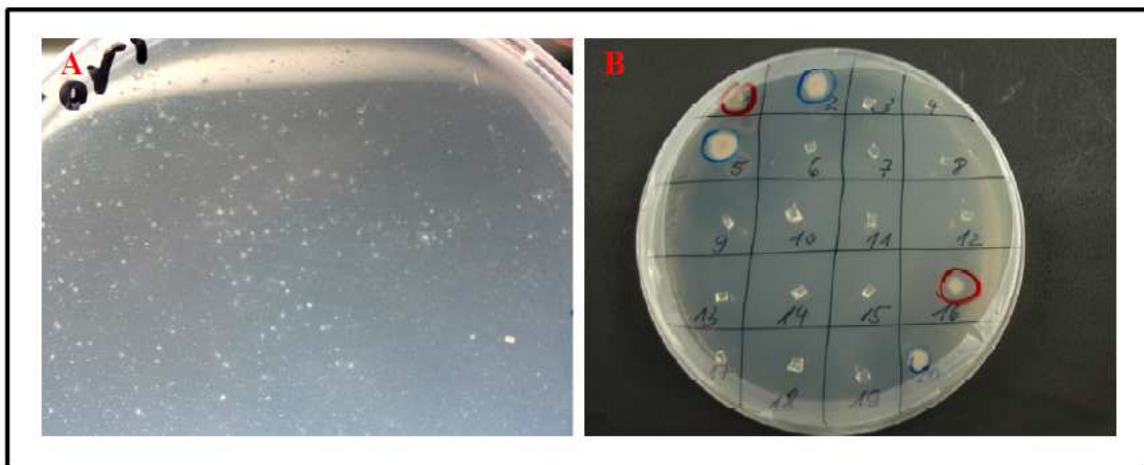


Abbildung 3.37a

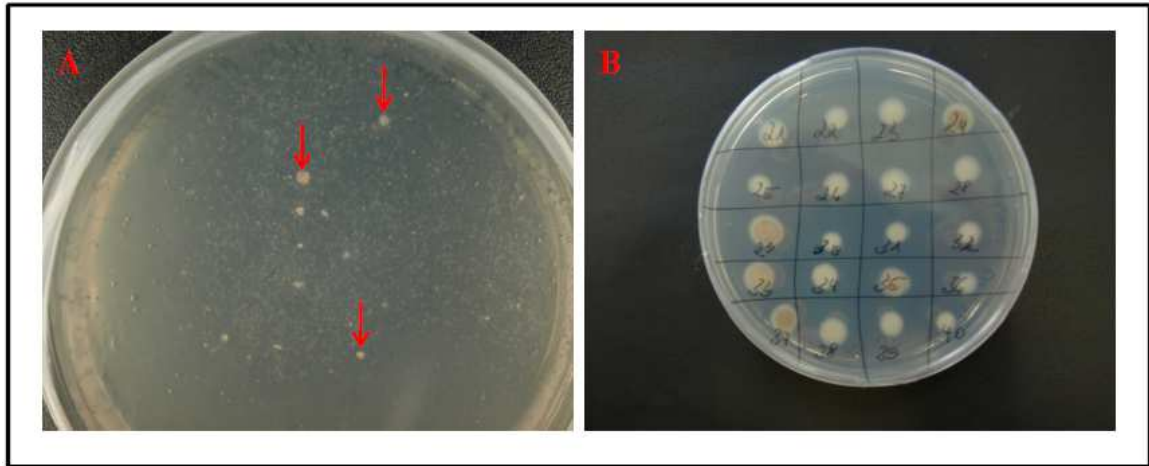


Abbildung 3.37b

Abbildung 3.37: Aufnahmen der ersten und zweiten Selektionsplatten vor (a) und nach Optimierung (b) der Protoplasten-Transfektion.

Abbildung 3.37a zeigt einen Ausschnitt einer Selektionsplatte (A) sowie einer Platte mit bereits vereinzelt wachsenden Pilzkolonien (B) vor Optimierung der Transfektions-Methode nach jeweils 14 Tagen Inkubation. Die Kolonien auf der ersten Selektionsplatte wachsen meist sternförmig und bleiben sehr klein. 80% bis 90% der Kolonien sterben nach Vereinzlung auf neuen Selektionsplatten ab.

Abbildung 3.37b zeigt Fotografien von Platten nach Optimierung der Methode. Auf der Selektionsplatte (A) wachsen nach 14-tägiger Inkubation große rosa gefärbte Kolonien (markiert durch rote Pfeile). Diese sind stabil transfiziert und wachsen auch nach der Vereinzlung auf neuen Selektionsplatten (B).

Versuch	Versuchsteil	Anzahl großer Kolonien	Anzahl überlebender Kolonien	Anzahl kleiner Kolonien	Anzahl überlebender Kolonien
Versuch I	A	18	18 (100%)	82	7 (8,5%)
	B	33	29 (87,9%)	77	12 (15,6%)
Versuch II	C	15	12 (80%)	85	6 (7,1%)
	D	20	18 (90%)	80	26 (32,5%)

Tabelle 3.6: Zusammenfassung und Auswertung des Optimierungsversuchs der Protoplasten-Transfektion.

In Versuch I wurde linearisiertes Plasmid (pAN7-1) für die Transfektion eingesetzt. Versuch II wurde mit zirkulärem Vektor durchgeführt. Die jeweiligen Versuchsteile bezeichnen die Zugabe des Selektionsmediums nach 24 (A bzw. C) oder 48 (B bzw. D) Stunden nach Transfektion.

3.4.3 Etablierung des Fusions-PCR-Systems für *R. commune*

Nachdem die Methode der Protoplastierung sowie der nachfolgenden Transfektion für *R. commune* optimiert werden konnte, wurde für die Deletion von *PFPI* zunächst eine Transfektion mit dem schon generierten binären Deletionsvektor pSS2(ble)- Δ *PFPI* versucht. Die Transfektion wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 1×10^7 Protoplasten eingesetzt, woraus jeweils ca. 900 transformierte Pilzkolonien entstanden. 78% der Pilz-Transformanden zeigten eine *EGFP*-Fluoreszenz, so dass die restlichen 22% als potentielle Deletionsmutanten auf das Vorhandensein von *PFPI* getestet wurden. Alle mittels PCR überprüften Transformanden enthielten das Wildtyp-Gen, so dass eine enorme Anzahl an falsch positiven Kolonien detektiert wurde. Eine Gendeletion konnte auch hier nicht erreicht werden.

Die Auswertung zeigte, dass der erfolglose Versuch der Deletion des *PFPI*-Gens nicht durch die verwendete Methode bestimmt wurde. Ein Grund dafür könnte zumindest bei der Protoplasten-Transfektion die enorme Größe des eingesetzten Vektors von 13,3 kb sein. Je größer das eingesetzte DNA-Fragment, desto schwerer wird seine Aufnahme in die Protoplasten und desto geringer wird die Transfektionseffizienz (Kondo & McKay, 1984; Fleming *et al.*, 1995). Ein anderer Grund für das Scheitern des Systems könnten die doppelt enthaltenen komplementär klonierten Sequenzen des *GPD*-Promotor sowie des *TRPC*-Terminators aus *A. nidulans* sein. Lagern sich diese Sequenzen bei der Übertragung der linearisierten T-DNA aneinander, können sie eine „Schleifen-artige“ Sekundärstruktur ausbilden, die dazu führt, dass eine homologe Rekombination unmöglich, oder zumindest behindert wird. Eine weitere Möglichkeit ist, dass durch die Verwendung des binären Vektors mehrere Basenpaare an DNA-Sequenzen mit übertragen wurden, die keine Homologien zur *PFPI*-Sequenz zeigten. Dadurch erhöht sich die Frequenz endogener Integrationen, die über sogenannte Mikrohomologien ausgetauscht werden können (Schiestl *et al.*, 1993; Zhu & Schiestl, 1996; Chan *et al.*, 2007). Dies sind allerdings nur Vermutungen. Fakt ist, dass in zwei unabhängigen Transfektionsmethoden mit dem binären Vektorkonstrukt und der *EGFP*-Selektionsmethode keine Deletion des *PFPI*-Gens erzielt werden konnte. Aus diesem Grund wurde es notwendig, eine neue Strategie zu entwickeln.

In einer Arbeit von Kuwayama *et al.* (2002) wurde eine Gendeletion im zellulären Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* beschrieben. Als Methode zur Herstellung des zur Gendeletion verwendeten Konstruktes wurde eine Strategie entwickelt, die auf *R. commune* übertragbar war. Durch vier PCR-Reaktionen konnte ein Deletionskonstrukt amplifiziert werden. Dieses wurde in die Zellen des Pilzes transferiert. Bei *D. discoideum* wurde die Transfektion durch Elektroporation von Zellen vorgenommen. *R. commune* konnte über Protoplasten transfiziert werden. In Abb. 3.38 ist die Fusions-PCR-Methode im Allgemeinen schematisch dargestellt. Zunächst werden in drei primären einfachen PCR-Reaktionen sowohl eine Resistenz-Kassette als auch die flankierenden Sequenzen

des Wildtyp-Gens amplifiziert (Schritt 1). Dabei wird die Resistenz-Kassette so konstruiert, dass an ihrem 5'- und 3'-Ende angefügte Überhänge jeweils die komplementäre Sequenz zum Anfang bzw. Ende der Gensequenzen beinhaltet. Dies beruht auf der Konstruktion spezieller Oligonukleotide, welche die jeweils komplementären Enden enthalten. Durch die vierte PCR-Reaktion können somit die drei Fragmente über ihre komplementären Enden fusioniert werden (Schritt 2).

Diese Methode birgt viele Vorteile. Sie ist schnell, da nur das Fusions-PCR-Konstrukt amplifiziert werden muss, ohne Einsatz spezifischer Vektoren und zeitraubender Klonierungsschritte. Das Fusionskonstrukt wird direkt für die Transfektion eingesetzt. Es ist linear und um ein Vielfaches kleiner als ein zirkulärer binärer Vektor mit häufig über 10 kb, was den Einbau der Fremd-DNA erheblich erleichtert.

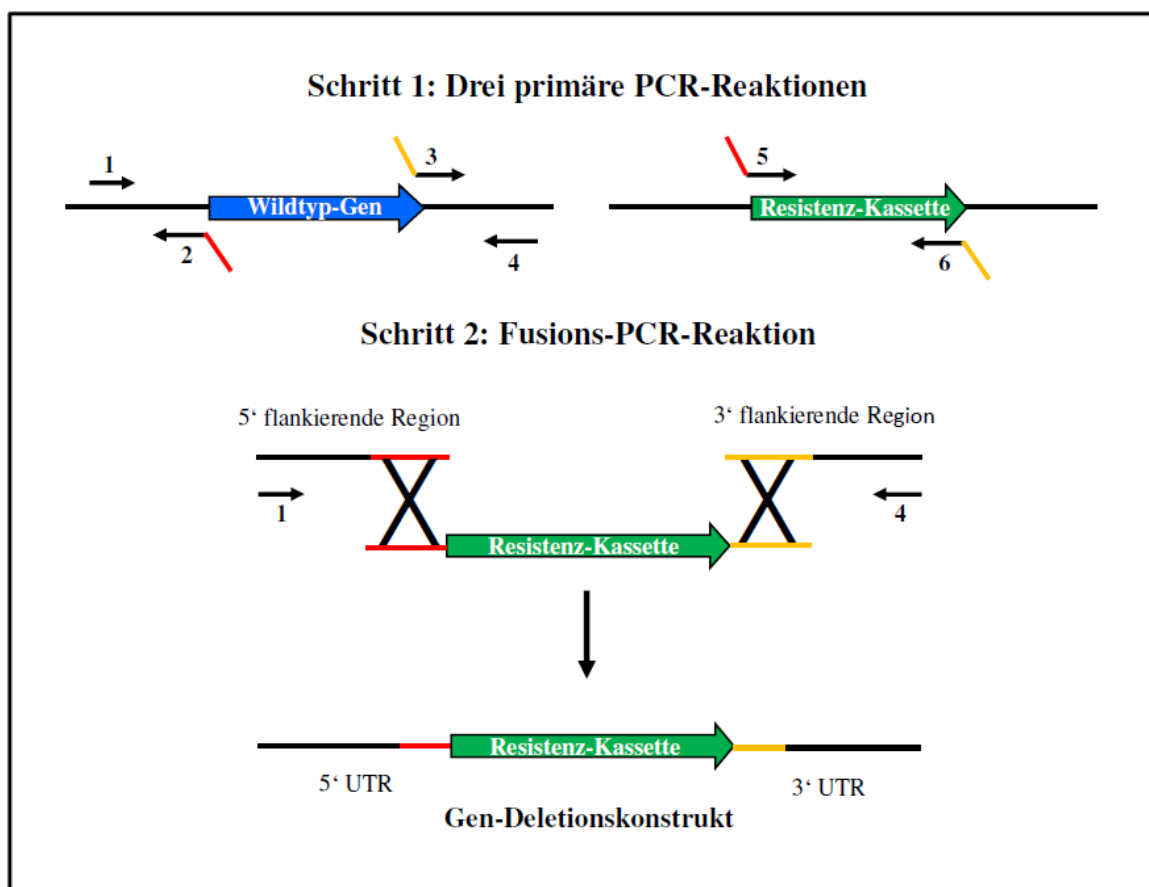


Abbildung 3.38: Schematische Darstellung des Prinzips der Fusions-PCR-Methode zur Konstruktion von Gen-Deletionskonstrukten.

Die Abbildung zeigt die beiden Schritte zur Herstellung eines Gen-Deletionskonstruktes mit der Fusions-PCR-Methode. In Schritt 1 werden über drei PCR-Reaktionen sowohl die 5'- und 3'-untranslatierten Regionen des Wildtyp-Gens (Oligonukleotide 1 bis 4) als auch eine Resistenz-Kassette amplifiziert (Oligonukleotide 5 und 6). Die Oligonukleotide 2 und 5 sowie 3 und 6 beinhalten zueinander komplementäre Sequenzen. Darüber können über die PCR in Schritt 2 die drei Fragmente fusioniert werden (Oligonukleotide 1 und 4).

3.4.4 Generierung der *PFPI*-Deletionsmutanten unter Verwendung der Fusions-PCR-Methode

Um die Deletion des *PFPI*-Gens zu ermöglichen, wurden nacheinander zwei verschiedene Fusionsfragmente konstruiert. Für beide Konstrukte wurde die kodierende Sequenz des Phleomycin-Gens aus *Streptoalloteichus hindustanus* (Drocourt *et al.*, 1990) unter der Kontrolle des *GPD*-Promotors sowie des *TRPC*-Terminators aus *A. nidulans* amplifiziert und für die Fusions-PCR eingesetzt. Als flankierende Sequenzen wurden auf der 5'-Seite des *PFPI*-Gens jeweils 1 kb des untranslatierten Bereiches stromaufwärts des Starttripletts amplifiziert. Auf der 3'-Seite unterschieden sich die beiden Fragmente. Für das Deletionskonstrukt I wurden 1,1 kb des Endbereiches der kodierenden *PFPI*-Gensequenz amplifiziert. Das Deletionskonstrukt II enthielt auch auf 3'-Seite keine kodierenden Sequenzbereiche mehr. Die Konstruktion der jeweiligen Fragmente ist in Abbildung 3.39 schematisch dargestellt. Die elektrophoretischen Auftrennungen der jeweiligen Amplifikationsprodukte der Einzel- und Fusionsfragmente, sowie die Verifizierungen der Fusionskonstrukte sind im Anhang in den Abbildungen 7.5.2.1 und 7.5.2.2 gezeigt. Die Deletionskonstrukte wurden am Tag der Transfektion amplifiziert, aus dem Agarosegel eluiert und in einer Menge von ca. 20 µg pro Transfektionsansatz eingesetzt.

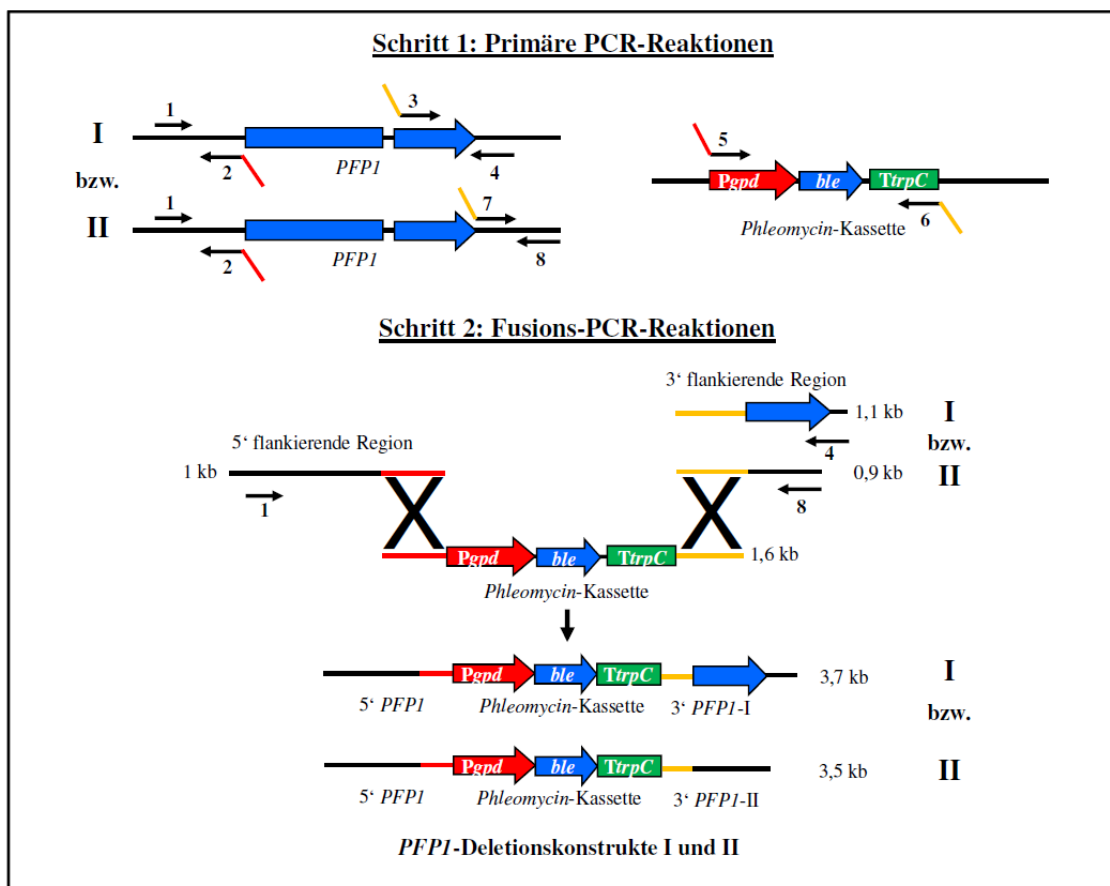


Abbildung 3.39

Abbildung 3.39: Schematische Darstellung der Amplifikationsschritte zur Herstellung der *PFPI*-Deletionskonstrukte.

Schritt 1 zeigt die Reaktionen zur Amplifikation der Resistenz-Kassette (Phleomycin) und der 5'- und 3' flankierenden Gensequenzen. In Schritt 2 sind die jeweiligen Fusions-PCR zusammengefasst. Je nach eingesetztem 3'-Fragment wurden entweder das Deletionskonstrukt I oder Deletionskonstrukt II amplifiziert.

1 bis 8 – Fusion-Primer1s, Fusion-Primer2as, Fusion-Primer3s, Fusion-Primer4as, Fusion-Primer5s, Fusion-Primer6as, Fusion-Primer7s und Fusion-Primer8as (#15, #16, #17, #18, #19, #20, #21, #22, #23).

In Tabelle 3.7 sind die Ergebnisse der drei durchgeführten Transfektionsansätze zusammengefasst. Trotz der sehr niedrigen Transfektionseffizienz in allen Versuchen konnten vier Deletionsmutanten generiert werden. Die durchschnittliche Effizienz für eine homologe Rekombination liegt damit bei 6.7%.

Arbeitsschritt	Zahl der Transformanden	Effizienz	Durchschnittswerte
Transfektion von <i>R. commune</i> (Selektion auf Phleomycin)	1. Transfektion 8/1x10 ⁷ P.	0,00008%	0,0003%
	2. Transfektion 34/2x10 ⁷ P.	0,00017%	
	3. Transfektion 64/1x10 ⁷ P.	0,00064%	
Identifikation der Deletionsmutanten	1. Transfektion 1/8	12,5%	6,7%
	2. Transfektion 2/34	5,9%	
	3. Transfektion 1/64	1,6%	

Tabelle 3.7: Zusammenfassung und Auswertung der Protoplasten-Transfektion mittels Fusions-PCR-Konstrukt zur Generierung der *PFPI*-Deletionsmutanten von *R. commune*.

3.4.5 Nachweis der Deletionsereignisse

3.4.5.1 PCR-Analysen

Die Identifizierung der *PFPI*-Deletionsmutanten erfolgte zunächst durch ein umfassendes PCR-Screening aller Transformanden. Aus den auf Agarplatten angezogenen Kolonien wurde genomische DNA isoliert und die deletierten Bereiche des *PFPI*-Gens und die Phleomycin-Resistenz-Kassette durch PCR überprüft (Mutanten-Analysen I und II, Abb. 3.40). Konnten potentielle Deletionsmutanten identifiziert werden, wurden schließlich Amplifikationsreaktionen auf die Integrationsstellen des Deletionskonstrukts im Genom durchgeführt (Mutanten-Analyse III). Dabei wurden die Oligonukleotide so positioniert, dass ihre jeweiligen Bindungsstellen auf 5'- bzw. 3'-Seite in den *PFPI*-Wildtyp-Sequenzen und in der Phleomycin-Resistenz-Kassette lagen (Abb. 3.40c). Dieses PCR-Fragment konnte demzufolge nur als Folge einer homologen Rekombination amplifiziert werden. Wie die Abbildung 3.40 zeigt, konnten so vier *PFPI*-Deletionsmutanten identifiziert werden. Die PCR-Fragmente der 5'- und 3'-Integrationsstellen wurden zusätzlich sequenziert.

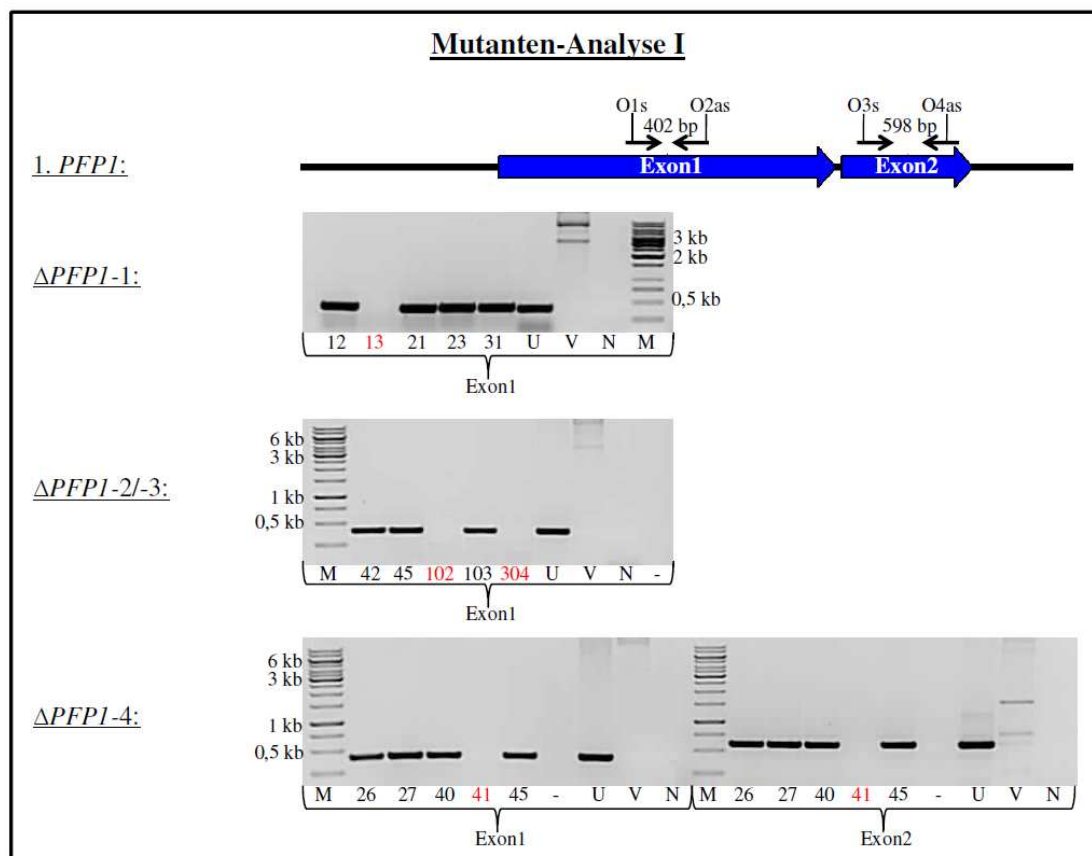


Abbildung 3.40a

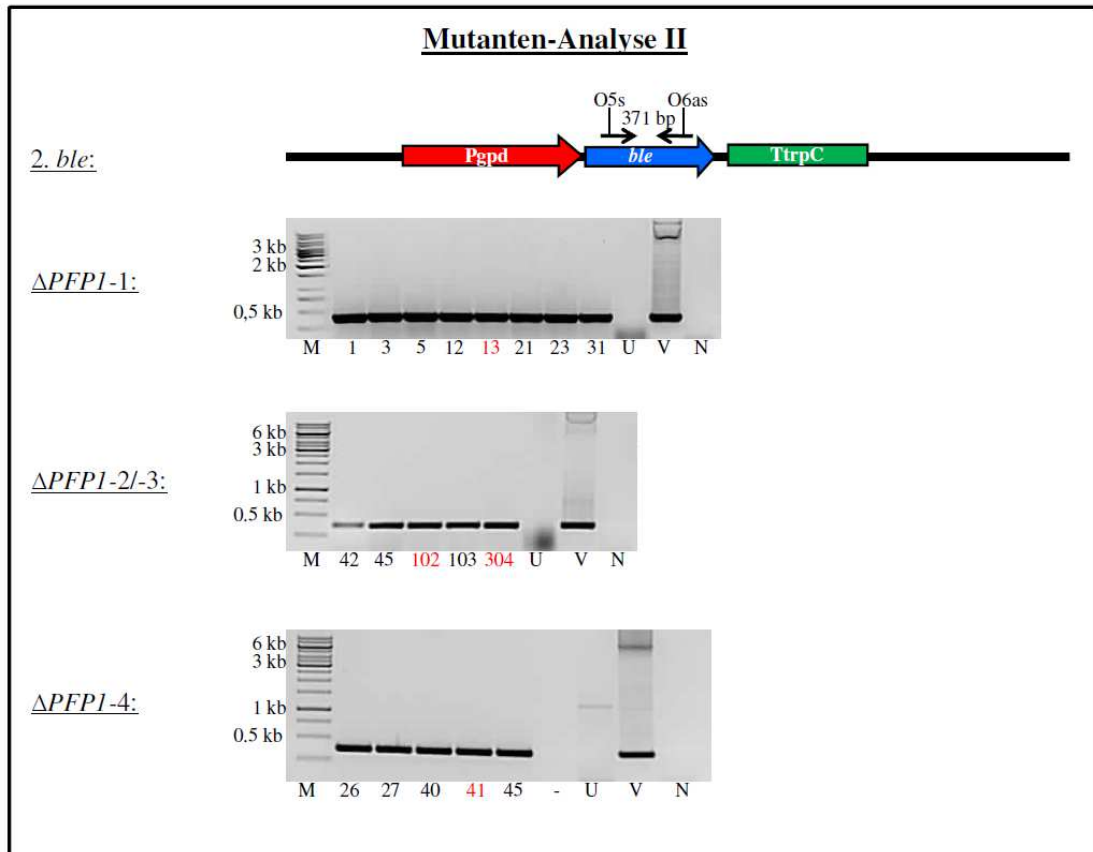


Abbildung 3.40b

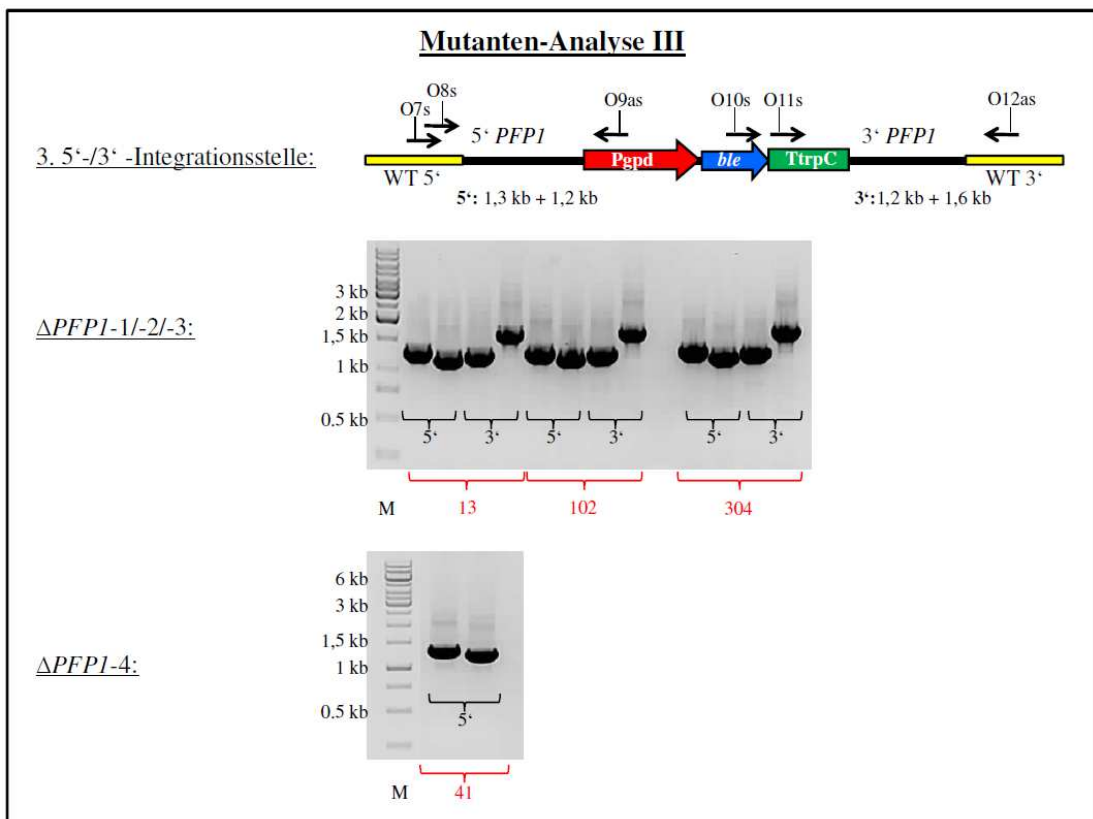


Abbildung 3.40c

Abbildung 3.40: Schematische Darstellungen sowie gelelektrophoretische Auftrennungen der Amplifikationsreaktionen zur Identifizierung der *PFPI*-Deletionsmutanten.

Die Abbildungen 3.40a – c zeigen die mittels PCR durchgeführten Mutanten-Analysen I bis III. Die PCR wurden auf die deletierten *PFPI*-Gensequenzen (3.40a), die Phleomycin-Resistenz-Kassette (3.40b) und die 5'- bzw. 3'-Integrationsstellen (3.40c) durchgeführt. Die dafür verwendeten Oligonukleotide sowie deren Bindungsstellen sind durch waagerechte schwarze Pfeile dargestellt (O1s – O12as). Die jeweils getesteten Transformanden sind mit Nummern bezeichnet. *PFPI*-Deletionsmutanten sind rot markiert. Bei der Mutante $\Delta PFPI$ -4 (Nr. 41) wurde zusätzlich eine PCR auf das zweite Exon durchgeführt, um das Fehlen sämtlicher kodierender Sequenzen zu überprüfen. Die Integrationsstelle konnte hier nur auf 5'-Seite nachgewiesen werden, da auf 3'-Seite die gesamte bekannte Gensequenz für die Herstellung des Deletionskonstruktes (II) genutzt wurde. Für jede PCR wurde genomische DNA von UK7 (U) sowie der Deletionsvektor (V) als Kontrollen mitgeführt. Die Negativkontrolle der PCR enthielt keine Matrizen-DNA (N). Als Größenstandard wurde ein 1 kb DNA-Marker eingesetzt (M).

O1s und O2as – PFP3s und PFP2as (#51/#52); O3s und O4as – PFP27s und Fusion-Primer4as (#64/#18); O5s und O6as – pSS2-ble3s und pSS2-ble4as (#76/#77); O7s/O8s und O9as - 5'-Int1s/5'-Int3s und 5'-Int2as (#4, #5/#6); O10s/O11s und O12as – 3'-Int1s/3'-Int3s und 3'-Int4as (#1, #2/#3).

P_{gpd} – Promotorsequenz der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *A. nidulans*; *ble* – kodierende Sequenz des Phleomycin-Gens aus *Streptoalloteichus hindustanus*; T_{trpC} – Terminatorsequenz des *TRPC*-Gens aus *A. nidulans*; WT5' bzw. WT3' – Wildtyp-Sequenzen des *PFPI*-Gens, welche nicht für die Herstellung des Deletionskonstrukts verwendet und folglich bei einer homologen Rekombination nicht ausgetauscht wurden.

3.4.5.2 DNA-Hybridisierungen

Nachdem die vier *PFPI*-Deletionsmutanten erfolgreich durch PCR und Sequenzierungen identifiziert werden konnten, sollten diese Ergebnisse ebenfalls durch DNA-Hybridisierungen verifiziert werden. Dafür wurde zunächst Myzel der vier Deletionsmutanten und des Wildtyps UK7 angezogen. Zusätzlich dazu wurden noch drei Transformanden ausgewählt, in denen sowohl das Wildtyp-Gen als auch die Phleomycin-Kassette zuvor per PCR nachgewiesen werden konnten; Mutanten also, die zwar transfiziert worden waren, in denen aber keine homologe Rekombination stattgefunden hatte.

Aus dem Pilzmyzel wurde genomische DNA isoliert und jeweils 15 µg davon für eine Restriktion über Nacht verwendet. Als Restriktionsenzym wurde *Bst*BI ausgewählt, welches in der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz fünf Erkennungsstellen besitzt. Bei den $\Delta PFPI$ -Mutanten liegen diese sowohl in den deletierten als auch in den Wildtyp-Genbereichen (vgl. Abb. 3.42). Als Positivkontrollen wurden die *PFPI*-Deletionskonstrukte I und II genutzt, die jeweils in den Vektor pCR2.1 kloniert wurden (pCR2.1- $\Delta PFPI$ -I/-II; Abb. 3.43). Drei Mikrogramm der beiden Vektor-Konstrukte wurden ebenfalls über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Xho*I linearisiert. Für die Sonden-Herstellung wurden zwei unterschiedliche Fragmente genutzt. Sonde 1 umfasst 1020 bp des 5'-untranslatierten

Bereiches des *PFPI*-Gens. Als Sonde 2 wurde ein 402 bp großes Fragment aus dem Bereich des ersten Exons der *PFPI*-Gensequenz genutzt (*PFPI*-E1; vgl. Abb. 3.42a). Die Sonde 1 wurde aus dem Vektor-Konstrukt pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI extrahiert (vgl. Abb. 3.4b). Sonde 2 wurde durch PCR auf die genomische DNA des Wildtyp-Isolats UK7 amplifiziert (vgl. Abb. 3.43a). Die nachfolgende radioaktive Markierung der beiden DNA-Fragmente erfolgte mit α -[³²P]-dATP.

Die restrigierte genomische DNA aller Pilztransformanden und die linearisierten Vektoren der beiden Positivkontrollen wurden in identischer Reihenfolge auf zwei 1%ige Agarosegele geladen. Zusätzlich wurde jeweils ein Teil des nicht für die radioaktive Markierung genutzten Restriktionsansatzes bzw. PCR-Ansatzes der Sonden 1 und 2 mit aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 30 V (vgl. Abb. 7.5.3). Der Transfer der DNA auf jeweils eine positiv geladene Nylon-Membran wurde mittels Vakuum-Blot-Apparatur durchgeführt. Membran 1 wurde im Anschluss mit Sonde 1, Membran 2 mit Sonde 2 bei 60°C über Nacht hybridisiert. Die nach der Markierung aufgelegten Phosphor-Screens wurden nach fünfstündiger Inkubationszeit mittels Typhoon[®]-Scanner entwickelt. Die Resultate zeigt die Abbildung 3.41.

Phosphor-Screen 1 zeigt die Markierung mit Sonde 1 (*PFPI*-5'-UTR). Der 5'-untranslatierte Bereich der *PFPI*-Gensequenz ist sowohl im Wildtyp (UK7) und den Deletionsmutanten (Δ *PFPI*-1 bis -4) als auch in den Transformanden mit ektopischen Integrationen der Deletionskonstrukte (T1-3) nachweisbar (Abb. 3.41a). Demzufolge können in jeder Spur Banden unterschiedlicher Größen identifiziert werden, ausgenommen die Spur S2, welche den PCR-Ansatz der Sonde 2 trägt. Die genauen Bindungsstellen der genutzten Sonden in der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz und den Deletionskonstrukten I und II sowie die daraus resultierenden Größen der markierten Fragmente sind in Abbildung 3.42 dargestellt. Im Wildtyp wird durch die Sonde 1 ein Fragment der Größe 2153 bp markiert. Dieses ist erwartungsgemäß auch in den Transformanden mit ektopischen Integrationen zu finden, nicht aber in den Deletionsmutanten. Hier lässt sich eine Größenverschiebung der markierten Fragmente auf 3148 bp (Deletionskonstrukt I bzw. Δ *PFPI*-1 bis-3) bzw. über 6000 bp (Deletionskonstrukt II bzw. Δ *PFPI*-4) nachweisen. Interessanterweise zeigt die Deletionsmutante Δ *PFPI*-2 zusätzlich zur homologen Rekombination eine zweite Integration des Deletionskonstrukts an anderer Stelle im Genom, angezeigt durch eine zweite Bande bei ca. 4000 bp.

Die zweite Membran wurde mit Sonde 2 (*PFPI*-E1) hybridisiert. Diese bindet in den deletierten Bereichen des *PFPI*-Gens und markiert ein DNA-Fragment von 1861 bp. Der zugehörige Phosphor-Screen 2 zeigt daher nur Banden im Wildtyp und den Transformanden, in denen keine homologe Rekombination stattgefunden hat.

Mit der Fusions-PCR-Methode gelang es, in drei aufeinanderfolgenden Transfektionsversuchen vier *PFPI*-Deletionsmutanten herzustellen. Für die ersten beiden Transfektionen wurde jeweils das Deletionskonstrukt I eingesetzt. Die so generierten Deletionsmutanten $\Delta PFPI-1$, $\Delta PFPI-2$ und $\Delta PFPI-3$ enthielten somit noch einen Teil der kodierenden Sequenz des zweiten Exons. Für die dritte Transfektion wurde das Deletionskonstrukt II eingesetzt. Die daraus resultierende Mutante $\Delta PFPI-4$ enthielt damit nur noch die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche des *PFPI*-Gens.

Alle *PFPI*-Deletionsmutanten konnten zunächst per PCR und Sequenzierung identifiziert sowie durch DNA-Hybridisierungen (*Southern*-Analysen) verifiziert werden.

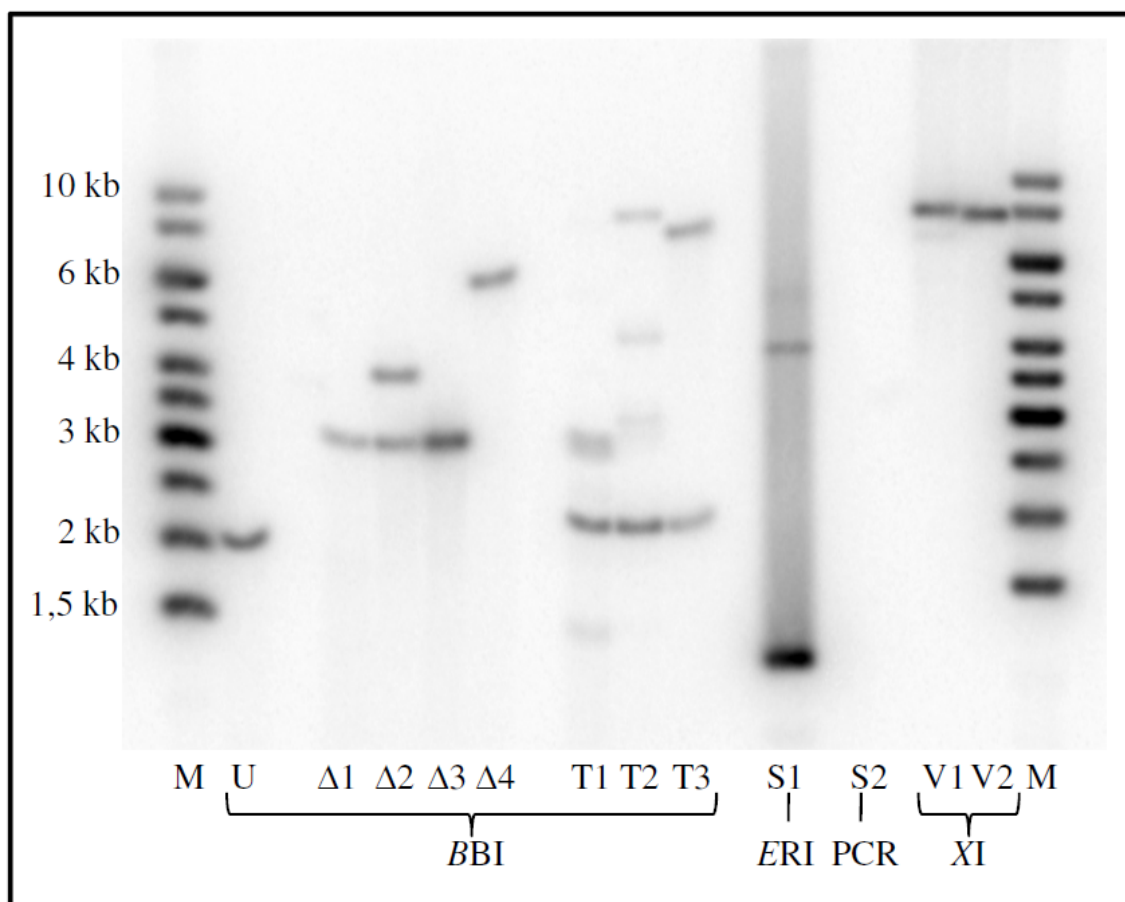


Abbildung 3.41a: Phosphor-Screen 1: Ergebnis der DNA-Hybridisierung unter Verwendung der Sonde 1 (*PFPI*-5'-UTR).

Die Abbildung zeigt die radioaktive Markierung der mit *Bst*BI (*BBI*) restrigierten genomischen DNA des Wildtyps UK7 (U), der vier $\Delta PFPI$ -Deletionsmutanten ($\Delta 1$ - $\Delta 4$) und der drei Transformanten mit ektopischen Integrationen der Deletionskonstrukte (T1-T3) unter Verwendung der Sonde 1 (*PFPI*-5'-UTR). Als Positivkontrollen dienen das mit *Eco*RI (*ERI*) restrigierte Vektor-Konstrukt pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR in einer 1:100-Verdünnung (S1) sowie die mit *Xho*I (*XI*) linearisierten Vektoren, die die Deletionskonstrukte I und II enthalten (pCR2.1- $\Delta PFPI$ -I/-II; V1/V2), 1:1000 verdünnt. Als Größenstandard wurde eine 1 kb-DNA-Leiter verwendet (M).

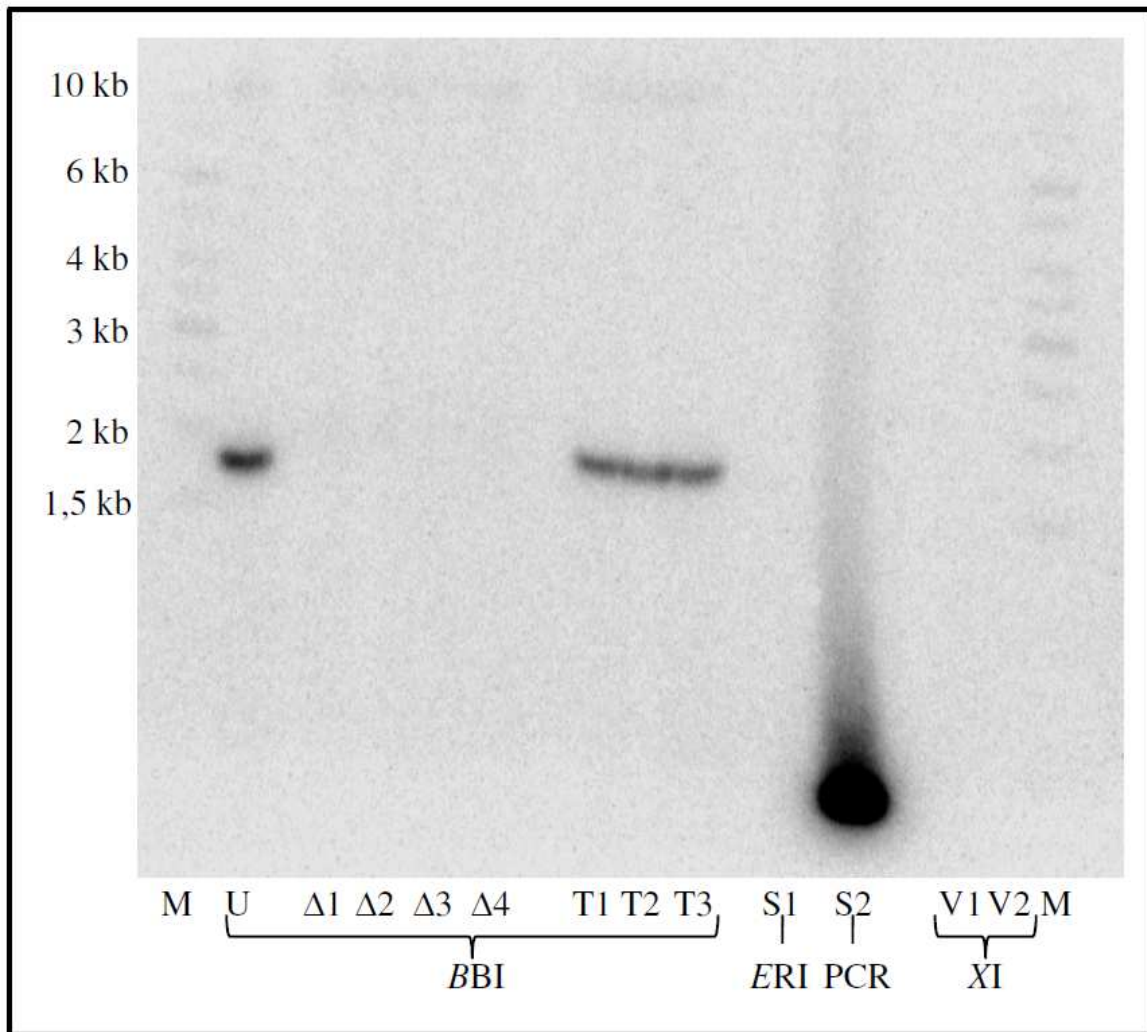


Abbildung 3.41b: Phosphor-Screen 2: Ergebnis des DNA-Hybridisierung unter Verwendung der Sonde 2 (*PFPI*-Exon1).

Die Abbildung zeigt die Markierung der mit *Bst*BI (*BBI*) restrigierten genomischen DNA des Wildtyps UK7 (U) und der drei Transformanden mit ektopischen Integrationen der Deletionskonstrukte (T1–T3) unter Verwendung der Sonde 2 (*PFPI*-E1). Die vier Δ *PFPI*-Deletionsmutanten (Δ 1– Δ 4) zeigen keine Markierung, da die Sequenzen deletiert wurden. Als Positivkontrolle dient der 1:500 verdünnte PCR-Ansatz auf die Sonde 2 (*PFPI*-E1, S2). Größenstandard: 1 kb-DNA-Leiter (M).

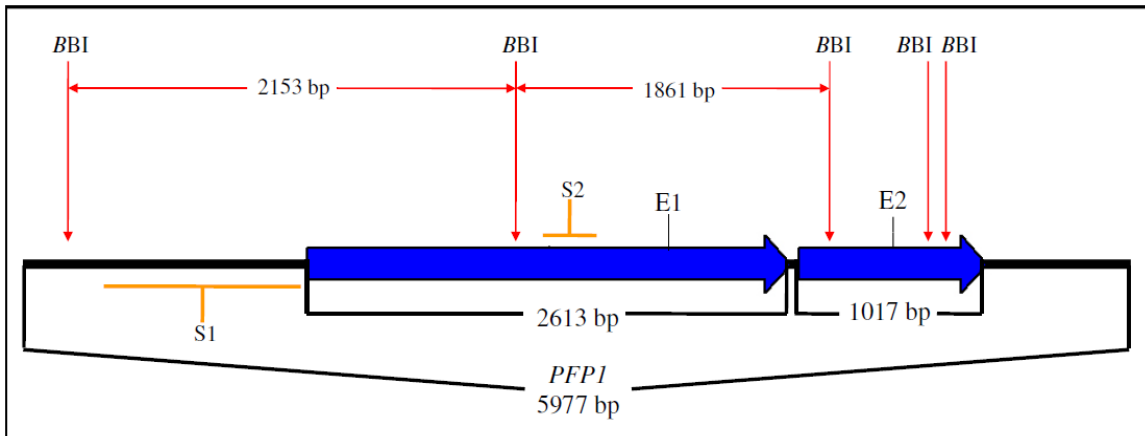


Abbildung 3.42a

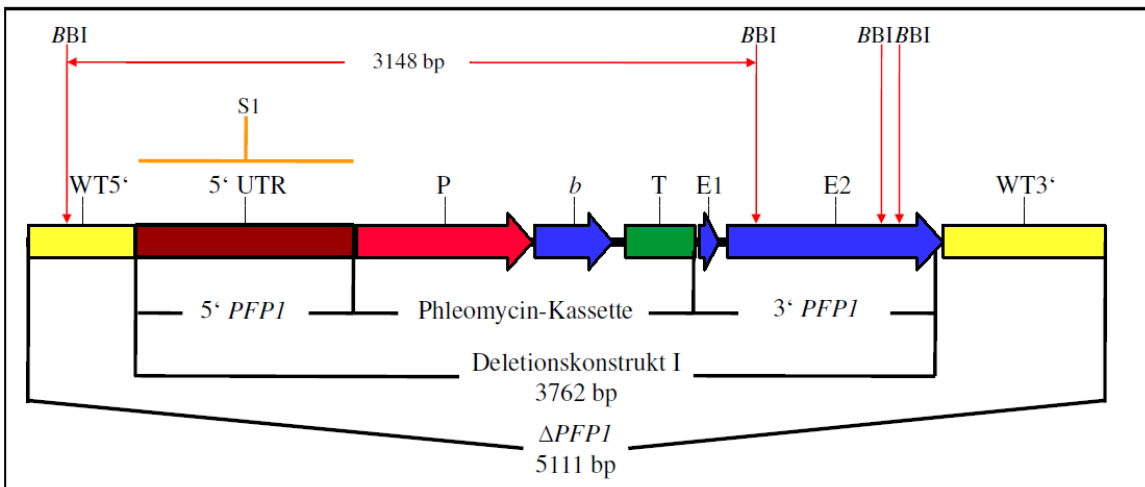


Abbildung 3.42b

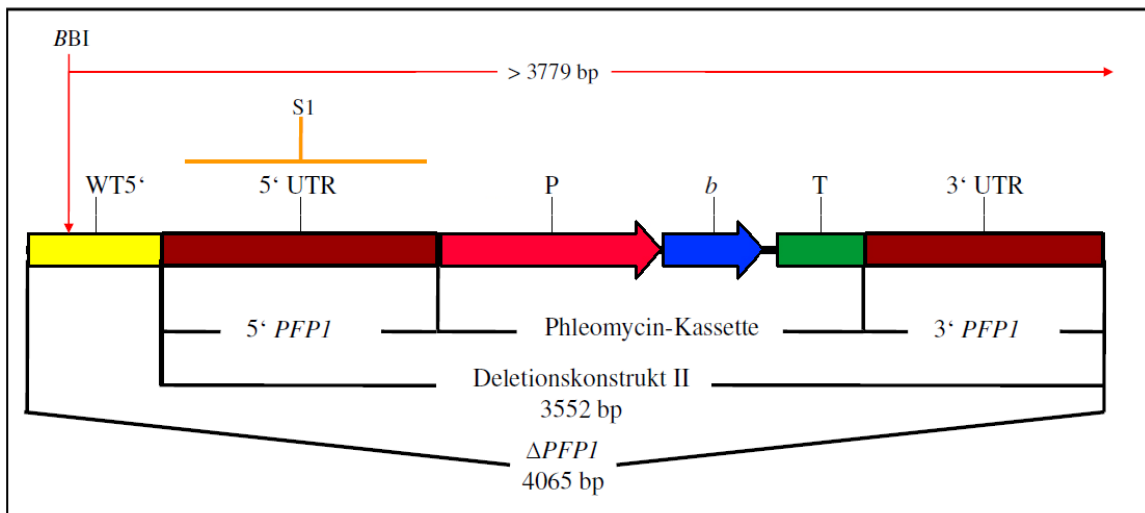


Abbildung 3.42c

Abbildung 3.42: Schematische Darstellungen der Bindungsstellen der für die DNA-Hybridisierung verwendeten Sonden 1 und 2 sowie der *Bst*BI-Restriktionsstellen im *PFPI*-Wildtyp-Gen und den Deletionskonstrukten I und II.

Die Abbildungen zeigen sowohl die Positionen der Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym *Bst*BI (*BBI*) sowie die Bindungsstellen der verwendeten Sonden 1 und 2 (*S1/2*) in der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz (3.42a) bzw. den Δ *PFPI*-Mutanten (Deletionskonstrukte I und II; 3.42b&c). Im Wildtyp und den heterolog rekombinanten Pilz-Transformanden kann mit beiden Sonden jeweils ein Fragment nachgewiesen werden (Sonde 1 – 2153 bp; Sonde 2 – 1861 bp). Die *PFPI*-Deletionsmutanten werden nur durch Sonde 1 markiert, da Sonde 2 in den deletierten Bereichen der Gensequenz bindet. Für die Mutanten Δ *PFPI*-1 bis -3 umfasst das Fragment eine Größe von 3148 bp, da für deren Generierung das Deletionskonstrukt I verwendet wurde. Die Deletionsmutante Δ *PFPI*-4 enthält keine kodierenden Sequenzbereiche mehr. Das erwartete markierte DNA-Fragment muss somit größer als 3779 bp sein, da die bekannte Gensequenz keine weitere *Bst*BI-Schnittstelle mehr aufweist (vgl. Abb. 3.41a, Δ 4).

E1/E2 – Exon1 und Exon2 der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz; WT5'/WT3' – 5'- bzw. 3'-Wildtyp-Sequenzen, die nicht zum jeweiligen Deletionskonstrukt gehören; 5'/3' UTR – 5'- bzw. 3'-untranslatierte Region; P – P_{gpd} (Promotorsequenz Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase *A. nidulans*); *b* – *ble* (Phleomycin-Gen); T – T_{trpC} (Terminatorsequenz *TRPC*-Gen *A. nidulans*)

Abbildung 3.43: Schematische Darstellungen der PCR zur Generierung der Sonde 2 (*PFPI*-E1) sowie der Vektor-Konstrukte pCR2.1- Δ *PFPI*-I bzw. -II).

Die Abbildung 3.43a zeigt die Bindungsstellen der Oligonukleotide (O1s/O2as) in der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz, die für die Amplifikation der Sonde 2 (*S2*) verwendet wurden. E1 und E2 bezeichnen die beiden Exons der kodierenden *PFPI*-Sequenz.

O1s und O2as – PFP3s und PFP2as (#52/#51)

In den Abbildungen 3.43b und c sind jeweils die als Positivkontrollen eingesetzten Vektor-Konstrukte pCR2.1- Δ *PFPI*-I (b, 7691 bp) bzw. -II (c, 7481 bp) dargestellt. Beide Vektoren wurden für die DNA-Hybridisierung mit dem Restriktionsenzym *Xho*I (XI) linearisiert und als Kontrollen für die radioaktive Markierung genutzt.

P – P_{gpd} (Promotorsequenz Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase *A. nidulans*); *b* – *ble* (Phleomycin-Gen); T – T_{trpC} (Terminatorsequenz *TRPC*-Gen *A. nidulans*); 5'-UTR/3'-UTR – 5'- bzw. 3'-untranslatierter Bereich der *PFPI*-Gensequenz

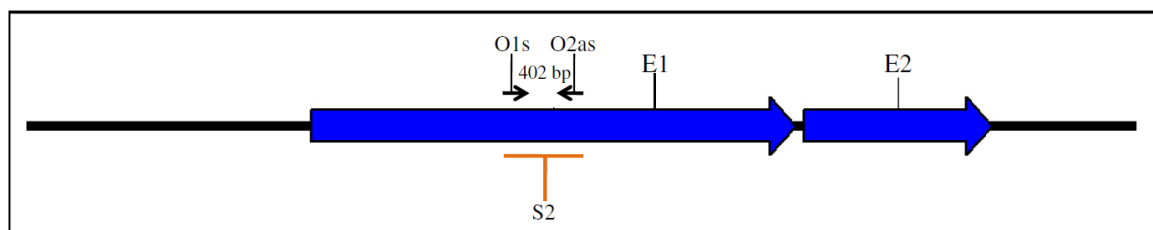


Abbildung 3.43a

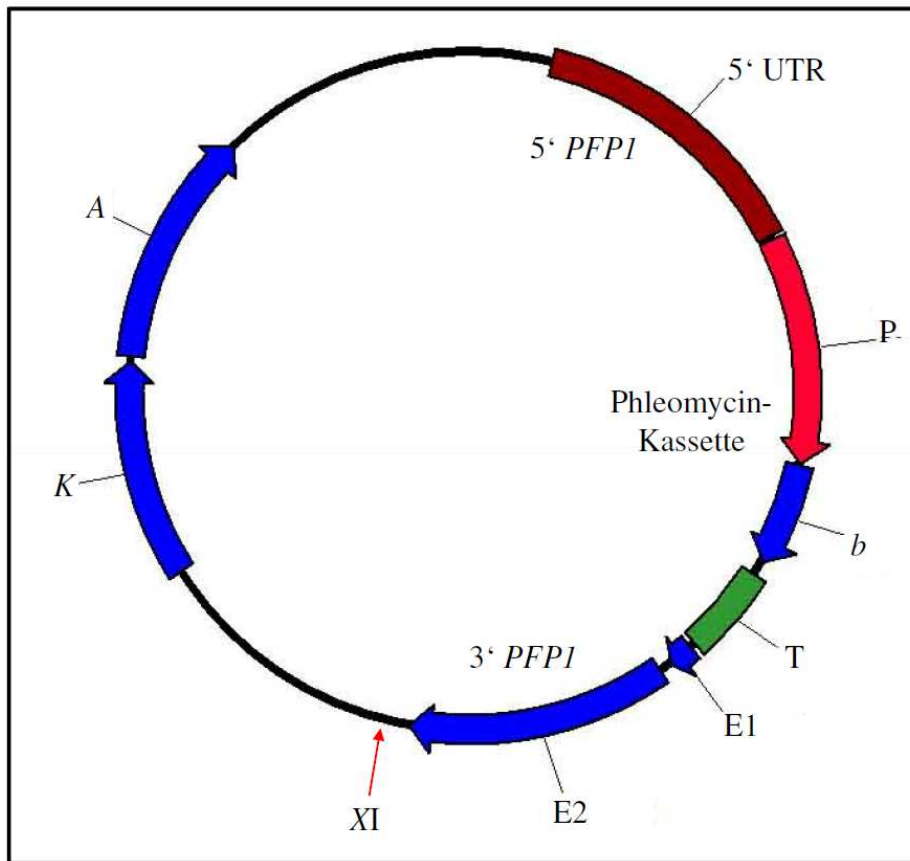


Abbildung 3.43b

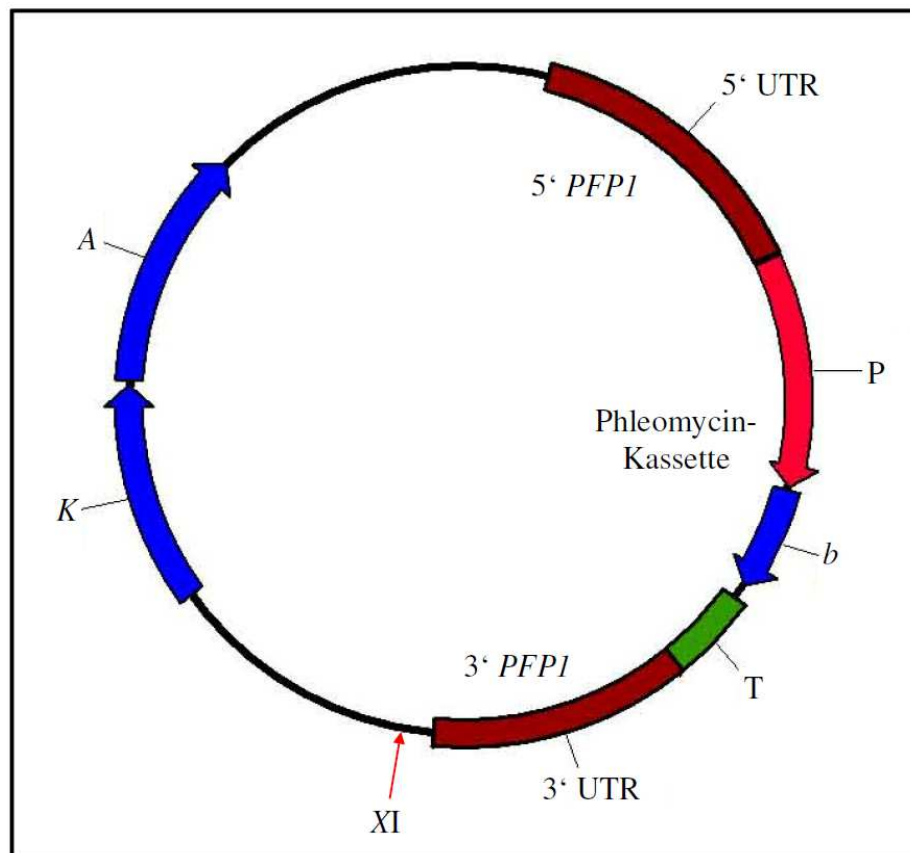


Abbildung 3.43c

3.4.5.3 Überprüfung der *PFPI*-Expression in den Deletionsmutanten

Nachdem die $\Delta PFPI$ -Mutanten identifiziert und verifiziert werden konnten, sollte in nachfolgenden Analysen zunächst die Genexpression überprüft werden. Chronologisch wurden während dieser Arbeit die Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1 bis -3 zuerst identifiziert. Dafür wurde das durch die Fusions-PCR-Methode erstellte Deletionskonstrukt I verwendet. In zwei aufeinanderfolgenden Transfektionsansätzen konnten dabei die ersten drei Mutanten generiert werden. Für die Überprüfung der *PFPI*-Genexpression in diesen Mutanten wurde Gesamt-RNA aus dem Myzel isoliert und in komplementäre DNA transkribiert. Diese cDNA wurde für eine Multiplex-PCR eingesetzt, in der sowohl *PFPI* als auch α -Tubulin (*α -TUB*), als konstitutiv exprimiertes Gen, amplifiziert werden konnten. Für *PFPI* wurden dafür zunächst Oligonukleotide eingesetzt, die im Bereich des zweiten Exons der kodierenden Gensequenz binden (vgl. Abb. 3.44a O3s/O4as). Das Ergebnis dieser PCR ist in Abbildung 3.44b gezeigt. Neben den drei $\Delta PFPI$ -Mutanten wurde zusätzlich cDNA des Wildtyps UK7 eingesetzt. Sowohl *α -TUB* als auch das zweite Exon von *PFPI* konnten im Wildtyp aber auch in den Mutanten amplifiziert werden. Dieses Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, da aufgrund der *PFPI*-Deletion keine mRNA und damit auch keine cDNA des Gens in den Mutanten nachweisbar sein sollte. Durch eine *in-silico*-Analyse der Sequenz der Integrationsstelle des Deletionskonstrukts konnte ein offener Leserahmen von 939 bp im noch vorhandenen zweiten Exon der *PFPI*-Sequenz identifiziert werden. Dieser konnte scheinbar trotz der fast vollständigen Deletion des ersten Exons noch transkribiert und durch die gewählte Position der Oligonukleotide nachgewiesen werden (Abb. 3.45). In der darauf folgenden zweiten Multiplex-PCR wurden deshalb neben den vorher genutzten Oligonukleotiden für *α -TUB* neue *Primer* für *PFPI* eingesetzt. Diese binden im ersten Exon der *PFPI*-Gensequenz (Abb. 3.44a). Wie in Abbildung 3.44b zu sehen, konnten hier nur eine Bande für *PFPI* in der cDNA des Wildtyps nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass in den Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1 bis -3 anscheinend nur die Region des zweiten Exons transkribiert wird. Die Translation eines voll funktionsfähigen Proteins wurde allerdings nicht angenommen, da es sich nur um einen Teilbereich der Gensequenz handelte. Ein Nachweis konnte darüber jedoch nicht erfolgen, da zu diesem Zeitpunkt kein Antikörper gegen Pfp1 zur Verfügung stand.

Aus diesem Grund wurde eine vierte $\Delta PFPI$ -Mutante generiert. Hierfür wurde per Fusions-PCR das bereits oben erwähnte Deletionskonstrukt II erstellt, welches keine kodierenden Bereiche der *PFPI*-Sequenz mehr enthält. In der zugehörigen *PFPI*-Deletionsmutante sollte somit keine mRNA des Gens mehr transkribiert werden. Das Ergebnis der durchgeführten semiquantitativen PCR der $\Delta PFPI$ -Mutanten 1, 3 und 4 sowie des Wildtyps UK7 ist in Abbildung 3.46b gezeigt. In diesem Fall wurde keine Multiplex-PCR durchgeführt. Alle PCR wurden einzeln auf dieselbe cDNA pipettiert. Als konstitutiv exprimiertes Gen wurde *GPD* aus *R. commune* amplifiziert. Für *PFPI* wurden

zwei verschiedene *Primer*-Paare genutzt (vgl. Abb. 3.46a). *Primer*-Paar 1 bindet im ersten, *Primer*-Paar 2 im zweiten Exon der *PFPI*-Gensequenz. Wie erwartet zeigen die *PFPI*-Deletionsmutanten 1 und 3 keine Banden in der PCR des ersten Exons, dafür jeweils in der *GPD*-PCR sowie des zweiten Exons. Ausschließlich in Δ *PFPI*-4 kann keine Bande in der PCR des zweiten Exons der Gensequenz nachgewiesen werden (Abb. 3.46b). In dieser Deletionsmutante wird demnach keine *PFPI*-mRNA mehr transkribiert.

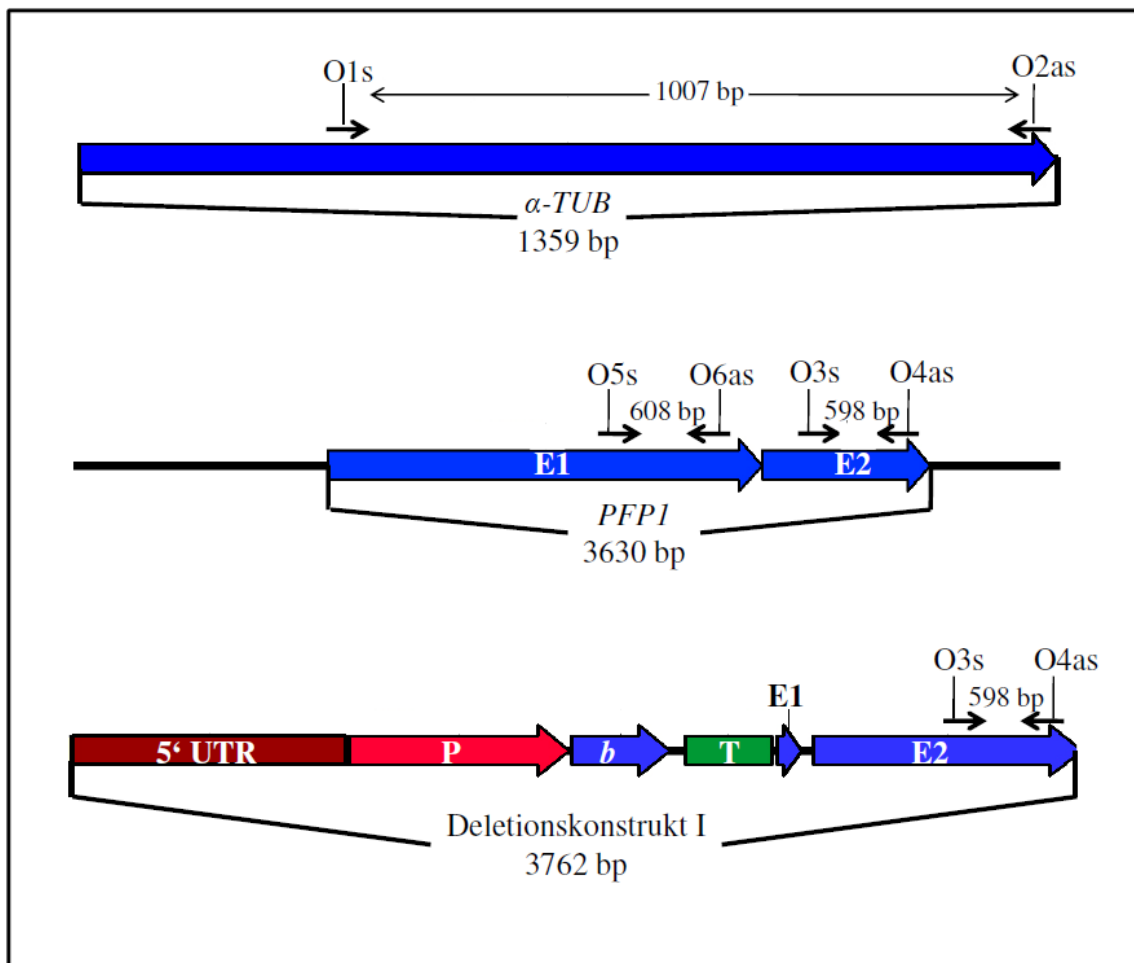


Abbildung 3.44a

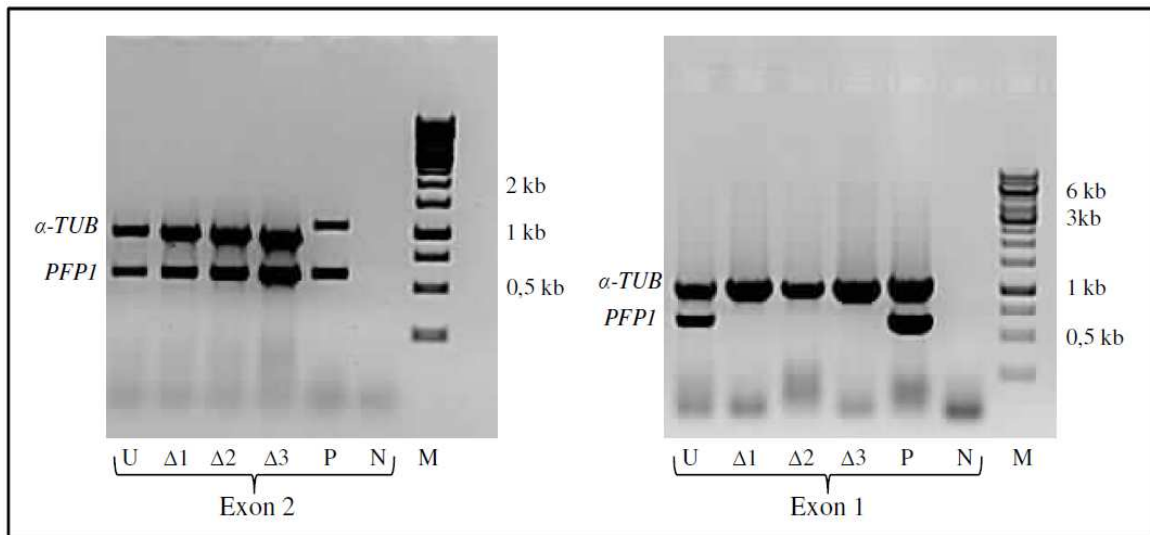


Abbildung 3.44b

Abbildung 3.44: Schematische Darstellungen der kodierenden Genabschnitte von *α-TUB*, *PFPI* und des Deletionskonstrukts I mit den vorhandenen Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide sowie der gelelektrophoretischen Auftrennung der entsprechenden Multiplex-PCR-Ansätze.

Die Abbildung 3.44a zeigt schematisch die kodierenden Genabschnitte von *α-TUB* und *PFPI* (blaue Pfeile), sowie die Struktur des für die $\Delta PFPI$ -1, -2 und -3 verwendeten Deletionskonstrukts I. Die Bindungsstellen der für die Multiplex-PCR genutzten Oligonukleotide (O1s bis O6as) sind mit waagerechten schwarzen Pfeilen dargestellt. Die für *PFPI* verwendeten Oligonukleotide PFP27s und Fusion-Primer4as (O3s und O4as) binden im zweiten Exon der Gensequenz und damit auch bei vorhandener *PFPI*-Expression im Deletionskonstrukt der $\Delta PFPI$ -Mutanten.

In der Abbildung 3.44b sind die gelelektrophoretischen Auftrennungen der beiden durchgeführten Multiplex-PCR zum Nachweis der *PFPI*-Genexpression im Wildtyp UK7 (U) und den $\Delta PFPI$ -Mutanten 1, 2 und 3 ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$) gezeigt. Als Positivkontrolle (P) der PCR wurde genomische DNA des Wildtyps verwendet. Die Negativkontrolle (N) der PCR enthält keine DNA als Matrize. Links im Bild ist die Multiplex-PCR auf *α-TUB* und das zweite Exon der *PFPI*-Gensequenz gezeigt. Alle Deletionsmutanten zeigen eine Expression des amplifizierten *PFPI*-Genabschnitts. Rechts im Bild ist die PCR auf das erste Exon der *PFPI*-Gensequenz dargestellt. Der deletierte Bereich wird in den Mutanten nicht exprimiert.

O1s und O2as – atu3s und atu2as (#7/#8); O3s und O4as – PFP27s und Fusion-Primer4as (#64/#18); O5s und O6as – PFP46s und PFP47as (#68/#69); M – 1 kb Größenstandard

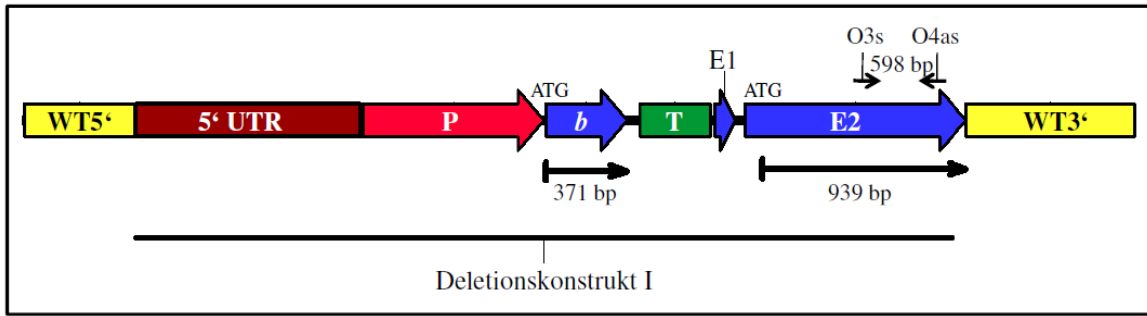


Abbildung 3.45: Schematische Darstellung der Integrationsstelle des Deletionskonstrukts I nach homologer Rekombination der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz.

Die Abbildung zeigt das verwendete Deletionskonstrukt I nach Austausch mit der *PFPI*-Wildtyp-Sequenz. Die rechtsgerichteten schwarzen Pfeile zeigen die beiden offenen Leserahmen (ORF) in der Sequenz an. Mit 371 bp gekennzeichnet ist die kodierende Sequenz der Phleomycin-Kassette. Durch eine Leserahmen-Verschiebung während der Integration des Deletionskonstrukts entsteht ein zweiter ORF im noch vorhandenen zweiten Exon der *PFPI*-Sequenz (939 bp). Die kurze Sequenz vor dem Start-ATG reicht offenbar aus, um die Transkription der Sequenz zu regulieren. Durch die Position der Oligonukleotide O3s und O4as kann der Bereich per PCR nachgewiesen werden.

O3s und O4as – PFP27s und Fusion-Primer4as (#64/#18)

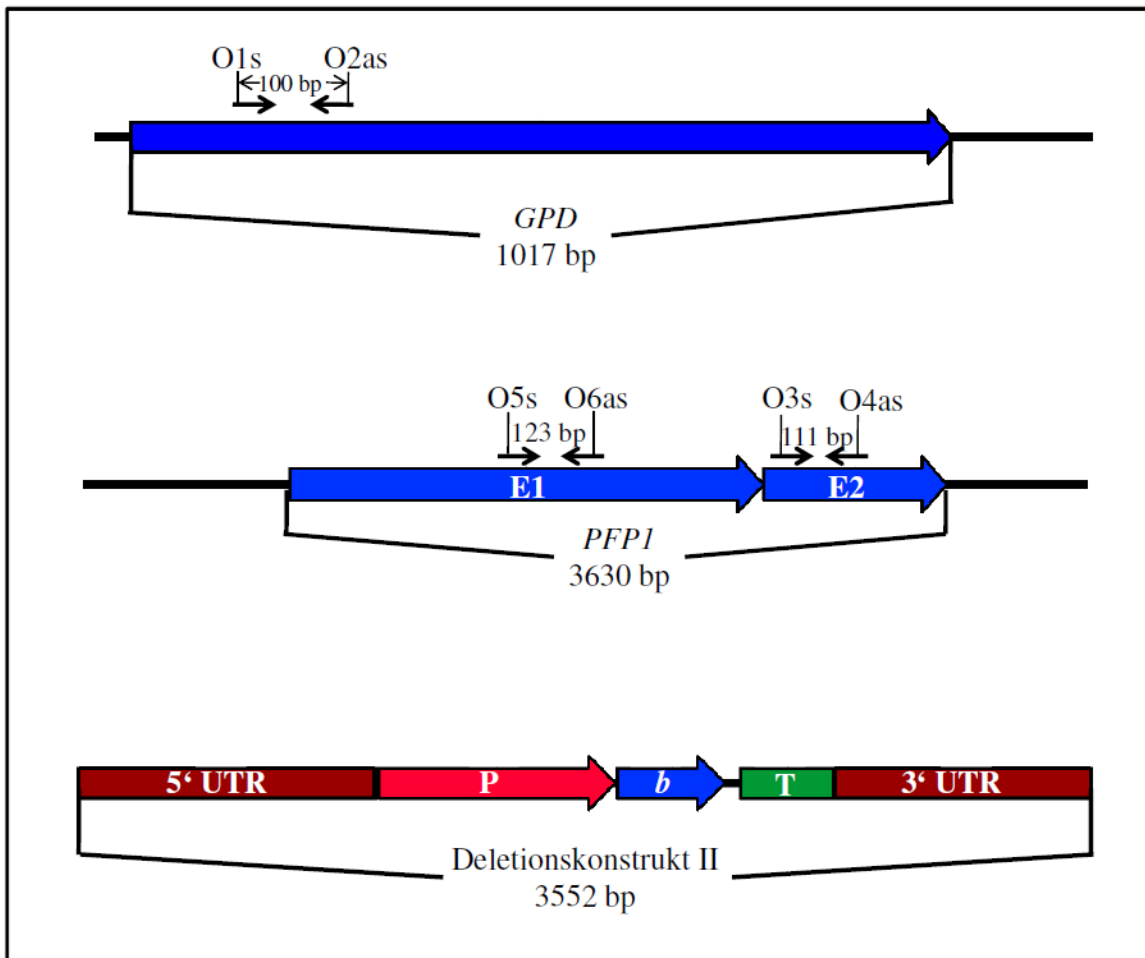


Abbildung 3.46a

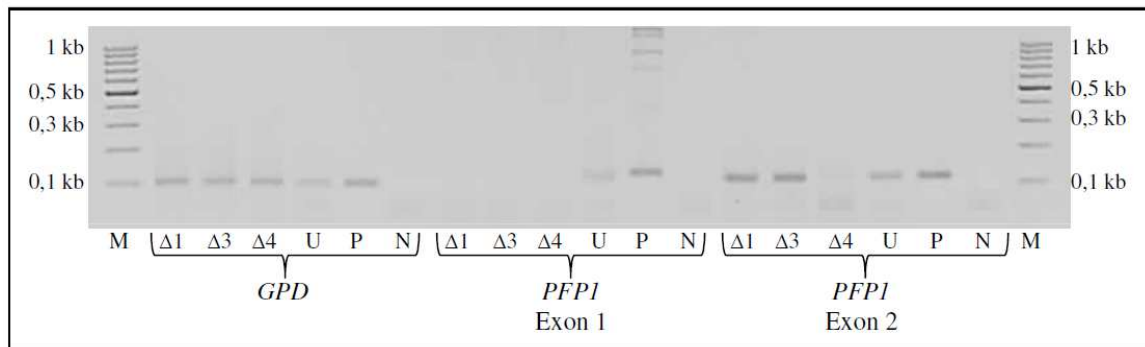


Abbildung 3.46b

Abbildung 3.46: Schematische Darstellungen der kodierenden Genabschnitte von *GPD*, *PFPI* und des Deletionskonstrukts II mit den vorhandenen Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide sowie der gelelektrophoretischen Auftrennung der entsprechenden PCR-Ansätze.

Abbildung 3.46a zeigt die kodierenden Genabschnitte von *GPD* und *PFPI* (blaue Pfeile) sowie das für die Generierung der vierten $\Delta PFPI$ -Mutante genutzte Deletionskonstrukt II mit den Bindungsstellen der jeweils verwendeten Oligonukleotide (O1s bis O6as). Da im Deletionskonstrukt II keine kodierenden Sequenzbereiche des *PFPI*-Gens mehr vorhanden sind, bindet keines der verwendeten *Primer*-Paare.

In Abbildung 3.46b ist die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR auf cDNA-Ebene gezeigt. Neben den Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 ($\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 4$) wurde vergleichend der Wildtyp UK7 (U) eingesetzt. Als Positivkontrolle (P) der PCR diente genomische DNA von UK7. Die Negativkontrolle (N) enthielt keine DNA als Matrize. Alle Mutanten zeigen keine Genexpression des ersten Exons. Einen vollständigen Ausfall der *PFPI*-Expression zeigt nur $\Delta PFPI$ -4.

O1s und O2as – Gpd-RTs und Gpd-RTas (#34/#35); O3s und O4as – PFPI-RT1s und PFPI-RT1as (#47/#48); O5s und O6as – PFPI-RT2s und PFPI-RT2as (#49/#50); M – 100 bp Größenstandard

3.5 Charakterisierung der Deletionsmutanten

3.5.1 Analysen der Blatt-Symptomatik

3.5.1.1 Inokulationsversuche mit Konidiosporen des siebten bzw. vierten Transfers

Die REMI-Mutante LB20₅₇ war apathogen auf suszeptiblen Gerstenpflanzen. Ein nächster wichtiger Schritt dieser Arbeit war daher, die vier generierten $\Delta PFPI$ -Mutanten ebenfalls auf ihre Pathogenität hin zu testen. Dazu sollten suszeptible Gerstenpflanzen mit Sporen der vier Deletionsmutanten sowie des Wildtyps UK7 zum Vergleich infiziert werden. Um Sporen der Mutanten zu isolieren, mussten diese zunächst in größerer Menge auf Agarplatten angezogen werden. Eine Beobachtung, die bei den ersten Versuchen mit den *PFPI*-Deletionsmutanten gemacht wurde, war ihr langsames Wachstum im

Vergleich zum Wildtyp. Die Kolonien der Mutanten blieben kleiner und breiteten sich langsamer über die Agarplatten aus. Auch die Sporulationsrate blieb sehr gering. Sie lag mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als beim Wildtyp.

Ein großer Nachteil bei der Arbeit mit Pilzen ist, dass einige Arten nach mehreren Transfers über Agarplatten sowohl ihre Sporulation einschränken als auch ihre Virulenz auf der Pflanze verringern. Manche Pilzisolat stellen die Sporulation sogar vollständig ein (Yuill, 2008). Die Gründe für diesen Vorgang sind noch nicht ganz klar. *R. commune* hat wie auch andere pilzliche Pflanzenpathogene wohl eine Abhängigkeit von seiner Wirtspflanze entwickelt, die es ihm häufig nicht erlaubt, längere Zeit ohne sie auszukommen. Welche Komponenten *Rhynchosporium* von der Pflanze benötigt, um Sporulationsfähigkeit und Virulenz aufrecht zu erhalten, ist nicht bekannt. Diese Tatsache ist jedoch für eine Arbeit mit *R. commune* im Labor von großem Nachteil, da ohne Sporen keine Pflanzen inokuliert werden können und der Pilz nicht mehr vermehrt werden kann. Eine Art, diesem Umstand entgegenzuwirken, ist, den Pilz auf der Pflanze zu kultivieren und ihn nach Ausbildung der Symptome zu reisolieren. Der Pilz kann sich über diese Phase auf der Pflanze „erholen“ und zeigt nach erneuten zwei Transfers wieder die gewohnte „Fitness“ (vgl. Abb. 3.47).

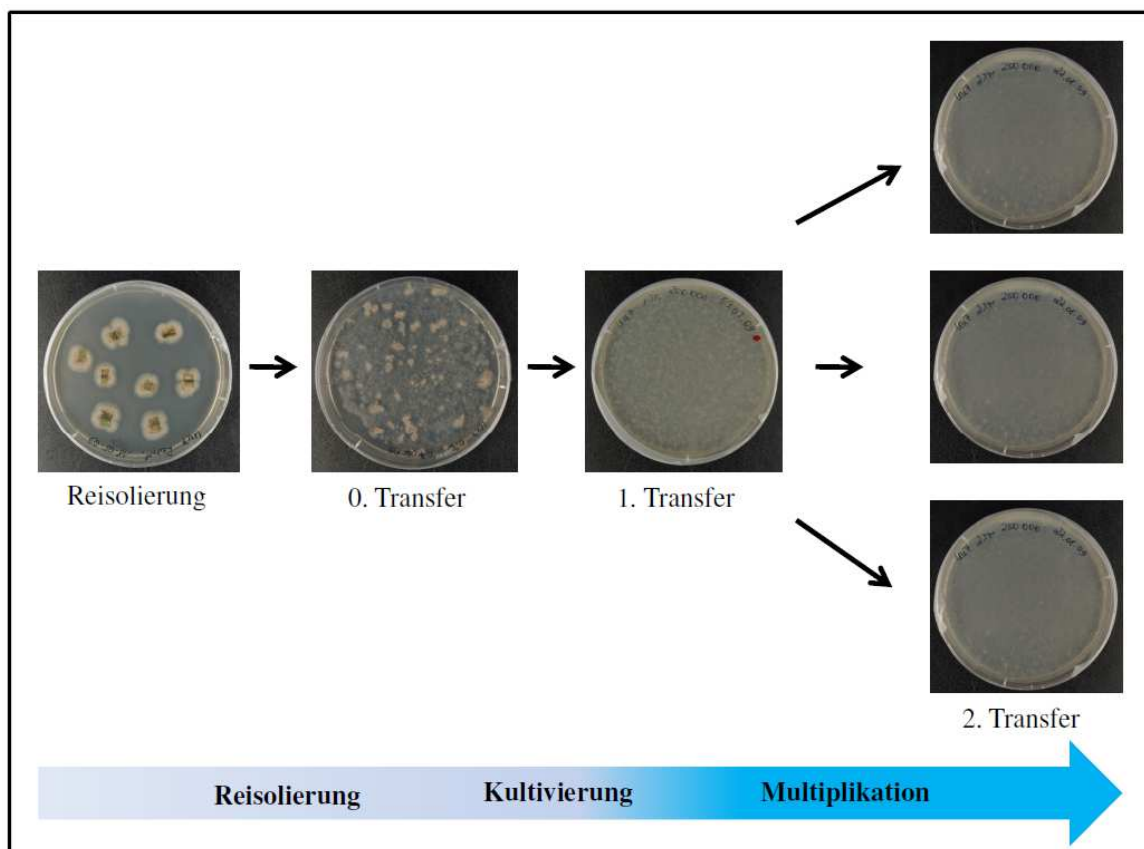


Abbildung 3.47

Abbildung 3.47: Darstellung des Verlaufs der Kultivierung von *R.-commune*-Isolaten auf Limabohnenagarplatten nach Reisolierung von suszeptiblen Gerstenpflanzen.

Das nach der Reisolierung gebildete Myzel (ca. 10-14 Tage) wird durch Ausstechen des bewachsenen Agars auf neue Limabohnen-Agarplatten überführt (0. Transfer). Nach 14-tägiger Inkubationszeit werden von diesen Platten Sporen isoliert und auf neue Agarplatten überführt (1. Transfer; Kultivierung), die nach erneuten 14 Tagen abgeerntet werden. Die Sporensuspension des 1. Transfers wird nachfolgend auf einer großen Anzahl neuer Agarplatten (2. Transfer) kultiviert und damit die Menge des Inokulats multipliziert.

Da für die Transfektion von *R. commune* Myzel verschiedener Transfers genutzt wurde, waren die Deletionsmutanten bereits bis zu siebenmal über Agarplatten transferiert worden, bis Sporen geerntet werden konnten. Diese hohe Zahl an Transfers schränkte das Wachstum und die Sporulationsfähigkeit der Mutanten zusätzlich ein. Die ersten Inokulationsversuche wurden deshalb mit Sporen durchgeführt, die von sieben ($\Delta PFPI-1$, -2 und -3) bzw. viermal ($\Delta PFPI-4$) über Agarplatten transferiertem Pilzmyzel geerntet worden waren. Im Normalfall werden die Gerstenpflanzen mit 1×10^7 Sporen pro zehn Pflanzen infiziert, die mit einer Sprühflasche auf den Primärblättern verteilt werden. Da von den $\Delta PFPI$ -Mutanten nach dem siebten bzw. vierten Transfer auf Agarplatten nur eine sehr geringe Sporenzahl isoliert werden konnte, wurden die Blätter mit jeweils drei 5 μ l-Tröpfchen der Sporenlösung inokuliert. Pro Tropfen wurden ca. 125 Sporen aufgetragen. Die Wildtyp-Sporen von UK7 wurden zum Vergleich in gleicher Weise verdünnt und auf die Blätter gebracht. Auch hier wurde der siebte bzw. vierte Transfer verwendet. Zusätzlich wurden Pflanzen als Negativkontrollen uninfiziert belassen (nicht gezeigt). Die infizierten Blätter wurden zur Dokumentation der Symptome fotografiert. Die Abbildung 3.48 zeigt die Fotos der infizierten Gerstenblätter der Sorte Ingrid nach 14 (a) bzw. 21 Tagen (b). Durch die eingeschränkte Menge an Sporen, die zur Infektion genutzt wurden, sind die Symptome nur sehr gering ausgeprägt. Die typischen nekrotischen Läsionen sind nur bei der Infektion mit dem Wildtyp UK7 und überraschenderweise mit der Mutante $\Delta PFPI-2$ zu erkennen. Die mit den anderen drei Mutanten infizierten Blätter zeigen auch nach 21 Tagen keine Anzeichen von Krankheitssymptomen.



Abbildung 3.48a



Abbildung 3.48b

Abbildung 3.48: Symptomausbildung auf Primärblättern der Gerstensorte Ingrid nach Tropfen-Infektionen mit dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 sowie der vier Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 und -4.

Die Abbildungen zeigen die Symptomausbildung auf Gersten-Primärblättern der Sorte Ingrid 14 (a) bzw. 21 Tage (b) nach Inokulation mit den vier Deletionsmutanten ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$) und dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 (U-1 bzw. U-2). Pro Primärblatt wurde mit dreimal ca. 125 Sporen in 5 μ l-Tropfen infiziert. Die Infektion der $\Delta PFPI$ -4-Mutante fand zeitlich später statt als die Infektion mit den ersten drei Deletionsmutanten. Des Weiteren wurden für diese Infektion Sporen des vierten (U-2) und nicht wie bei den anderen drei Deletionsmutanten des siebten (U-1) Transfers genutzt. Aus diesem Grund sind die mit UK7 infizierten Blätter zweimal gezeigt (U-1 und U-2). Es wurden jeweils die Oberseiten der Blätter fotografiert.

3.5.1.2 Reisolierung der Deletionsmutanten

Die $\Delta PFPI$ -Mutanten waren bereits sieben- bzw. viermal über Limabohnenagarplatten transferiert worden, bis eine genügende Anzahl Sporen isoliert werden konnte. Die ersten Inokulationsversuche wurden also mit Pilzmutanten durchgeführt, die in ihrer Fitness und damit der Virulenz vermutlich bereits eingeschränkt waren. Um klare Aussagen über die Eigenschaften der $\Delta PFPI$ -Mutanten machen zu können, mussten diese erst von suszeptiblen Gerstenpflanzen reisoliert werden und bis zu einem zweiten Transfer auf Agarplatten kultiviert werden. Somit konnten schlussendlich klare Aussagen über Pathogenität, Sporulation und Wachstumsgeschwindigkeit der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp getroffen werden.

Für die Reisolierung wurden zunächst mit allen Deletionsmutanten und dem *R. commune*-Wildtyp infizierte Gersten-Primärblätter 14 Tage nach Inokulation abgeschnitten und mit 70%iger Ethanol-Lösung, sowie 2%iger Natrium-Hypochlorid-Lösung oberflächensterilisiert. Die Blattstücken wurden dann auf Limabohnenagarplatten, die Ampicillin und Tetracyclin enthielten, solange bei 17°C inkubiert, bis das typische rosa Pilzmyzel um die Schnittkanten der Blättchen zu sehen war. Im Allgemeinen können mit dieser Methode nur Pathogene reisoliert werden, die bereits in das pflanzliche Gewebe, d.h. zumindest unter die Kutikula, eingedrungen sind. Alle anderen an der Blattoberfläche anhaftenden Mikroorganismen werden abgetötet. Im Normalfall lässt sich der Wildtyp von *R. commune* damit sauber aus den Blattstücken reisolieren. Da zu diesem Zeitpunkt allerdings nicht sicher war, ob die $\Delta PFPI$ -Mutanten in der Lage waren, die pflanzliche Kutikula zu penetrieren, war der Erfolg der Reisolierung der Mutanten unsicher.

Abb. 3.49 zeigt den Prozess der Reisolierung der Deletionsmutanten und vergleichend dazu des Wildtyps UK7 von den Blattstücken bis zum zweiten Transfer über einen Zeitraum von drei Monaten. Auch die Deletionsmutanten konnten aus den Gerstenblättern reisoliert werden, wenn auch in viel geringerer Menge als der Wildtyp (Abb. 3.49a). Während der Wildtyp nahezu an jedem Blattstück pilzliches Wachstum zeigt, ist bei den Deletionsmutanten im Durchschnitt nur an zwei bis drei von den inkubierten sechs Blattstücken Myzel zu erkennen. Auch die bewachsene Fläche ist um ein Vielfaches geringer als beim Wildtyp. Nur die Mutante $\Delta PFPI-2$ zeigt ein dem Wildtyp vergleichbares Wachstum. Nach vierzehntägiger Inkubationszeit wurde das gewachsene Myzel von den Blattstücken abgetrennt und auf neuen Limabohnenagarplatten ohne Antibiotikum-Zugabe mit sterilem Wasser verteilt. Dieser 0. Transfer ist in Abbildung 3.49b gezeigt. Nur beim Wildtyp ist die Platte dicht bewachsen. Die vier Deletionsmutanten dagegen zeigen ein zeitlich verzögertes und reduziertes Wachstum. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Mutanten weniger Sporen produzieren als der Wildtyp, da das Wachstum ihres Myzels im Wesentlichen auf die zuvor auf den Platten verteilten Agarstückchen beschränkt bleibt. Vom 0. Transfer

wurden nach zweiwöchiger Inkubationszeit Sporen isoliert. Hier bestätigte sich, dass die Deletionsmutanten weniger Sporen als der Wildtyp produzierten. Am eingeschränktesten war die Sporulation bei der $\Delta PFPI-1$ -Mutante. Hier konnte lediglich ein Sporentiter von 5×10^4 Sporen/ml erreicht werden. Die anderen drei Mutanten lagen mit einem Sporentiter von 5×10^5 Sporen/ml ebenfalls zwei Zehnerpotenzen niedriger als der Wildtyp mit 5×10^7 Sporen/ml. Um den ersten Transfer anzusetzen, konnten nicht wie gewöhnlich 250000 Sporen, sondern nur 2500 ($\Delta PFPI-1$) bzw. 25000 ($\Delta PFPI-2$, -3 und -4) pro Platte aufgebracht werden. Sporen des 0. Transfers vom Wildtyp UK7 wurden zum Vergleich ebenfalls in diesen Konzentrationen ausgestrichen und die Platten erneut 14 Tage bei 17°C inkubiert. Abb. 3.49c zeigt den ersten Transfer aller Mutanten sowie des Wildtyps. Auch hier lässt sich der Unterschied im Wachstum der Deletionsmutanten im Vergleich zu UK7 gut erkennen. Obwohl die gleichen Sporenmengen auf die Platten aufgetragen wurden, sind die Platten mit dem Wildtyp dichter bewachsen als die mit den Deletionsmutanten. Die Titer der vom ersten Transfer isolierten Sporen konnten allerdings erhöht werden. Der Sporentiter der Mutante $\Delta PFPI-1$ stieg auf 5×10^5 Sporen/ml, der der anderen drei Mutanten auf 5×10^6 Sporen/ml. Für den zweiten Transfer konnten damit Agarplatten mit 25000 ($\Delta PFPI-1$) und 250000 ($\Delta PFPI-2$, -3 und -4) Sporen beimpft werden. Die Platten wurden nach 14 Tagen fotografiert (Abb. 3.49d). Auch hier ist der Unterschied im Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp sichtbar, der schon beim ersten Transfer beobachtet wurde. Die isolierte Gesamtzahl an Sporen konnte nach dem zweiten Transfer nicht weiter gesteigert werden. Insgesamt konnte nur ein Titer von 5×10^5 Sporen/ml ($\Delta PFPI-1$) bzw. 5×10^6 Sporen/ml ($\Delta PFPI-2$, -3 und -4) erreicht werden. Trotz Reisolierung blieb die Sporulationsrate der Deletionsmutanten bis zu zwei Zehnerpotenzen niedriger als beim Wildtyp. Auch schien das Wachstum der Mutanten gegenüber UK7 stark verlangsamt zu sein. Zusammen mit der in den ersten Inokulationsversuchen beobachteten Apathogenität der Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 auf suszeptiblen Gerstenpflanzen waren diese Ergebnisse von großer Wichtigkeit für weiterführende Studien zur Charakterisierung der Mutanten. Für alle nachfolgend durchgeführten Versuche zur Analyse der Deletionsmutanten wurden ausschließlich die Sporen des zweiten Transfers genutzt.

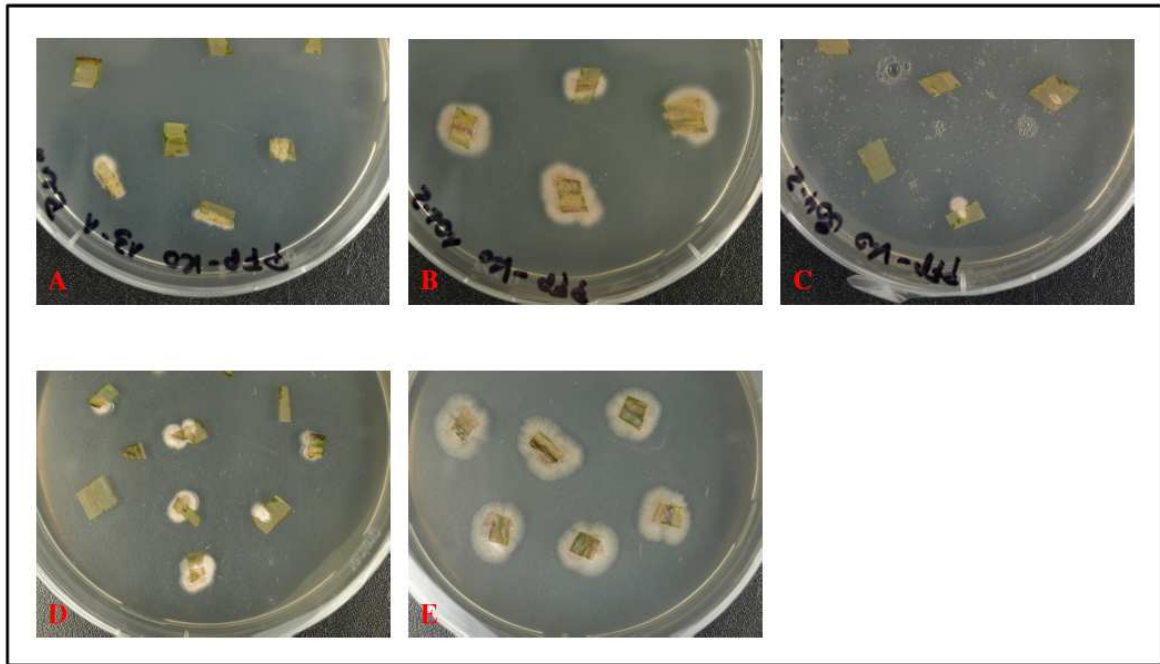


Abbildung 3.49a

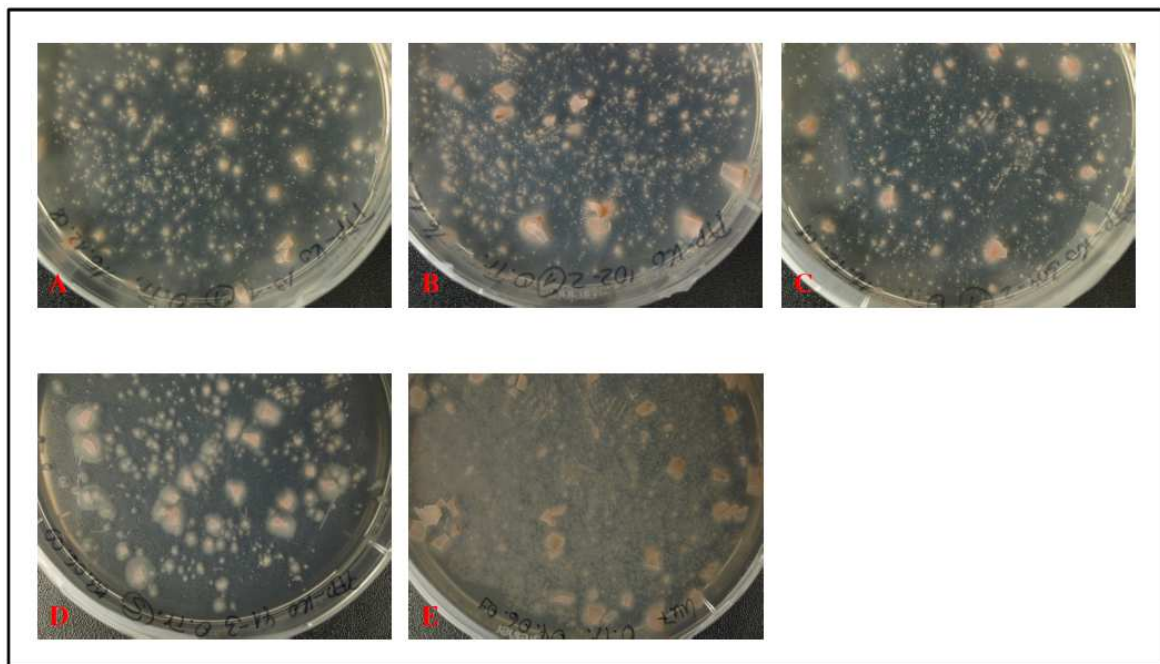


Abbildung 3.49b

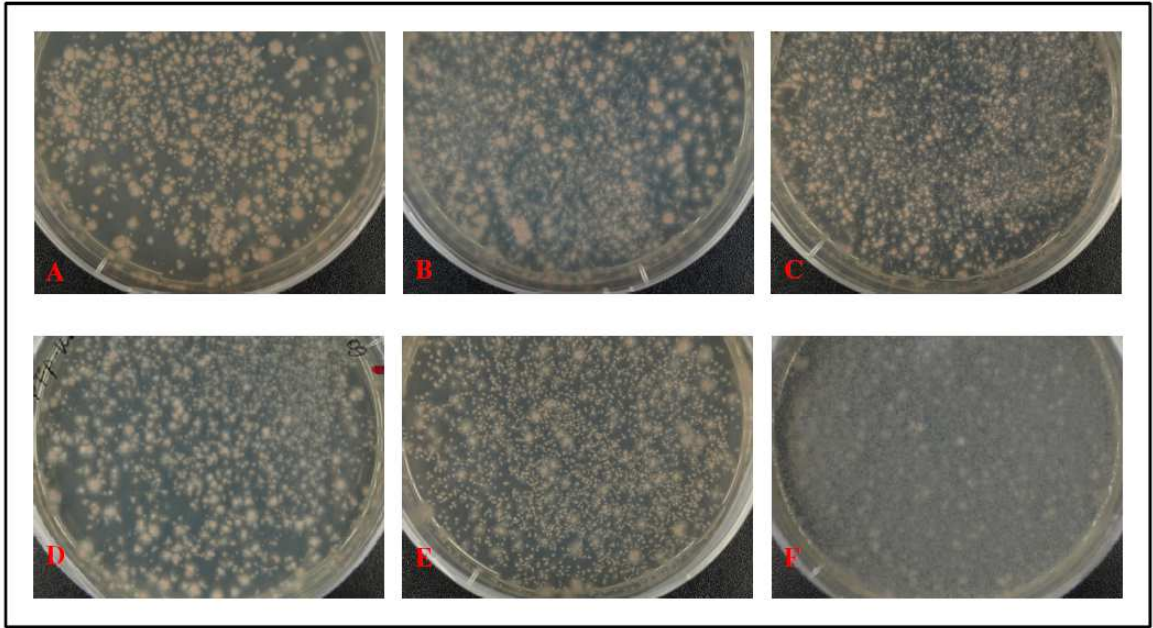


Abbildung 3.49c

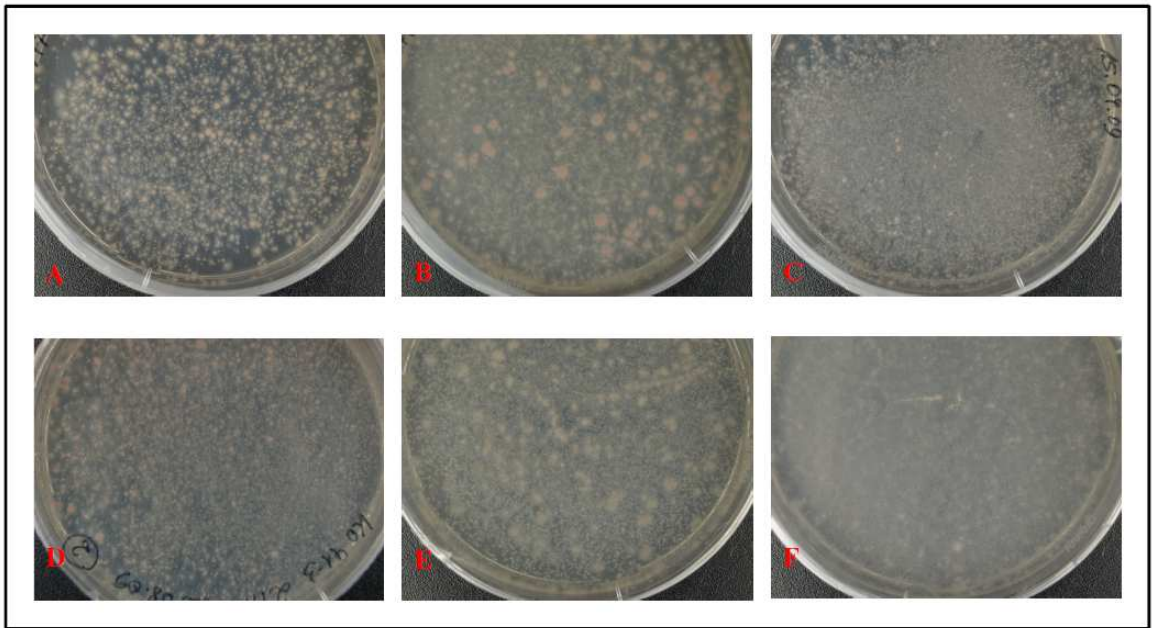


Abbildung 3.49d

Abbildung 3.49: Limabohnenagarplatten der $\Delta PFPI$ -Mutanten und des Wildtyps UK7 von der Reisolierung bis zum zweiten Transfer.

Abbildung 3.49a zeigt die Reisolierung der vier $\Delta PFPI$ -Mutanten ($\Delta 1$ - $\Delta 4$; A–D) und des Wildtyps UK7 (E) aus der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid. Die Primärblätter der Gerstenpflanzen wurden zuvor mittels Tropfen der jeweiligen Sporensuspensionen inokuliert. Infizierte Blätter wurden nach 14 Tagen geschnitten, oberflächensterilisiert und schließlich auf Limabohnenagarplatten mit Antibiotika aufgebracht. Die Agarplatten wurden nach 14-tägiger Inkubationszeit bei 17°C und Dunkelheit fotografiert.

In Abbildung 3.49b ist der 0. Transfer der Deletionsmutanten sowie des Wildtyps dargestellt. Das aus den Blattstücken gewachsene Pilzmyzel wurde abgetrennt und auf neuen Agarplatten verteilt. Die Platten der Deletionsmutanten 1 bis 4 (A–D) und des Wildtyps (E) wurden nach 14-tägiger Inkubationszeit fotografiert. Die Abbildung 3.49c zeigt den 1. Transfer der Deletionsmutanten und des Wildtyps UK7. Die Platten der Mutanten wurden mit 2500 ($\Delta PFPI$ -1 - A) bzw. 25000 ($\Delta PFPI$ -2, -3 und -4 - B, C und D) Sporen pro Platte beimpft. UK7 wurde in gleicher Weise verdünnt ausplattiert (2500 Sporen - E; 25000 Sporen - F).

In Abbildung 3.49d ist der 2. Transfer gezeigt. Die Platten konnten jeweils mit einer Zehnerpotenz mehr Sporen beimpft werden. (siehe Text; $\Delta PFPI$ -1, $\Delta PFPI$ -2, $\Delta PFPI$ -3, $\Delta PFPI$ -4 - A, B, C, D). UK7 wurde in gleicher Weise behandelt (25000 Sporen - E; 250000 Sporen - F). Auch die Agarplatten des 1. und 2. Transfers wurden nach 14 Tagen fotografiert.

3.5.1.3 Inokulationsversuche mit Konidiosporen des zweiten Transfers

Nach der erfolgreichen Reisolierung aller $PFPI$ -Deletionsmutanten von der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid wurden die Inokulationsversuche mit Sporen des jeweils zweiten Transfers der Mutanten und des Wildtyps UK7 wiederholt. Alle Pilzisolats sollten nach einer Wachstumsphase auf der Pflanze wieder die gewohnte „Fitness“ bzw. die maximale Virulenz erreicht haben. Da die Titer der isolierten Sporensuspensionen der $\Delta PFPI$ -Mutanten mindestens eine Zehnerpotenz niedriger, als die des Wildtyps waren, wurden die Pflanzen mit unterschiedlichen Sporenzahlen inokuliert. Für das Experiment wurden die Primärblätter der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid infiziert. Die Konidiosporen wurden mit einer Sprühflasche aufgebracht. Jeweils zehn Pflanzen pro Topf wurden inokuliert. Da die Mutante $\Delta PFPI$ -1 die geringste Sporenzahl produzierte, wurden die Pflanzen mit 1×10^5 Sporen pro Topf besprüht. Alle anderen Mutanten konnten mit 1×10^6 Sporen gesprüht werden. Der Wildtyp UK7 wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen inokuliert (1×10^7 , 1×10^6 und 1×10^5 Sporen pro Topf). Die Kontrollpflanzen blieben uninferiert. Die Abbildung 3.50 zeigt die Primärblätter 14 bzw. 21 Tage nach Inokulation. Die vom Wildtyp UK7 hervorgerufenen Symptome sind viel großflächiger und ausgeprägter als diejenigen, die mit Sporen des siebten bzw. vierten Transfers des Wildtyp-Isolats erreicht wurden. Auch mit einer Sporenkonzentration von 1×10^5 sind die typischen graugrünen Nekrosen mit dunklen Abgrenzungen zu erkennen, die sich nach 21 Tagen fast über die gesamte Blattspreite ausbreiten. Bei den vier Deletionsmutanten ergibt sich ein anderes Bild. Während die Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 14 Tage nach Inokulation noch keine Anzeichen von Symptomen zeigen, sind bei der Mutante $\Delta PFPI$ -2 bereits Nekrosen und Läsionen zu sehen, die sich nach einer weiteren

Woche großflächig ausgebreitet haben und mit den Symptomen des Wildtyps vergleichbar sind (vgl. Abb. 3.50). Die drei anderen Mutanten zeigen auch 21 Tage nach Inokulation nur leichte Randsymptome ($\Delta PFPI-1$) und stecknadelkopfgroße kreisrunde Nekrosen mit dunklen Rändern ($\Delta PFPI-3$ und -4) (vgl. Abb. 3.51b). Diese Ergebnisse konnten nach zweimaliger Wiederholung der Inokulationen mit den Sporen des zweiten Transfers bestätigt werden. Die Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 zeigen also keinen Totalverlust der Pathogenität gegenüber der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid sondern eine stark eingeschränkte Virulenz. Die Symptome bleiben sehr klein an nur wenigen Blattstellen und entstehen zeitlich verzögert. Eine Erklärung für die abweichende Symptomatik der Deletionsmutante $\Delta PFPI-2$ konnte bislang nicht gefunden werden, da durch DNA-Hybridisierung eine homologe Rekombination nachgewiesen werden konnte. Die Hybridisierung mit der Sonde der Wildtyp- $PFPI$ -Sequenz (S2) zeigte außerdem kein Signal. Weshalb die Mutante trotzdem ein dem Wildtyp ähnliches Verhalten auf der Pflanze zeigte, bleibt unklar. Die Mutante $\Delta PFPI-2$ wurde deshalb nachfolgend nicht in alle weiteren Untersuchungen einbezogen.

Abbildung 3.50: Symptomausbildung auf Primärblättern der Gerstensorte Ingrid nach Sprüh-Inokulation mit dem *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 sowie der Deletionsmutanten $\Delta PFPI-1$, -2 , -3 und -4 .

Abbildung 3.50a zeigt die Symptome auf der Gerstensorte Ingrid 14 Tage, Abbildung 3.50b 21 Tage nach Inokulation mit den vier $PFPI$ -Deletionsmutanten ($\Delta 1$ - $\Delta 4$) sowie dem Wildtyp UK7 (U-1, U-2, U-3). Für alle Infektionen wurden Konidiosporen des zweiten Transfers verwendet. $\Delta PFPI-1$ ($\Delta 1$) wurde mit einer Konzentration von 1×10^5 Sporen pro Topf aufgesprüht. Für die anderen drei Deletionsmutanten ($\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$) wurde mit 1×10^6 Sporen pro Topf infiziert. UK7 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen versprüht. Dabei wurde mit 1×10^7 (U-1), 1×10^6 (U-2) sowie 1×10^5 (U-3) Sporen pro Topf inokuliert. Die Kontrollen blieben uninferiert (K). Von den Primärblättern wurden jeweils Oberseite (A) und Unterseite (B) fotografiert

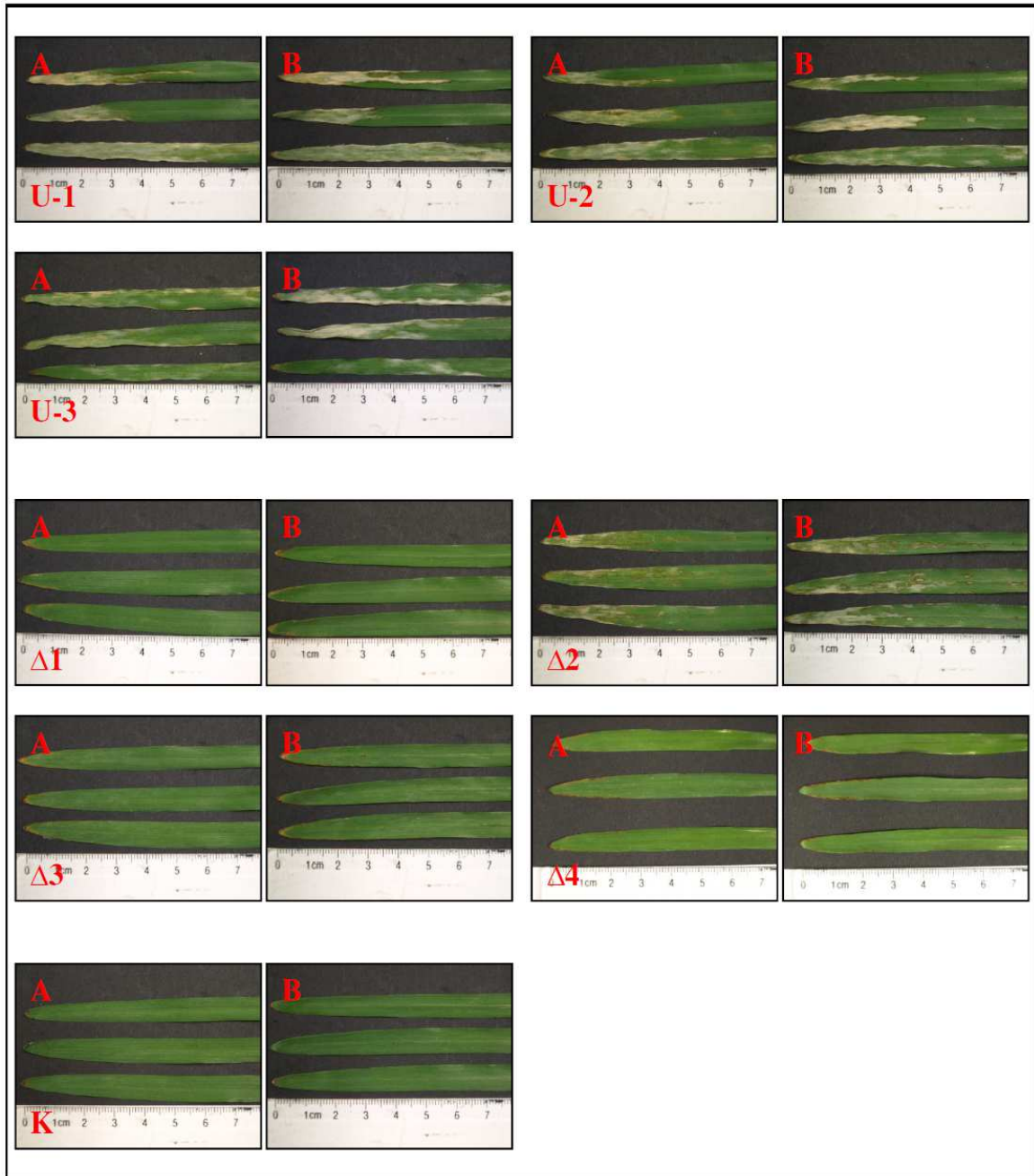


Abbildung 3.50a

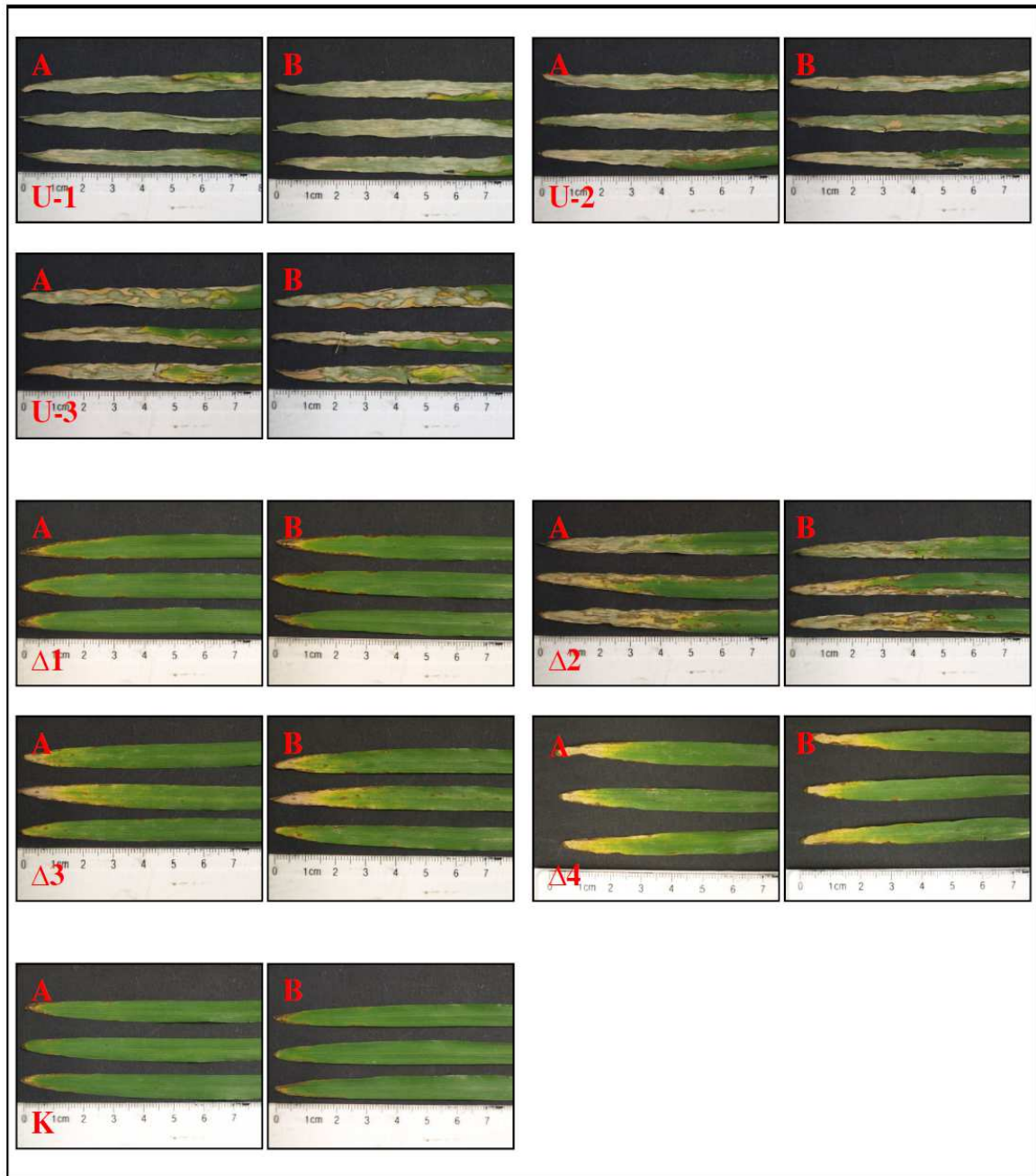


Abbildung 3.50b

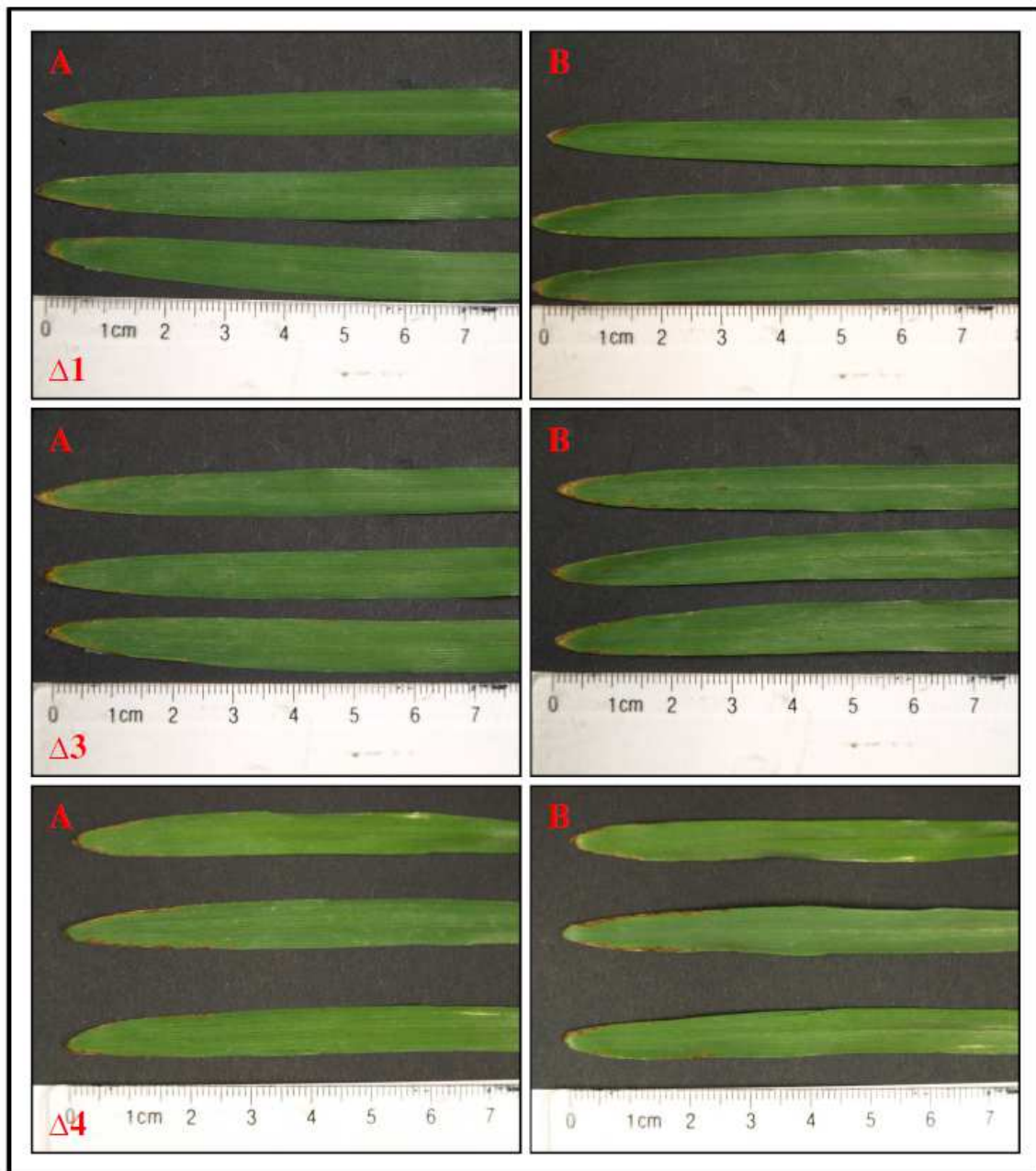


Abbildung 3.51a



Abbildung 3.51b

Abbildung 3.51: Symptomausbildung auf Gersten-Primärblättern nach Sprüh-Inokulation mit den *PFPI*-Deletionsmutanten 1, 3 und 4.

Die Abbildungen 3.51a und b zeigen die nach 14 (a) bzw. 21 (b) Tagen nach Inokulation mit den Δ *PFPI*-Mutanten 1, 3 und 4 entwickelten Blattsymptome in vergrößerter Form. Dargestellt sind jeweils Ober- und Unterseite der Blätter. Weitere Erklärungen siehe Bildunterschrift zu Abbildung 3.50.

3.5.2 Mikroskopie der $\Delta PFPI$ -Mutanten

3.5.2.1 Mikroskopie *in planta*

Um das Wachstum der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp auf der Pflanze mikroskopisch untersuchen zu können, wurden 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation infizierte Primärblätter geerntet. Diese wurden über Nacht in einer Trypanblau-Lösung gefärbt, um pilzliche Strukturen auf der Pflanze sichtbar zu machen. Danach wurden die Blätter in einer 50%igen Glycerin-Lösung im Hellfeld mikroskopiert. Abb. 3.52 zeigt die Aufnahmen aller analysierten Zeitpunkte der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7 auf der Gerstensorte Ingrid. Abb. 3.52a zeigt mikroskopische Aufnahmen infizierter Blätter nach sieben Tagen. Während der Wildtyp hier bereits die gesamte Blattspreite penetriert hat und zum großen Teil die Epidermis-Zellen umwächst (3.52a, A), zeigen die $\Delta PFPI$ -Mutanten 1, 3 und 4 ein stark verzögertes Wachstum. Die Sporen sind ausgekeimt und beginnen gerade erst die Kutikula zu penetrieren (3.52a, B, D und E). Die einzige Ausnahme bildet die Mutante $\Delta PFPI$ -2. Vergleichbar mit dem Wildtyp sind hier bereits lange Hyphen ausgebildet, die die Epidermiszellen unter der Kutikula umwachsen (3.52a, C). In Abbildung 3.52b sind die Blätter 14 Tage nach Inokulation dargestellt. Der Wildtyp UK7 hat das typische festgepackte Pilzstroma ausgebildet, welches besonders in den nekrotischen Läsionen zu finden ist (3.52b, A). Auch hier zeigt die Mutante $\Delta PFPI$ -2 eine dem Wildtyp vergleichbare Entwicklung (3.52b, C). Die anderen drei Deletionsmutanten zeigen kein Stroma. Das Wachstum der Mutanten ist anscheinend um den Zeitraum von ca. 7 Tagen verzögert, da diese gerade erst anfangen sich zwischen Kutikula und epidermaler Zellschicht auszubreiten (3.52b, B, D und E). Nach einer weiteren Woche ist das Wachstum des Wildtyps stark fortgeschritten. Das Pilzstroma und damit auch die Nekrosen haben sich über das gesamte Blatt ausgebreitet (3.52c, A). Ein ähnliches Bild zeigt wiederum Mutante $\Delta PFPI$ -2 (3.52c, C). Die anderen drei Mutanten zeigen ein unterschiedliches Bild. $\Delta PFPI$ -1 ruft auf den Blättern nur leichte Randsymptome hervor. Der Pilz hat zwar die Kutikula durchbrochen, wächst aber sehr langsam. Pilzstroma kann nicht beobachtet werden (3.52c, B). Die Mutanten $\Delta PFPI$ -3 und -4 zeigen nach 21 Tagen kleinere punktförmige Nekrosen auf der Blattoberfläche. Durch gezielte Mikroskopie dieser Stellen konnte auch hier Pilzstroma identifiziert werden. Dies allerdings nur an wenigen Stellen und sehr vereinzelt (3.52c, D und E).

Die Auswertung der Mikroskopie-Daten zeigt, dass die Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 gegenüber dem Wildtyp UK7 ein stark verzögertes Wachstum *in planta* zeigen. Während UK7 bereits nach wenigen Tagen die Kutikula penetriert hat und beginnt, sich zwischen den Zellen der Epidermis auszubreiten, sind die Mutanten noch im Anfangsstadium ihrer Entwicklung. Der gesamte zeitliche Ablauf des Infektionsprozesses ist demzufolge extrem verlangsamt. Dies führt vermutlich dazu, dass die Mutanten die pflanzliche Oberfläche weit weniger häufig penetrieren können und sich im Blatt nur sehr

eingeschränkt ausbreiten. Eine Ausnahme bildet die Mutante $\Delta PFPI-2$. Trotz der Deletion des *PFPI*-Gens verhält sich die Mutante *in planta* wie der Wildtyp. Dies war erwartet worden, da auch die beobachtete Blatt-Symptomatik der des Wildtyps gleicht (s. 3.5.1.3).

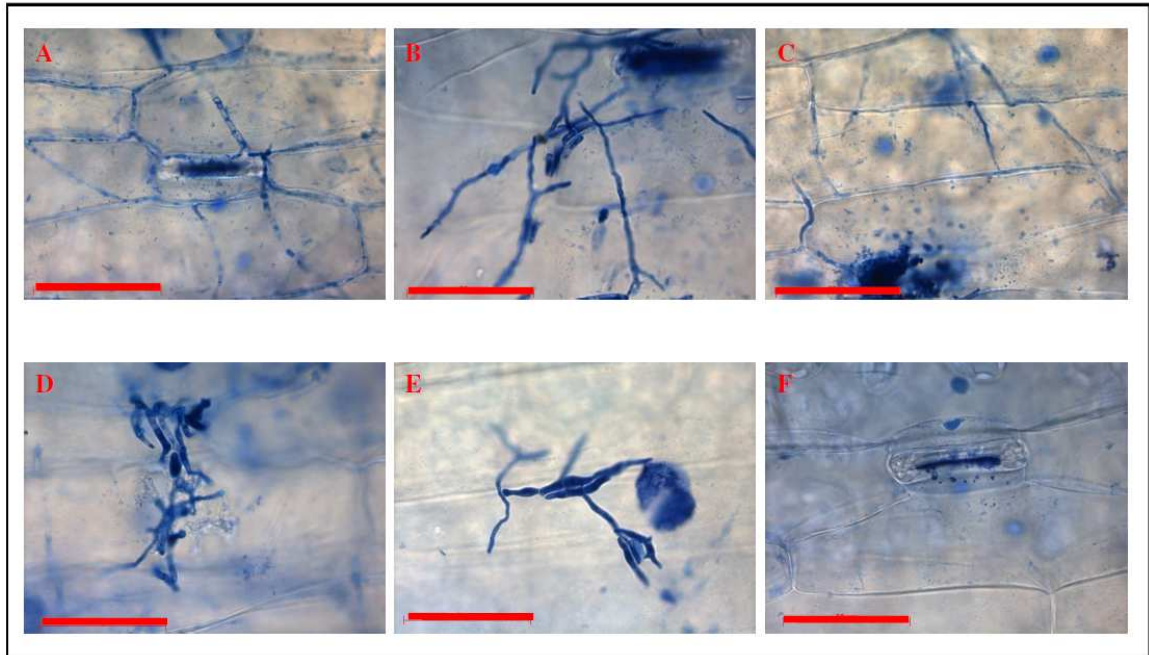


Abbildung 3.52a

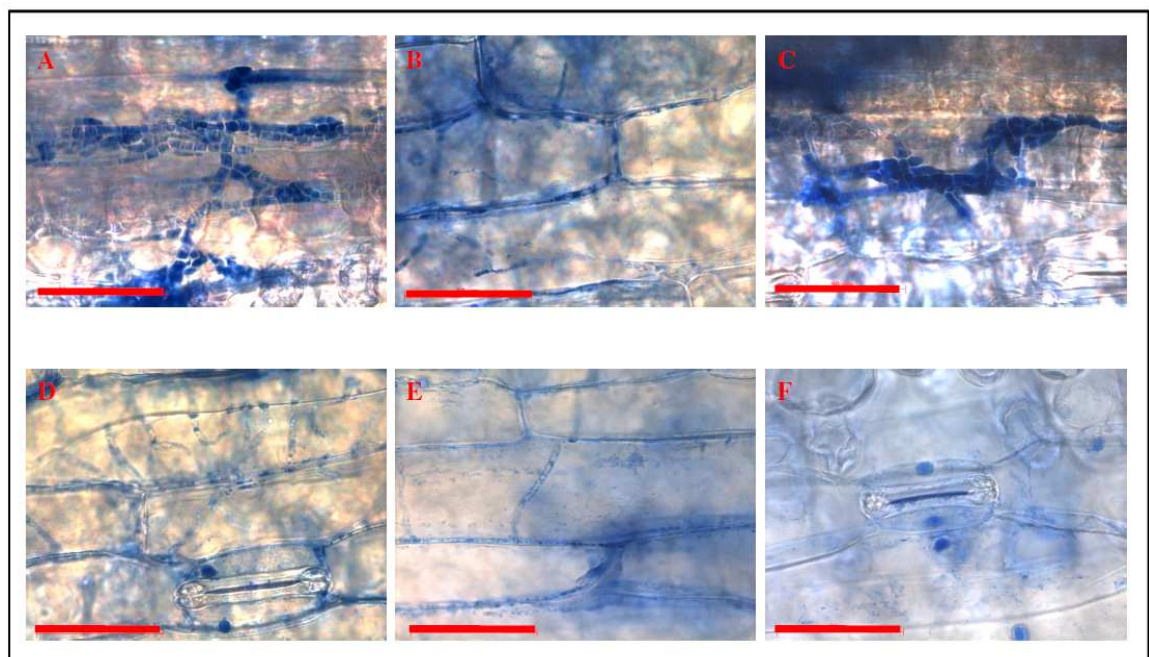


Abbildung 3.52b

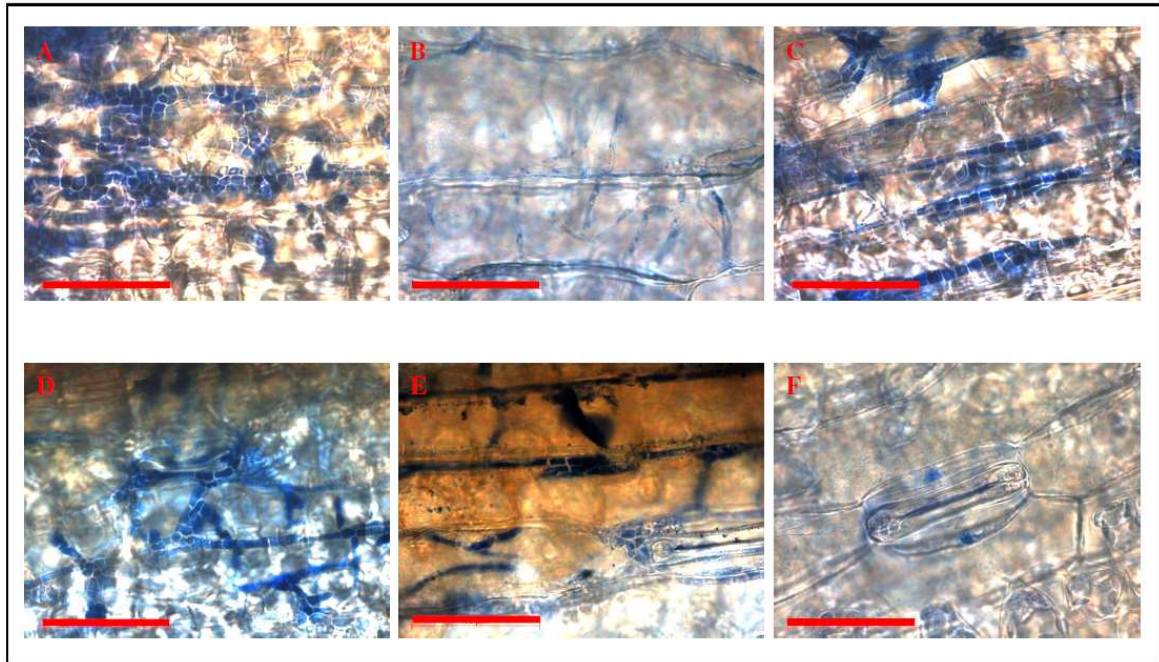


Abbildung 3.52c

Abbildung 3.52: Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7 und der *PFPI*-Deletionsmutanten *in planta*.

Die Abbildungen dokumentieren die Entwicklungsstadien der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 7 (a), 14 (b) und 21 Tage (c) nach Inokulation der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid. Abbildung A zeigt jeweils den Wildtyp UK7, B bis E die Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 und -4. F zeigt die uninfizierte Kontrolle. Alle Bilder wurden in 1000facher Vergrößerung aufgenommen.

Maßstabsbalken – 50 µm.

3.5.2.2 Mikroskopie *ex planta*

Die Mikroskopie der Deletionsmutanten *in planta* zeigte ein verzögertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Die Entwicklung auf der Pflanze schien gehemmt und die Penetrationsstellen reduziert zu sein. Morphologische Unterschiede zwischen den ausgebildeten pilzlichen Strukturen der Mutanten und des Wildtyps konnten dabei zunächst nicht beobachtet werden. Daher sollte die Entwicklung der Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 zusätzlich *ex planta* untersucht werden. Dazu wurden zunächst sterile Medienkammer-Objektträger mit FRIES-Medium gefüllt und mit Sporen der Mutanten und UK7 beimpft. Die Objektträger wurden bei 17°C und Dunkelheit inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten im Hellfeld mikroskopiert. Die Abbildung 3.53 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen nach 1, 3, 6 und 14 Tagen. Sowohl die Mutanten als auch der Wildtyp sind nach 24 Stunden ausgekeimt (3.53a). Die Keimhyphen der Deletionsmutanten erscheinen im Vergleich zum Wildtyp etwas verkürzt, zeigen aber

sonst keine Auffälligkeiten. Auch die Sporen sind zweizellig und haben die typische gebogene Form. Nach sechs Tagen sind die Keimschläuche bereits zu langen Hyphen angewachsen. Morphologisch zeigen die Deletionsmutanten auch hier keine Unterschiede zum Wildtyp. Die Hyphen sind lang gewachsen, unregelmäßig verzweigt und vielfach vakuolisiert (3.53c). Erst nach 14 Tagen zeigen sich Unterschiede. Alle Deletionsmutanten haben in den Hyphen und auch an deren Spitzen runde, blasenartige Strukturen ausgebildet, die beim Wildtyp nicht nachzuweisen sind (3.53d). Auffällig sind zusätzlich die dicke Umwandung dieser Zellen und ihre Abgrenzung von den Hyphen. Die pilzlichen Strukturen ähneln sogenannten Chlamydo-sporen. Diese Sporen, auch Mantelsporen genannt, werden von vielen Pilzen gebildet. Sie sind meist rund, dickwandig und entstehen interkalar oder endständig durch vorherige Hyphenverdickungen. Oft werden sie bei ungünstigen Lebensbedingungen als Überdauerungsformen gebildet. Bekannte Chlamydo-sporen-bildende pilzliche Vertreter sind beispielsweise *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* (Staub & Morschhäuser, 2006; Whiteway & Bachewich, 2007) sowie *Cryptococcus neoformans* (Lin & Heitman, 2005). Auch im Oomycet *Phytophthora* konnten sie nachgewiesen werden (Ioannou & Grogan, 1985).

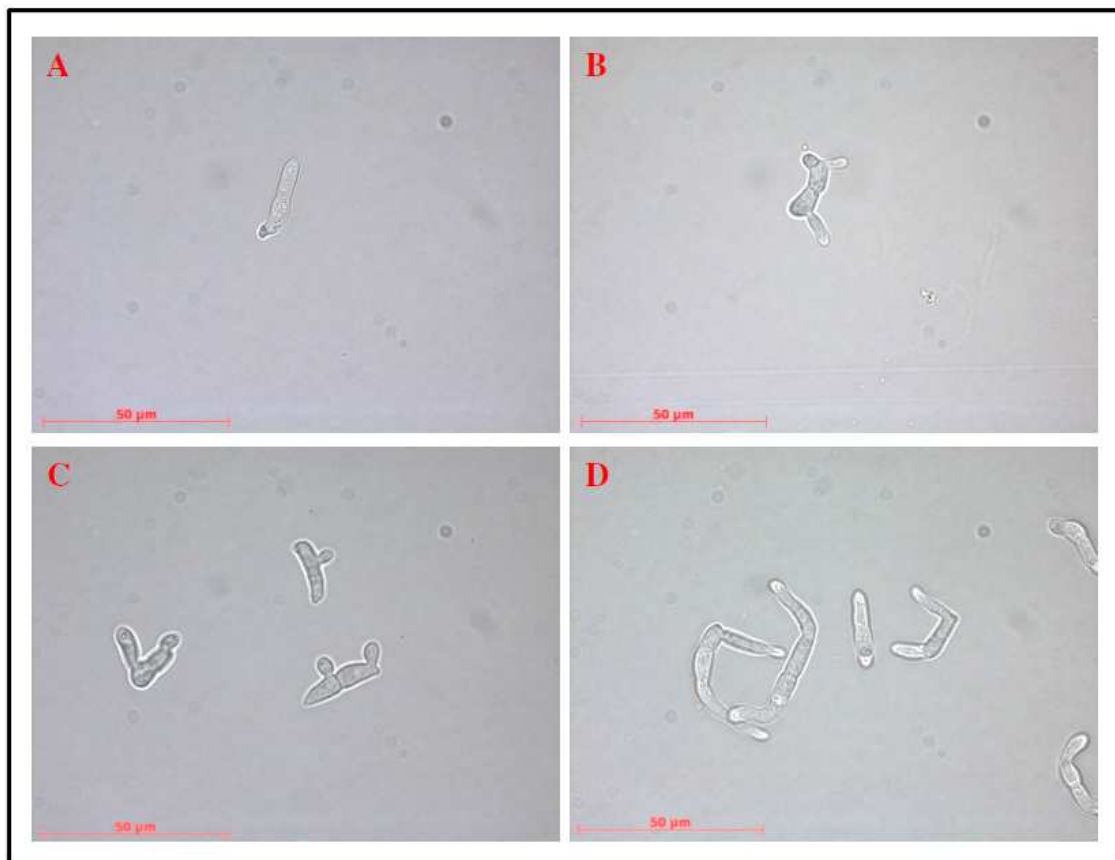


Abbildung 3.53a



Abbildung 3.53b

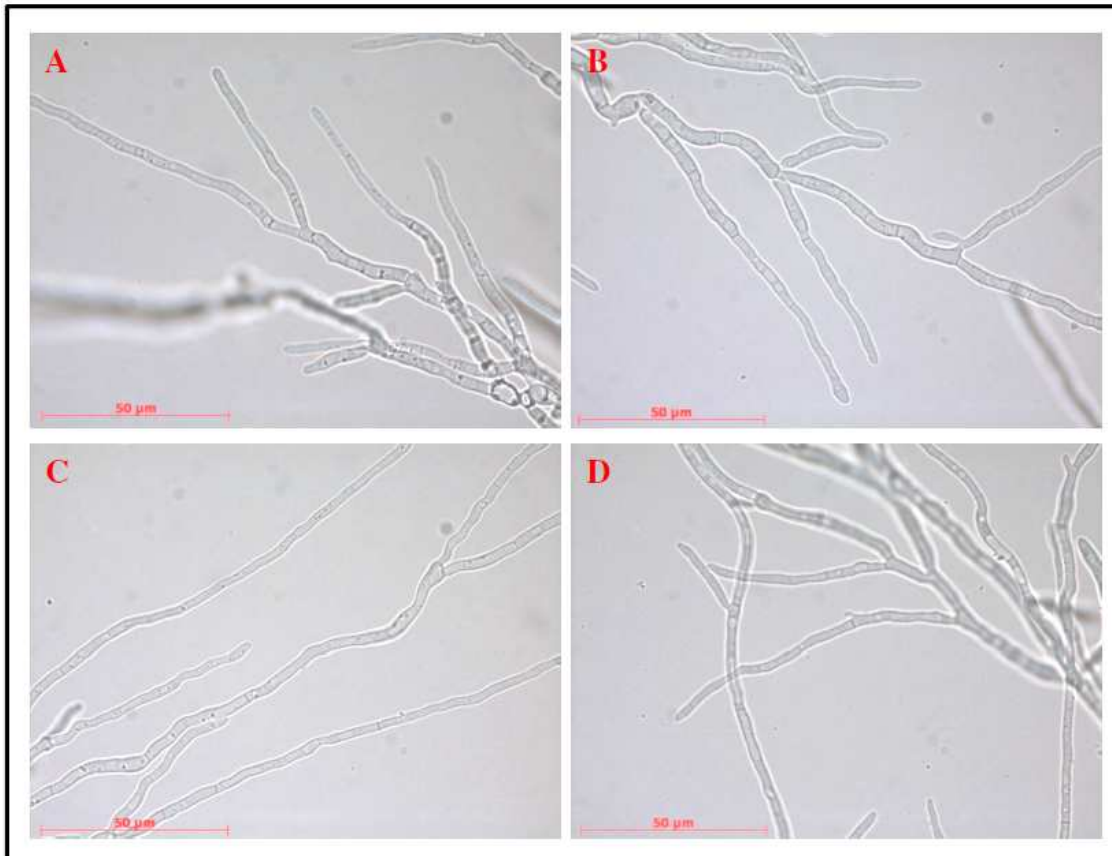


Abbildung 3.53c

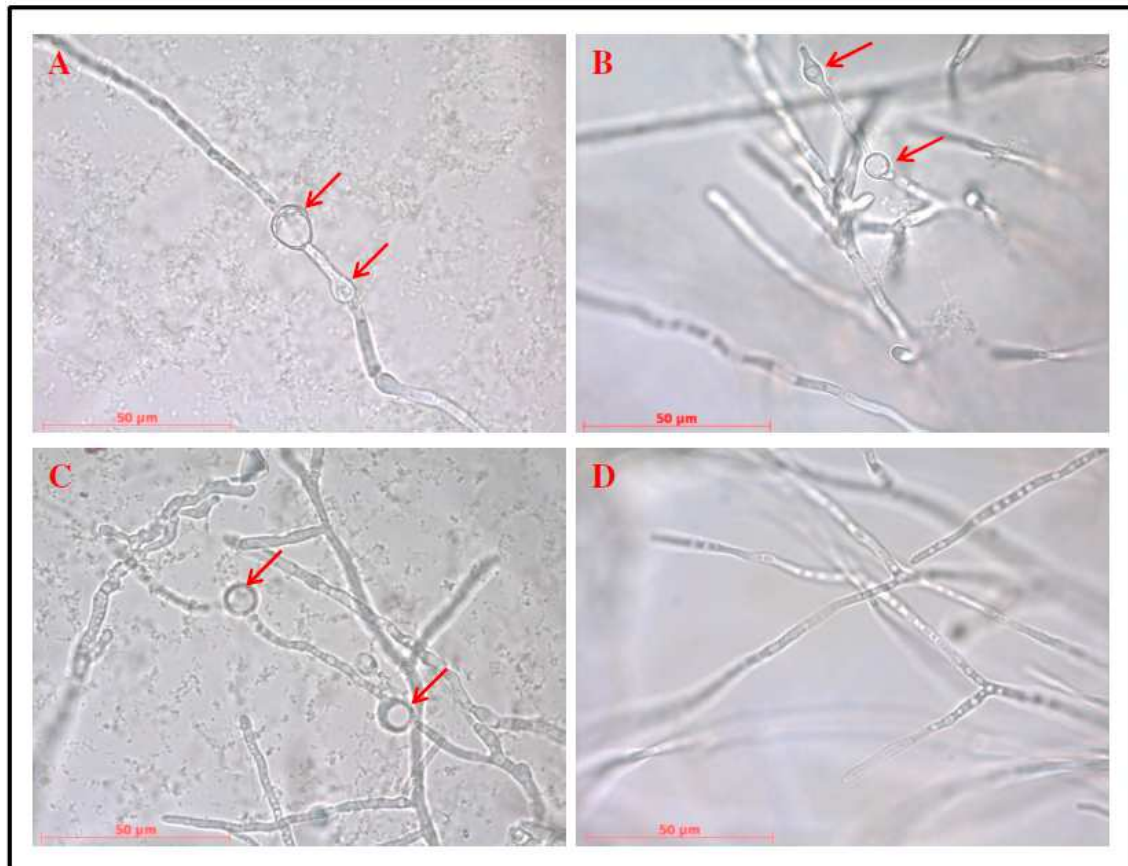


Abbildung 3.53d

Abbildung 3.53: Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 *ex planta* (FRIES-Medium).

FRIES-Flüssigmedium wurde mit Konidiosporen des zweiten Transfers der Deletionsmutanten und UK7 beimpft und nach 1 (3.53a), 3 (3.53b), 6 (3.53c) und 14 Tagen (3.53d) mikroskopiert. Die Aufnahmen A–C zeigen jeweils der Reihenfolge nach $\Delta PFPI-1$, -3 und -4. In D ist UK7 dargestellt. Chlamydosporen-ähnliche Strukturen sind mit roten Pfeilen markiert. Alle Bilder wurden in 1000-facher Vergrößerung aufgenommen.

Maßstabsbalken – 50 µm

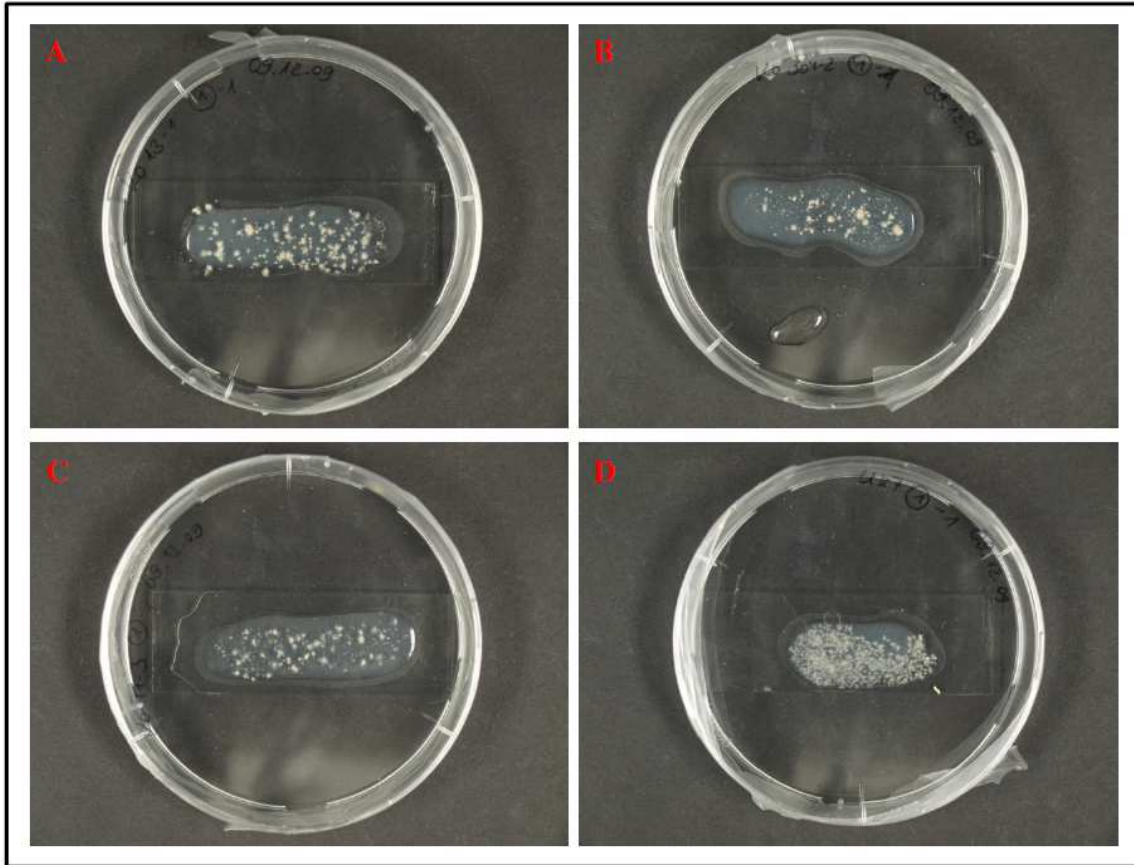


Abbildung 3.54: Wachstum der Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 auf Objektträgern mit Limabohnenagar.

Die Objektträger wurden mit Limabohnenagar bestückt und mit jeweils 5000 Konidiosporen der Deletionsmutanten (A–C) und des Wildtyps (D) beimpft. Die Proben wurden in sterilen Petrischalen 14 Tage bei 17°C und Dunkelheit inkubiert und anschließend fotografiert.

Die Fähigkeit zur Chlamydosporen-Bildung hängt bei vielen Pilzarten von der Art des Wachstumsmediums ab. Bei *Candida*-Arten wird die Chlamydosporen-Bildung auf Mangel-Nährböden induziert, wie z.B. Reisagar (Rinaldi, 1993). Daher sollten die $\Delta PFPI$ -Mutanten zusätzlich auf Limabohnenagar untersucht werden. Dazu wurden jeweils 5000 Konidiosporen der Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 auf mit Agar bestückte Objektträger gegeben (Abb. 3.54), bei 17°C im Dunkeln inkubiert und nach 10 und 14 Tagen mikroskopiert. Abb. 3.55 zeigt die Mutanten und UK7. In allen drei Deletionsmutanten sind bereits nach zehn Tagen die runden, blasenartigen Strukturen zu sehen, die auch schon im Flüssigmedium beobachtet werden konnten. Sie sind am Ende der Hyphen, häufig aber auch interkalar ausgebildet. UK7 zeigt solche Strukturen nicht. Vielmehr sind hier die typischen gebogenen Konidiosporen zu beobachten, die meist an den Hyphenspitzen und deren Verzweigungen entstehen.

Ein sicherer Nachweis der Identität der Strukturen bei den $\Delta PFPI$ -Mutanten (z.B. durch Keimungsversuche) konnte aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen. Über ihre mögliche Funktion in den Mutanten lässt sich deshalb bislang nur spekulieren (s. 4.4).

Für *R. commune* wurden Chlamydosporen bisher nur unter Einfluss des Indol-Alkaloids Gramin (N,N-Dimethyl-3-Aminomethylindol) beschrieben (Kirsten *et al.*, 2011). Gramin wird konstitutiv in Gerste gebildet (Hanson *et al.*, 1981), besonders in sehr jungen Pflanzen. In den Primärblättern 9-Tage alter Gerstenpflanzen konnte ein Konzentration von ca. $1 \mu\text{mol (g FW)}^{-1}$ nachgewiesen werden (Argandona *et al.*, 1987). In älteren Blättern nimmt der Gramin-Gehalt dagegen ab, kann aber durch Hitzestress in einigen Sorten wieder induziert werden (Hanson *et al.*, 1983). Für Gramin wurden toxische Eigenschaften gegen einige Unkräuter (z.B. *Cerastium arvense*; Overland, 1966), Aphide (Zuniga *et al.*, 1985), Herbivore (Arnold & Hill, 1972) und Nematoden (Brandt *et al.*, 1935) nachgewiesen. Zudem hat Gramin auch antifungale Eigenschaften. Eine Konzentration von mehr als 1 mM inhibiert beispielsweise die Keimung und Appressorien-Bildung von *Blumeria graminis hordei* (Wippich & Wink, 1985). Die Gründe für eine Ausbildung von Chlamydosporen des *R.-commune*-Wildtyps unter Gramin-Einfluss sind bislang noch unklar. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Stressantwort des Pilzes. Um darüber klarere Aussagen treffen zu können, sind jedoch künftig noch weitere Untersuchungen notwendig, die schlussendlich auch Rückschlüsse über die Rolle dieser Strukturen in den $\Delta PFPI$ -Mutanten geben können.

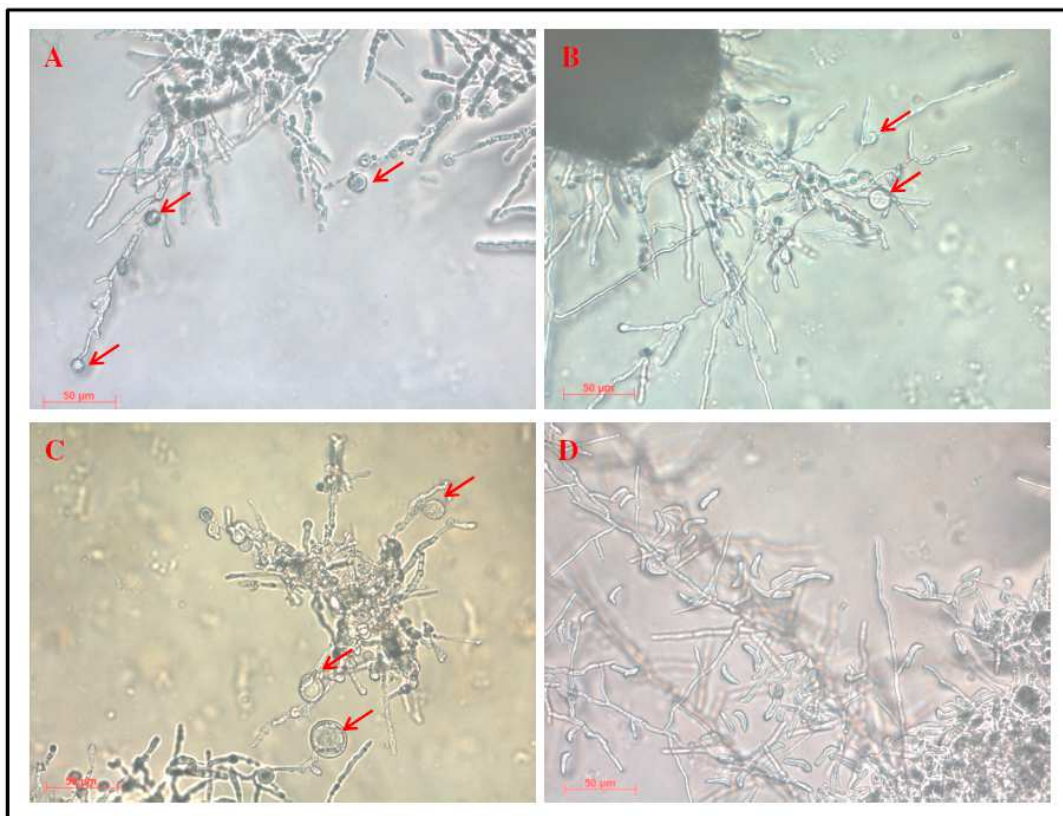


Abbildung 3.55a

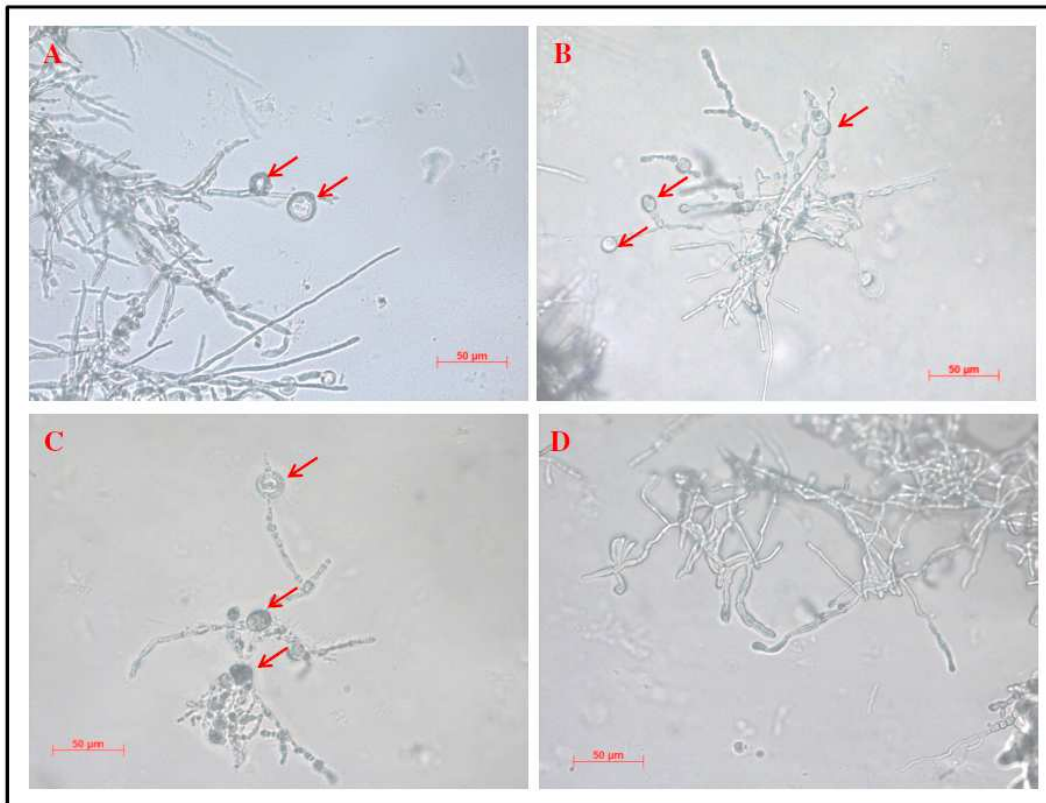


Abbildung 3.55b

Abbildung 3.55: Hellfeld-mikroskopische Aufnahmen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 *ex planta* (Limabohnenagar).

Objektträger wurden mit Limabohnenagar bestückt und dieser mit jeweils 5000 Konidiosporen des zweiten Transfers der Deletionsmutanten und des Wildtyps beimpft. Die Objektträger wurden nach zehn (3.55a) und 14 Tagen (3.55b) mikroskopiert. Die Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 sind der Reihenfolge nach in den Aufnahmen A–C gezeigt. In Abbildung D ist jeweils UK7 dargestellt. Rote Pfeile markieren Chlamydosporen-ähnliche Strukturen. Alle Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Maßstabsbalken – 50 µm

3.5.3 Quantitative Wachstumsanalysen der $\Delta PFPI$ -Mutanten

3.5.3.1 Wachstumskinetik *in planta*

Während der mikroskopischen Analysen *in planta* fiel das zeitlich verzögerte Wachstum der Deletionsmutanten sowie ihre reduzierte Virulenz im Vergleich zum Wildtyp UK7 auf. Um diese Resultate auch quantitativ erfassen zu können, sollten Wachstumsanalysen der drei Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 und des Wildtyps auf der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid durchgeführt werden. Der Anstieg der Biomasse der jeweiligen Pilzisolat auf der Pflanze über einen bestimmten Zeitraum sollte mittels Real-Time-PCR

erfasst werden. Dafür wurden jeweils ein Gersten- und ein Pilzgen amplifiziert. Dabei sollte zu jedem untersuchten Zeitpunkt das Verhältnis der beiden Amplikons als Maß für die Menge an gebildetem Pilzmyzel stehen. Fragmente des Gerstengens HO05J24 sowie des Pilzgens *GPD* amplifiziert (vgl. Abb. 3.7a und 3.12). Da die Mutante $\Delta PFP1-1$ die am stärksten reduzierte Sporulation zeigte, konnten für die Inokulation der Pflanzen nur 1×10^5 Sporen pro zehn Pflanzen verwendet werden. Die anderen beiden Mutanten und der Wildtyp wurden deshalb jeweils mit der gleichen Sporenzahl inokuliert. Während des Versuchsverlaufs wurden zu bestimmten Zeitpunkten (0 d, 1 d, 3 d, 6 d, 10 d, 14 d, 21 d) infizierte Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Aus diesen Proben wurde genomische DNA isoliert und als Matrize für die Real-Time-PCR verwendet. Jede Pilz-Pflanze-Interaktion wurde dreimal wiederholt (biologische Replikate), ebenso die jeweils durchgeführte PCR (technische Replikate). Die Auswertung der Real-Time-PCR-Daten erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Pfaffl, 2001).

Die Abbildung 3.56 zeigt die grafischen Darstellungen der erhaltenen Wachstumskurven. In 3.56a sind alle vier Pilz-Pflanze-Interaktionen dargestellt. Der Wildtyp UK7 zeigt einen normalen Wachstumsverlauf. Verglichen mit dem bereits in Kapitel 3.2.2.1.1 gezeigten Kurvenverlauf ist die ermittelte Menge an Pilz-Biomasse jedoch in diesem Fall geringer und der Anstieg der Wachstumskurve ist zeitlich verzögert. Diesen Umstand kann man jedoch mit der in diesem Experiment verwendeten um zwei Zehnerpotenzen niedrigeren Sporenmenge erklären. Trotzdem steigt die Kurve bis Versuchsende an, was auf eine stetige Steigerung der pilzlichen Biomasse hinweist. Die drei untersuchten Mutanten zeigen allerdings ein stark eingeschränktes Wachstum. Selbst nach 21 Tagen ist kein signifikanter Anstieg der Pilzmenge auf der Pflanze zu verzeichnen. Dieses Ergebnis korreliert mit den mikroskopischen Untersuchungen, da hier bereits ein zeitlich verzögertes Wachstum nachgewiesen werden konnte. Erst nach 14 Tagen konnten pilzliche Strukturen unter der Kutikula beobachtet werden. Diese Penetrationsstellen traten allerdings nur sehr vereinzelt auf. Die Deletionsmutanten sind also vermutlich nicht in der Lage, sich wie der Wildtyp im Blatt großflächig auszubreiten, da sie nur an wenigen Stellen die Blattoberfläche penetrieren. Aus diesem Grund wachsen sie auch nur sehr eingeschränkt, was sich im Verlauf der Kurven widerspiegelt.

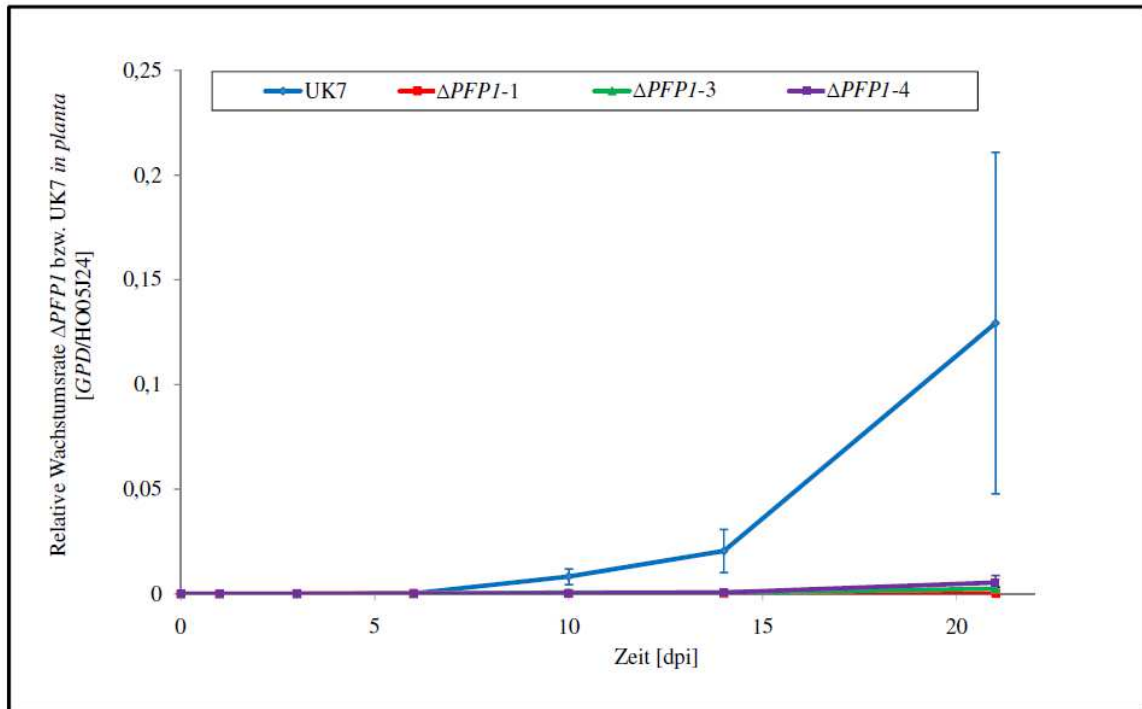


Abbildung 3.56a

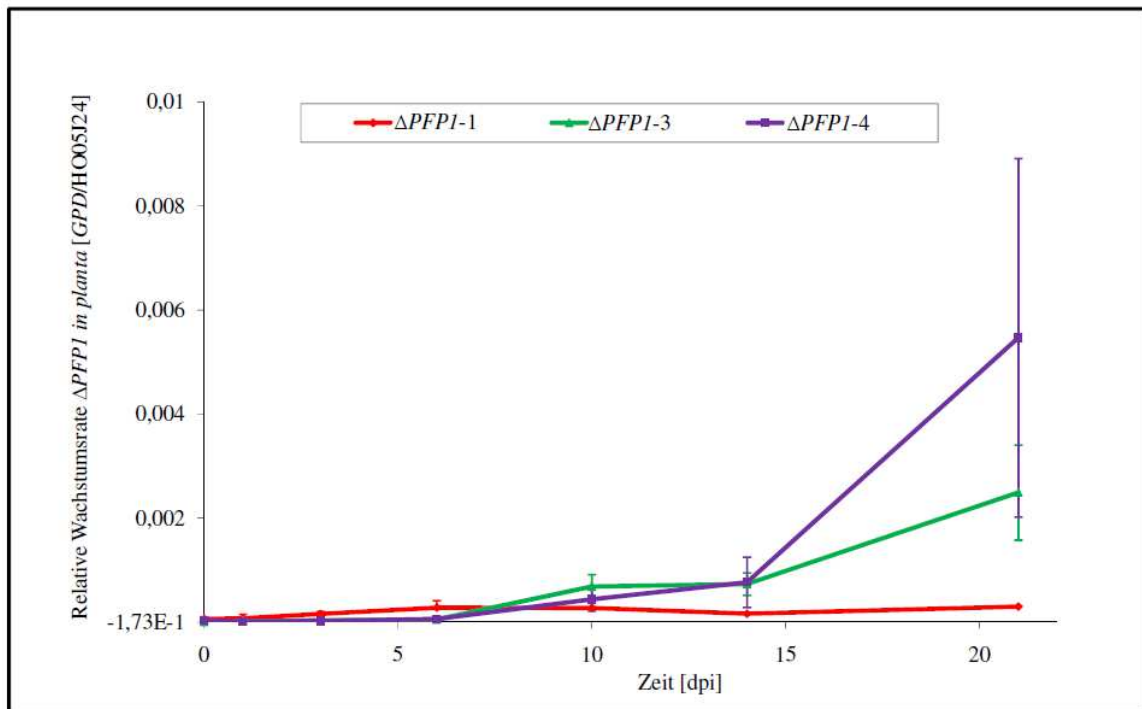


Abbildung 3.56b

Abbildung 3.56: Grafische Darstellungen des pilzlichen Wachstums der *PFPI*-Deletionsmutanten sowie des Wildtyps UK7 *in planta*.

Die Abbildungen zeigen den Verlauf des Wachstums der drei Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 auf der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid über einen Zeitraum von 21 Tagen nach Inokulation. Abbildung 3.56a zeigt alle vier Pilz-Pflanze-Interaktionen in einem Diagramm. In Abbildung 3.56b ist das Wachstum der drei Deletionsmutanten in einer den niedrigeren Werten angepassten Skalierung dargestellt (y-Achse).

3.5.3.2 Untersuchungen zum Wachstum *ex planta*

Neben den Analysen *in planta* wurde das Wachstum der Deletionsmutanten auch *ex planta* überprüft. Dazu wurden diese in zwei unabhängigen Versuchsansätzen sowohl im Flüssigmedium (FRIES) als auch auf festem Nährboden (Limabohnenagarplatten) angezogen.

Für das erste der beiden Experimente wurden 50 ml-Reaktionsröhrchen mit FRIES-Medium gefüllt und mit Konidiosporen der Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 beimpft. Versuch I wurde mit jeweils 1000 Sporen, Versuch II mit 10000 Sporen pro Reaktionsröhrchen angesetzt. Alle Ansätze wurden für jede Mutante sowie den Wildtyp dreimal biologisch (drei unabhängig voneinander isolierte Sporensuspensionen) und jeweils zweimal technisch (jeweils zwei Versuchsansätze pro Sporensuspension) repliziert. Die Reaktionsröhrchen wurden bei 17°C im Dunkeln waagrecht auf einem Schüttler inkubiert. Das gewachsene Pilzmyzel wurde nach Entfernen des Flüssigmediums ausgewogen. Die Röhrchen des Versuchsansatzes II wurden bereits nach 14 Tagen analysiert. Da im Ansatz I zu diesem Zeitpunkt die Masse an gewachsenem Myzel noch zu gering war, um sie durch Auswiegen bestimmen zu können, wurden diese Röhrchen erst nach 21 Tagen ausgewogen. Abbildung 3.57a zeigt die fotografische Dokumentation des in den Reaktionsröhrchen gewachsenen Myzels nach 14 bzw. 21 Tagen. Alle Deletionsmutanten zeigen gegenüber dem Wildtyp ein deutlich reduziertes Wachstum. Die quantitative Auswertung des Experimentes ist grafisch in Abbildung 3.57b gezeigt. In beiden Versuchsansätzen konnte bei allen Deletionsmutanten eine signifikante Reduktion der pilzlichen Biomasse im Vergleich zu UK7 nachgewiesen werden.

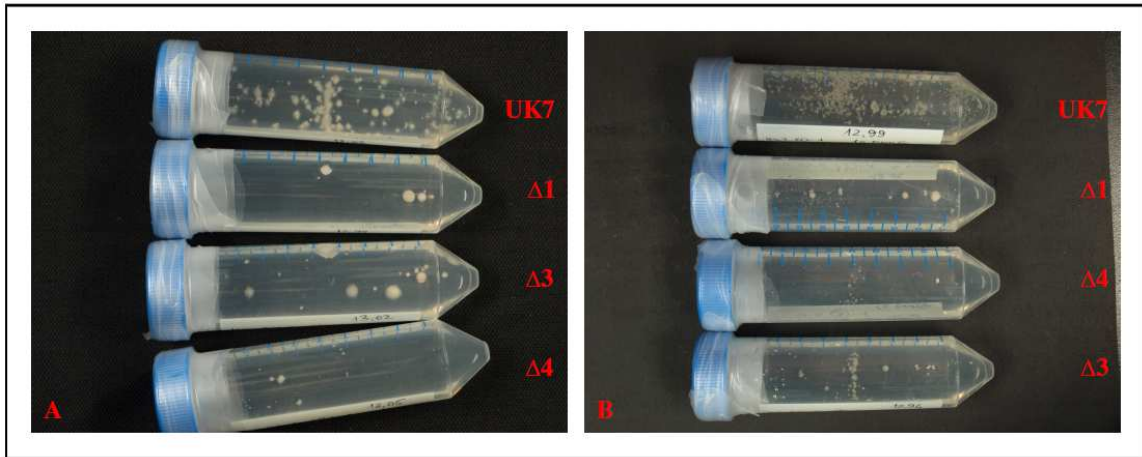


Abbildung 3.57a

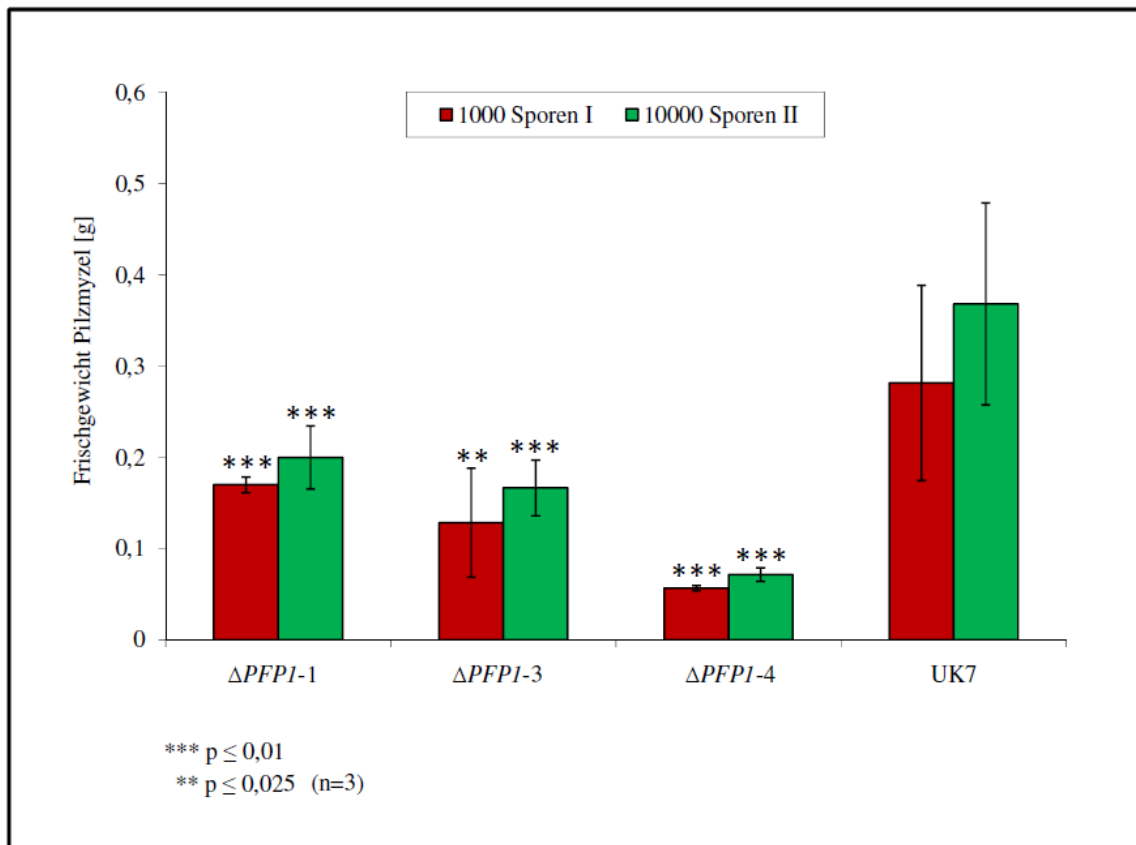


Abbildung 3.57b

Abbildung 3.57: Quantitative Auswertung der im Flüssigmedium durchgeführten Wachstumsversuche.

Abbildung 3.57a zeigt die im Flüssigmedium angezogenen Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 ($\Delta 1$, $\Delta 3$, $\Delta 4$) sowie UK7 in 50 ml-Reaktionsröhrchen nach 14 (Versuch II, 10000 Sporen, B) bzw. nach 21 Tagen (Versuch I, 1000 Sporen, A).

In Abbildung 3.57b ist die quantitative Auswertung beider Versuchsreihen dargestellt. Die ermittelte Biomasse des gewachsenen pilzlichen Myzels aller technischen und biologischen Replikate wurden gemittelt und die jeweiligen Gesamtmengen in Gramm Frischgewicht im Säulendiagramm grafisch dargestellt. Zur Bestimmung der Signifikanz der Werte wurde der t-Test angewandt.

p – Wahrscheinlichkeit der Signifikanz; n – Freiheitsgrad, entsprechend der Anzahl der biologische Replikate

Für das zweite Experiment zur Analyse des pilzlichen Wachstums *ex planta* wurden Limabohnenagarplatten mit Konidiosporen der drei Deletionsmutanen und UK7 in wässrigen Lösungen beimpft. Die Sporensuspensionen wurden dabei so verdünnt, dass pro Tropfen ca. 100 Konidiosporen auf die Platten gebracht wurden. Dieser Vorgang wurde mit jeweils drei biologischen Replikaten (drei unterschiedliche Sporenpräparationen) viermal technisch wiederholt (vier Tropfen pro Agarplatte). Abb. 3.58 zeigt die betroffenen Agarplatten nach 10 Tagen bzw. 20 Tagen Inkubation bei 17°C. Die Aufnahmen nach 10 Tagen wurden unter 0,65-facher Vergrößerung mit einem Stereomikroskop (Stemi 2000) der Firma Zeiss erstellt (Abb. 3.58a). Nach 20 Tagen wurden die Platten mit einer Digitalkamera fotografiert (Abb. 3.58b). Die Abbildungen zeigen sowohl mikro- als auch makroskopisch eine deutlich reduzierte pilzliche Biomasse aller Deletionsmutanten gegenüber dem Wildtyp UK7. Um diesen Sachverhalt quantitativ erfassen zu können, wurde nach 10 Tagen die Gesamtfläche des pro Tropfen gewachsenen Pilzmyzels aller Mutanten und des Wildtyps ausgemessen (AxioVision LE, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Pro zu untersuchendem Pilzisolat wurden drei biologische und jeweils drei technische Replikate bestimmt und die erhaltenen Werte gemittelt. Die Resultate sind in Abbildung 3.58c grafisch dargestellt. Alle drei untersuchten $\Delta PFPI$ -Mutanten zeigen ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zu UK7. Nur ca. 10% der vom Wildtyp bewachsenen Myzelfläche werden von den Deletionsmutanten abgedeckt. Dabei kann jedoch nicht nachgewiesen werden, ob die reduzierte Biomasse auf ein allgemein langsames Wachstum der Mutanten oder aber auf eine veränderte Keimungsrate der Konidiosporen zurückzuführen ist. Diese Frage sollte durch nachfolgende Untersuchungen zur Sporenkeimung beantwortet werden.

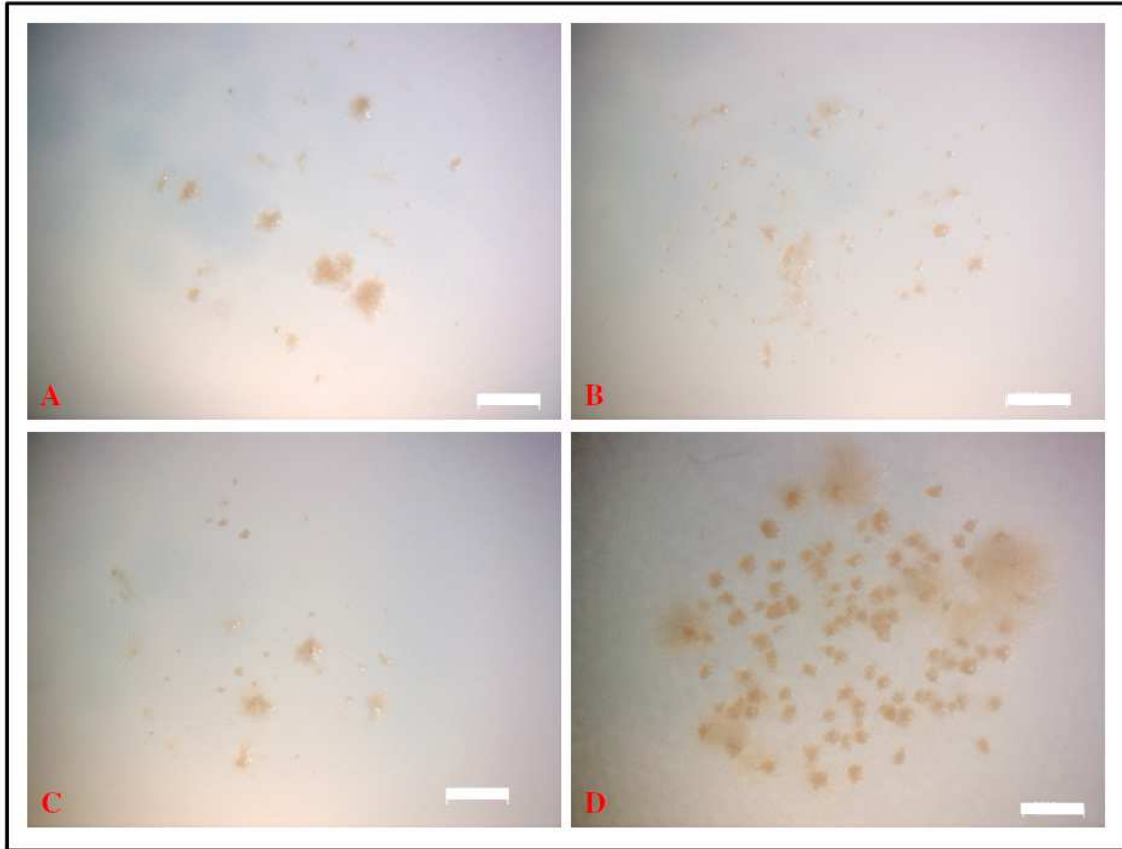


Abbildung 3.58a

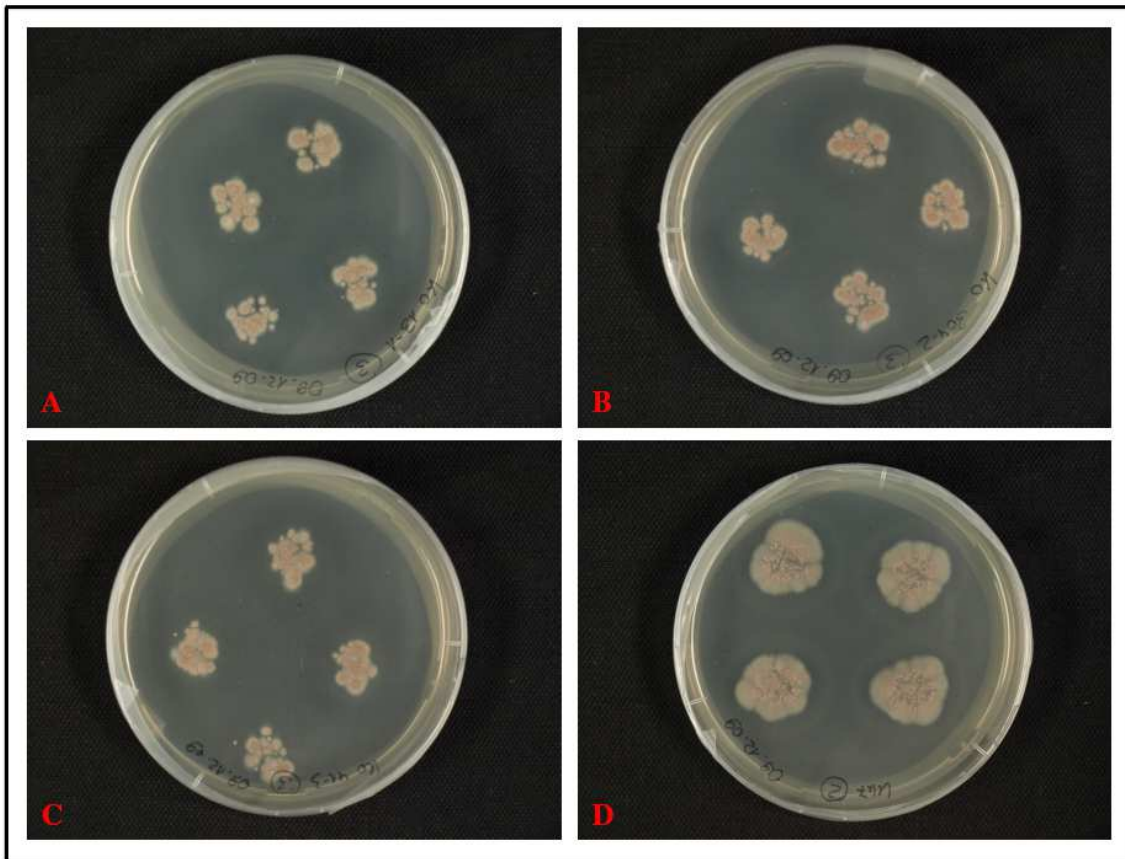


Abbildung 3.58b

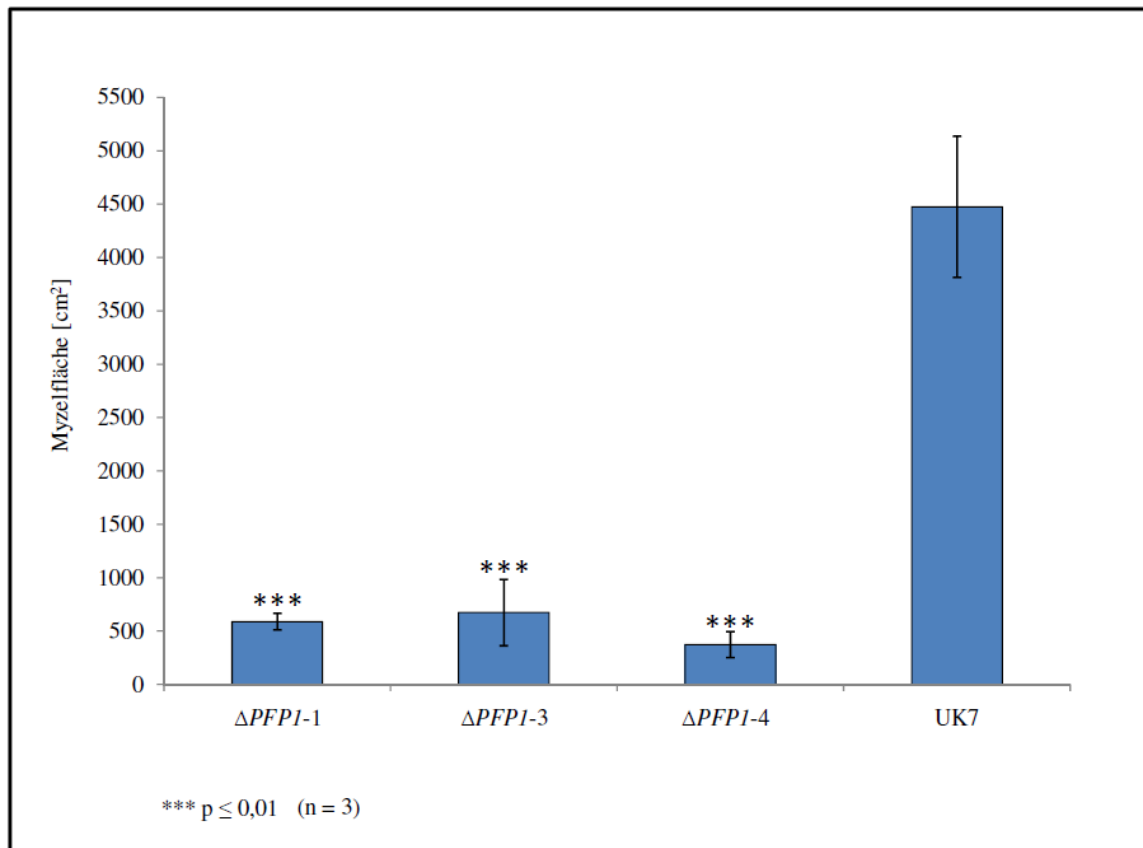


Abbildung 3.58c

Abbildung 3.58: Mikroskopische und fotografische Dokumentationen der mit Konidiosporensuspensionen der Deletionsmutanten und des Wildtyps beimpften Limabohnenagarplatten sowie quantitative Auswertung der jeweils ausgemessenen Myzelflächen.

Die Abbildungen 3.58a und b zeigen die mit Sporensuspensionen betroffenen Limabohnenagarplatten. Abbildung 3.58a zeigt jeweils einen Tropfen der Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 (A, B, C) und des Wildtyps (D) in 0,65-facher Vergrößerung nach zehntägiger Inkubationszeit. In Abbildung 3.58b sind die Agarplatten nach weiteren zehn Tagen Inkubation fotografisch dokumentiert (Reihenfolge wie in 3.58a).

Die Abbildung 3.58c zeigt grafisch die Auswertung der nach zehn Tagen ermittelten Myzel-Gesamtflächen der drei Deletionsmutanten verglichen mit dem Wildtyp UK7. Als Signifikanztest diente der t-Test. p – Wahrscheinlichkeit der Signifikanz der Werte; n – Freiheitsgrad (Anzahl biologischer Replikate)

3.5.4 Untersuchungen zur Konidiosporen-Keimung der $\Delta PFPI$ -Mutanten

Nach den durchgeführten Wachstumsanalysen konnten keine sicheren Aussagen darüber getroffen werden, ob die jeweils signifikant reduzierte Biomasse der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp aus einer eingeschränkten Keimungsrate der Konidiosporen, oder aus einer insgesamt verlangsamten Entwicklung der Pilzmutanten resultierte. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Keimungsversuche mit den Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie mit UK7 durchgeführt. Dazu wurden jeweils 5000 Konidiosporen der Deletionsmutanten und von UK7 auf mit Limabohnenagar beschichtete Objektträger gegeben. Für die Mutanten und den Wildtyp wurden jeweils vier biologische Replikate angesetzt. Diese wurden in sterilen Petrischalen bei 17°C im Dunkeln 24 und 48 h inkubiert. Zu beiden Zeitpunkten wurden Keimungsrate, Keimhyphenzahl pro Spore und Länge der Keimhyphen bestimmt.

3.5.4.1 Bestimmung der Sporen-Keimungsrate

Für die Ermittlung der Keimungsrate wurden jeweils dreimal 100 Sporen ausgezählt (entsprechend drei technischen Replikaten). Zahlenmäßig erfasst wurden dabei die Konidiosporen, die nach den jeweiligen Zeitpunkten noch keine Keimhyphen ausgebildet hatten. Abb. 3.59 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen keimender Konidiosporen der Deletionsmutanten sowie des Wildtyps nach 24 und 48 Stunden. Die erhaltenen Werte der Auszählung wurden gemittelt und im Säulendiagramm grafisch dargestellt (Abb. 3.60). Der Wildtyp UK7 zeigt eine durchschnittliche Keimungsrate von 97%. Dabei ist dieser Wert schon nach 24 Stunden erreicht und ändert sich nach einem weiteren Tag nicht mehr wesentlich. Die Konidiosporen des Wildtyps sind also nach 24 Stunden nahezu vollständig ausgekeimt. Die Deletionsmutanten zeigen nach einem Tag eine durchschnittliche Keimungsrate von 70 bis 80%. Im Gegensatz zum Wildtyp ist hier allerdings noch nicht die maximale Keimungsrate erreicht. Alle Mutanten zeigen eine zeitlich verzögerte Keimung, weshalb sich die Rate nach 48 Stunden auf durchschnittlich 90% erhöht. Nach Anwendung des t-Tests konnte die reduzierte Sporen-Keimung der Deletionsmutanten zu beiden analysierten Zeitpunkten als statistisch signifikant im Vergleich zum Wildtyp eingestuft werden. Eine Erklärung für die in den Wachstumsanalysen festgestellte stark eingeschränkte Biomassen-Produktion der Mutanten kann daraus jedoch nicht abgeleitet werden. Vielmehr sind nahezu alle eingesetzten Konidiosporen der Deletionsmutanten auch keimungsfähig.

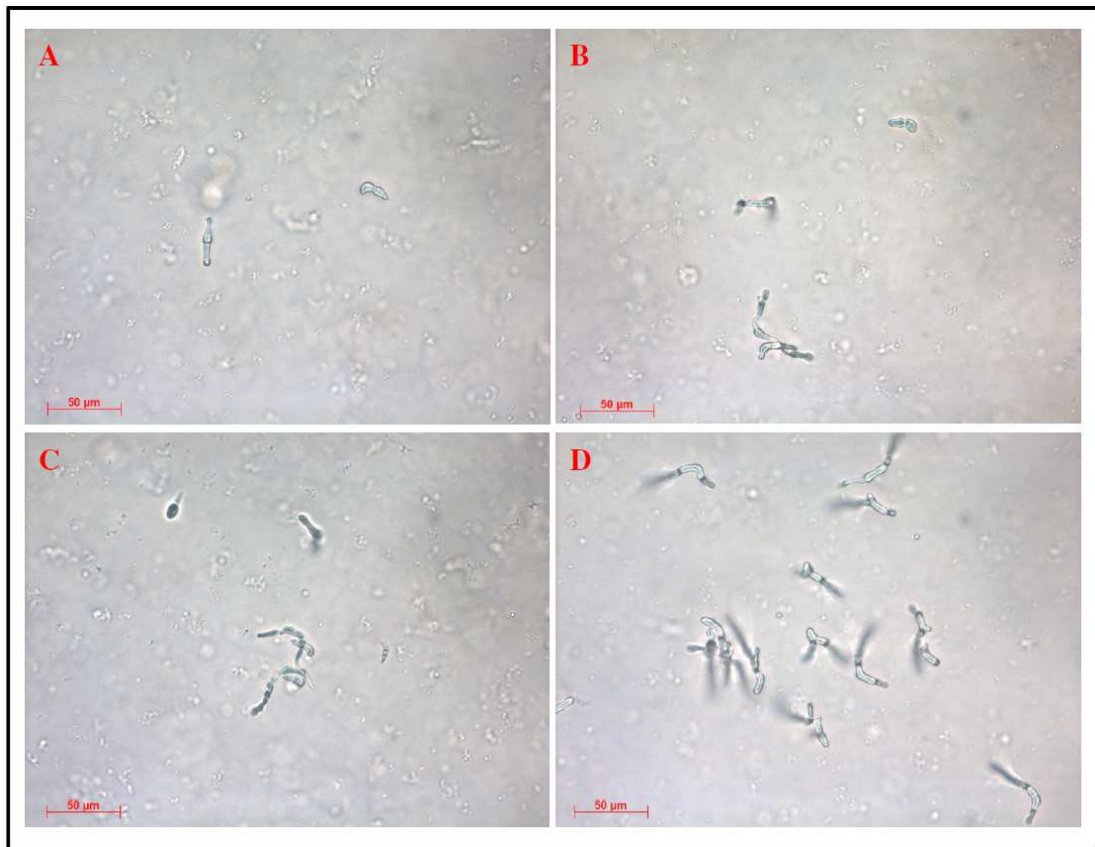


Abbildung 3.59a

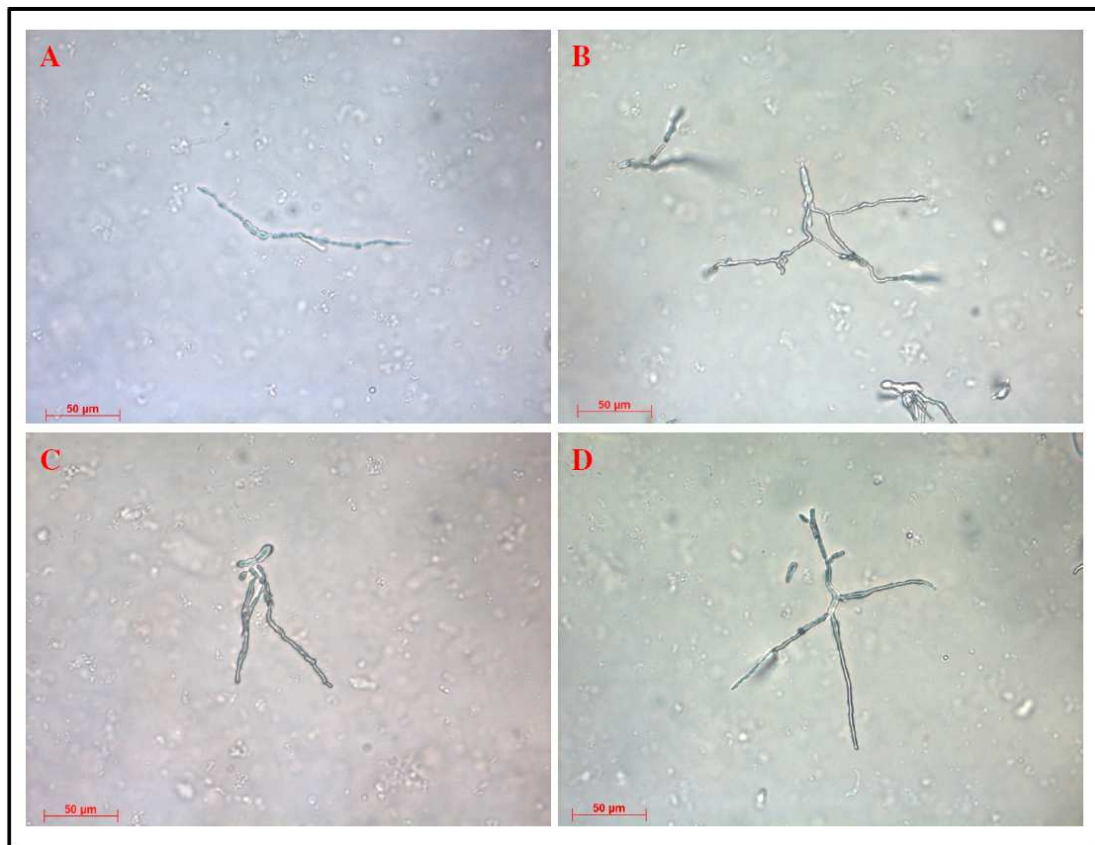


Abbildung 3.59b

Abbildung 3.59: Keimende Konidiosporen der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyp-Isolats UK7 auf Limabohnenagar.

Die Abbildungen 3.58a und b zeigen die mikroskopischen Aufnahmen keimender Konidiosporen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 (A, B und C) sowie des Wildtyps UK7 (D) nach 24 (3.58a) und 48 (3.58b) Stunden. Alle Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen.

Maßstabsbalken – 50 μ m

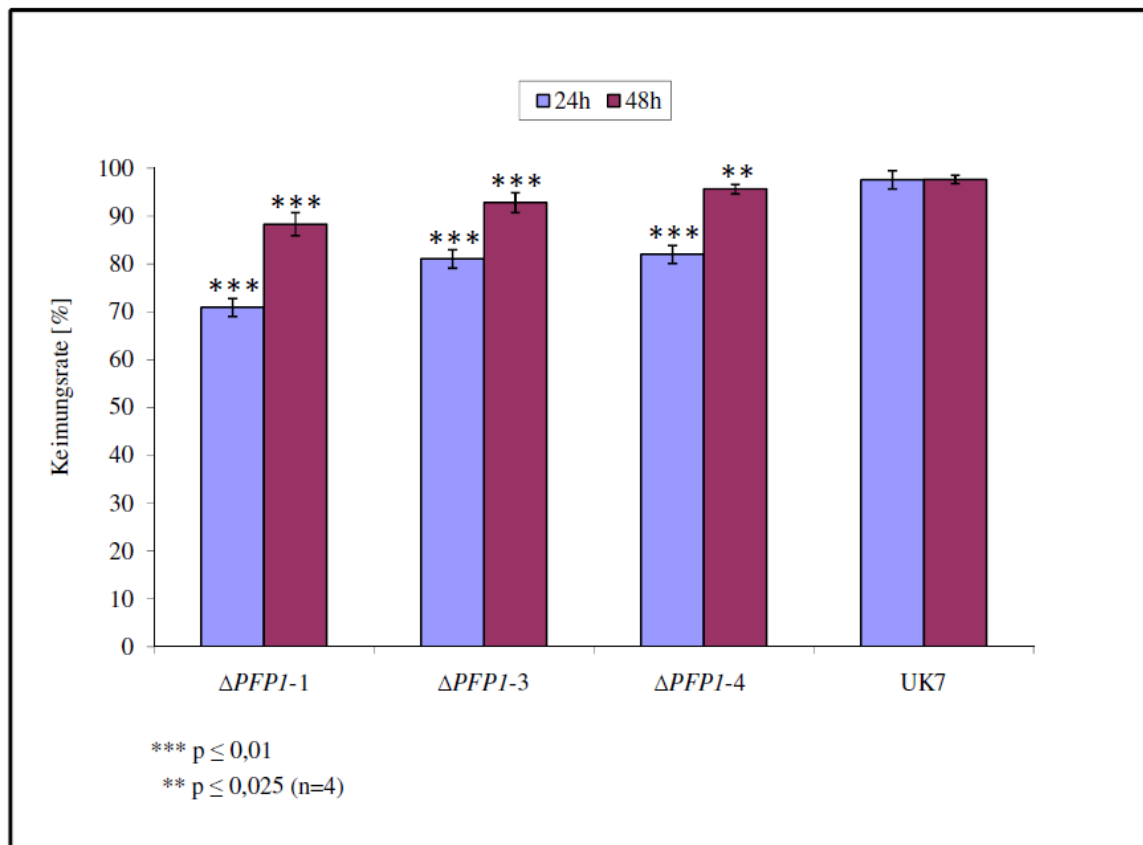


Abbildung 3.60: Keimungsraten der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7.

Das Diagramm zeigt die durch Auszählung ermittelten Keimungsraten der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyps UK7 nach 24 und 48 Stunden. Die Werte wurden aus vier biologischen und jeweils drei technischen Replikaten gemittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung aus den vier biologischen Wiederholungen an. Zur statistischen Absicherung wurde der t-Signifikanztest angewendet. p – Wahrscheinlichkeit der Signifikanz der Werte; n – Freiheitsgrad (Anzahl biologischer Replikate)

3.5.4.2 Bestimmung der Anzahl gebildeter Keimhyphen

Zur Ermittlung der Anzahl der während der Keimung gebildeten Keimhyphen pro Konidiospore wurden die gebildeten Keimschläuche nach 48 h ausgezählt. Dabei wurden jeweils 100 Sporen pro biologisches Replikat analysiert. Die quantitative Auswertung der durchschnittlich gebildeten Zahl an Keimschläuchen pro Spore ist in Abbildung 3.61 grafisch dargestellt. Während der Wildtyp meist vier Keimschläuche ausbildet (zwei pro

Zelle), wachsen bei den Deletionsmutanten im Durchschnitt nur zwei bis drei. Die bei der Auszählung ermittelten Einzelwerte entsprachen sowohl beim Wildtyp als auch bei den Deletionsmutanten einer Gauß'schen Normalverteilung. In der Abb. 3.61 sind die Mittelwerte aus jeweils vier biologischen Replikaten aufgetragen. Die Signifikanz der Werte wurde mittels statistischem t-Test überprüft. Alle drei Deletionsmutanten zeigen eine verminderte Keimschlauchausbildung.

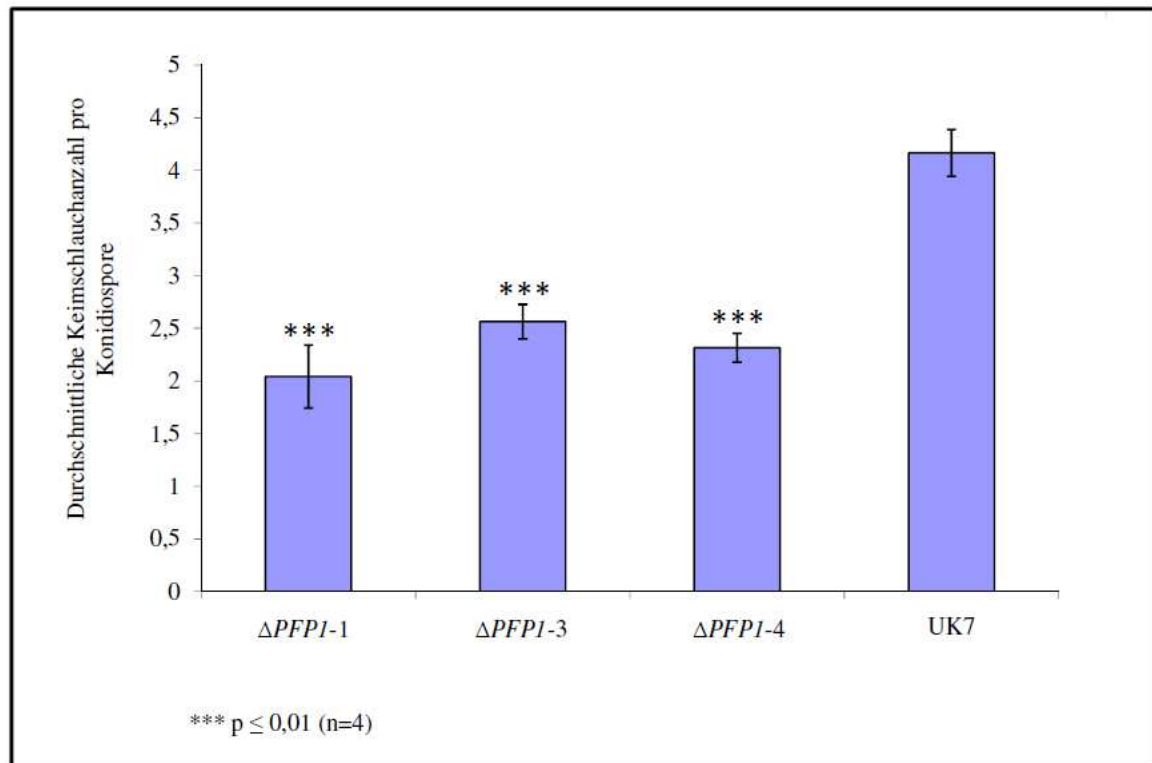


Abbildung 3.61: Keimhyphenanzahl der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7.

Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Anzahl an Keimhyphen, die pro Konidiospore sowohl bei den Deletionsmutanten als auch beim Wildtyp UK7 nach 48 h ausgebildet werden. Es wurden jeweils 100 Konidiosporen ausgezählt. Die Werte wurden aus vier biologischen Replikaten gemittelt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung der vier Ansätze an. Als Signifikanztest wurde der t-Test angewandt.

p – Wahrscheinlichkeit der Signifikanz; n – Freiheitsgrad (Anzahl biologischer Replikate)

3.5.4.3 Bestimmung der Keimhyphenlänge

Im dritten Teilexperiment zur Konidiosporen-Keimung wurde die Länge der ausgebildeten Keimschläuche aller $\Delta PFPI$ -Mutanten und des Wildtyps UK7 nach 48 h bestimmt (AxioVision LE, Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Für jedes biologische Experiment wurden 30 bis 40 Keimschläuche vermessen und die erhaltenen Werte gemittelt. Die Standardabweichung wurde aus den vier biologischen Replikaten bestimmt. Die erhaltenen Mittelwerte der Keimschlauchlängen sind in Abb. 3.62 grafisch

dargestellt. Wie auch schon bei den anderen Teilerperimenten zeigen die Deletionsmutanten vom Wildtyp abweichende Werte. Während bei UK7 die Länge der Keimhyphen nach 48 h durchschnittlich bereits über 100 μm erreicht hat, zeigen die Mutanten nur eine Länge von 50 bis höchstens 70 μm . Die Keimhyphen der drei Deletionsmutanten sind also im Durchschnitt nach 48 h um die Hälfte kürzer als die des Wildtyps. Dies entspricht einer Verringerung um den Faktor 1,5 bis 2, ähnlich wie bei der Ermittlung der Keimschlauchanzahl.

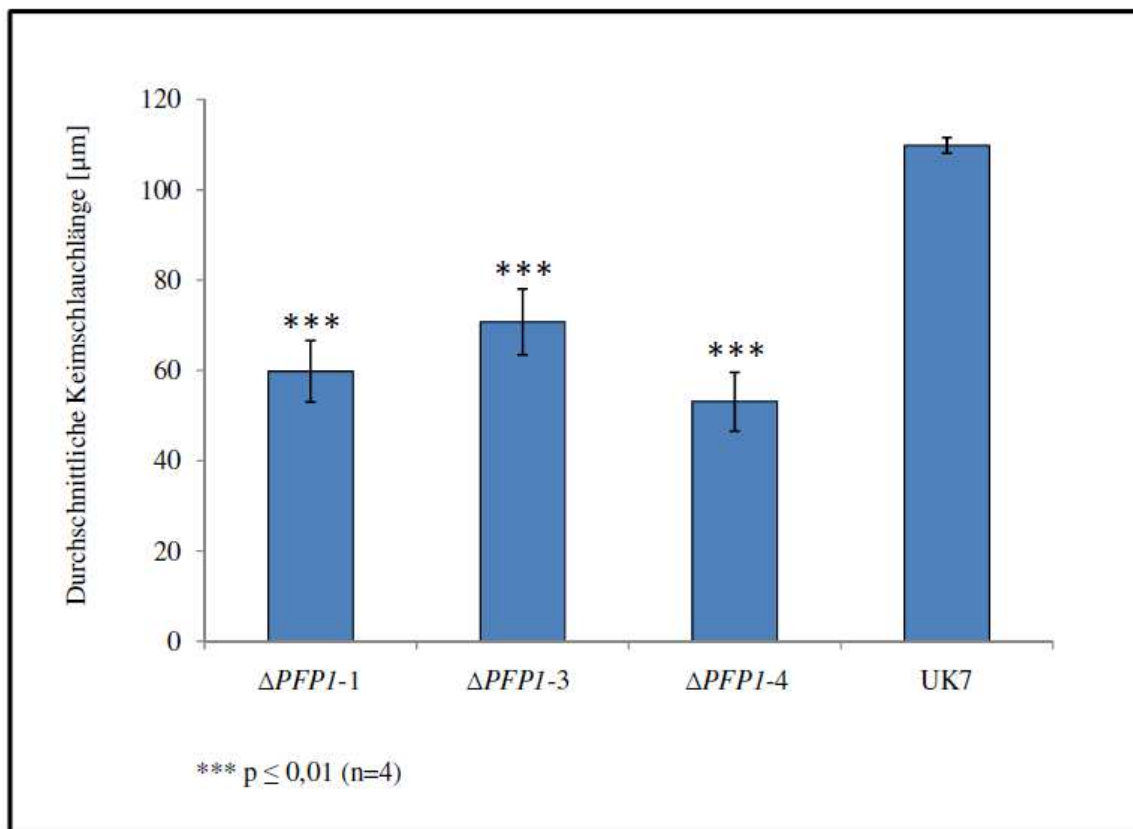


Abbildung 3.62: Keimhyphenlängen der $\Delta PFPI$ -Mutanten sowie des Wildtyps UK7.

Das Diagramm zeigt die durchschnittliche Länge der Keimschläuche, der drei Deletionsmutanten und des Wildtyps UK7 nach 48 h auf Limabohnenagar. Die Säulen geben die Mittelwerte aller Keimschlauchlängen aus den vier biologischen Replikaten an. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der vier Wiederholungen. Die Signifikanz der Werte wurde mittels statistischen t-Tests ermittelt.

p – Wahrscheinlichkeit der Signifikanz; n – Freiheitsgrade (Anzahl biologischer Wiederholungen)

3.6. Komplementation der $\Delta PFPI$ -Mutanten

3.6.1 Generierung der Komplementationsmutanten

Ein wesentlicher Schritt zur weiteren Charakterisierung des *PFPI*-Gens war die Komplementation der Deletionsmutanten mit dem Wildtyp-Gen. Ziel war es hierbei, die Mutanten erneut zu transfizieren, wobei die vollständige *PFPI*-Wildtyp-Sequenz wieder in das Genom inserieren sollte. Erwartet wurde dabei die genetische Rückführung der Mutanten in den Wildtyp-Status und damit die Aufhebung bzw. Ausgleichung des Mutanten-Phänotyps. Für die Konstruktion des für die Komplementation genutzten Vektors wurden die gesamte genomische *PFPI*-Sequenz (5977 bp) sowie eine Hygromycin-B-Resistenzkassette (2200 bp) per PCR amplifiziert (Abb. 3.63) und anschließend in den Klonierungsvektor pCR2.1 kloniert (Abb. 3.64; vgl. Abb. 7.4.4). Die Komplementationsmutanten mussten auf Hygromycin B selektiert werden, da die Deletionsmutanten bereits eine Phleomycin-Resistenz trugen. Der konstruierte Komplementationsvektor pCR2.1-HPH-PFP1 ist in Abb. 3.64a schematisch dargestellt. Für die Vektorkontrollen wurde das Konstrukt pCR2.1-HPH eingesetzt (Abb. 3.64b).

Zehn Tage altes Myzel der Mutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 und -4 wurde protoplastiert und transfiziert. Die Protoplastierung der Deletionsmutanten fand über Nacht bei 29°C und 40 rpm statt, da nach den üblichen sechs Stunden noch keine genügende Anzahl an Protoplasten nachzuweisen war. Da bei der Mutante $\Delta PFPI$ -1 auch nach dieser Zeitspanne nicht die erforderliche Zahl von 5×10^7 Protoplasten pro ml erreicht werden konnte, wurden alle bis dahin gebildeten Protoplasten für die Transfektion mit dem Komplementationsvektor eingesetzt. Vektorkontrollen konnten somit nur von den anderen drei Mutanten generiert werden. Die Transfektionsansätze wurden auf Limabohnenagarplatten mit Saccharose ausgestrichen und nach 24 h mit Hygromycin-B-Lösung überschichtet. Nach 14 d Inkubation bei 17°C im Dunkeln wurden die gewachsenen Pilzkolonien isoliert und auf neuen Limabohnenagar-Selektionsplatten vereinzelt. Nach weiteren 14 d wurde eine Auswahl der Transformanten erneut umgesetzt. Teile der gewachsenen Kolonien auf den Vereinzlungsplatten wurden in Kugelmühlen-Reaktionsröhrchen überführt und zur späteren PCR-Analyse bei -20°C eingefroren.

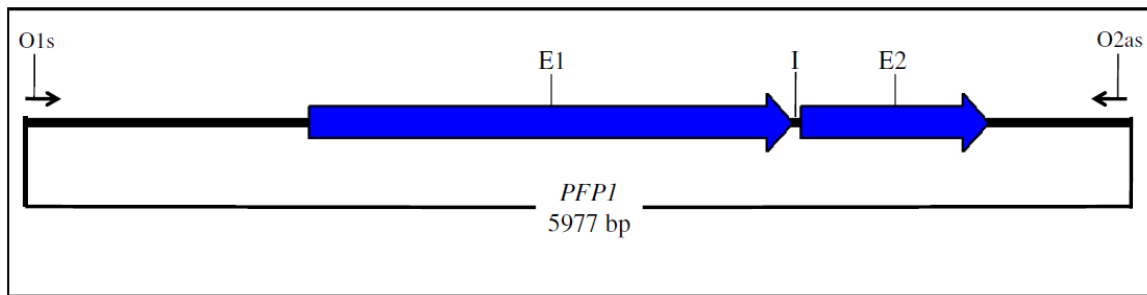


Abbildung 3.63a

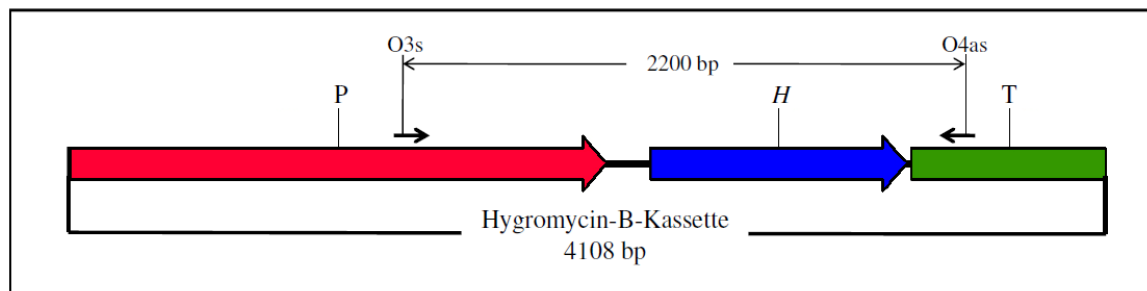


Abbildung 3.63b

Abbildung 3.63: Für die Klonierung des Komplementationsvektors amplifizierte Konstrukte.

Die Abbildungen zeigen die Genstruktur des *PFPI*-Gens (a) sowie der Hygromycin-B-Resistenzkassette (b) mit den jeweiligen Bindungsstellen der Oligonukleotide (O1s – O4as). Die gesamte amplifizierte *PFPI*-Sequenz von 5977 bp und 2200 bp der Hygromycin-Kassette wurden zur Konstruktion des Komplementationsvektors und der Vektorkontrolle genutzt.

E1 bzw. E2 – Exon 1 und 2 der *PFPI*-Gensequenz; I – Intron der *PFPI*-Sequenz; P – Promotorsequenz der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* (P_{gpd}); H – kodierende Sequenz der Hygromycin-B-Phosphotransferase (*HPH*), T – Terminator-Sequenz des *TRPC*-Gens aus *A. nidulans* (T_{trpC}); O1s und O2as – PFP48s und PFP49as (#70/#71); O3s und O4as – GFP-Fus-HPH1-2s und GFP-Fus-HPH2as (#28/#29)

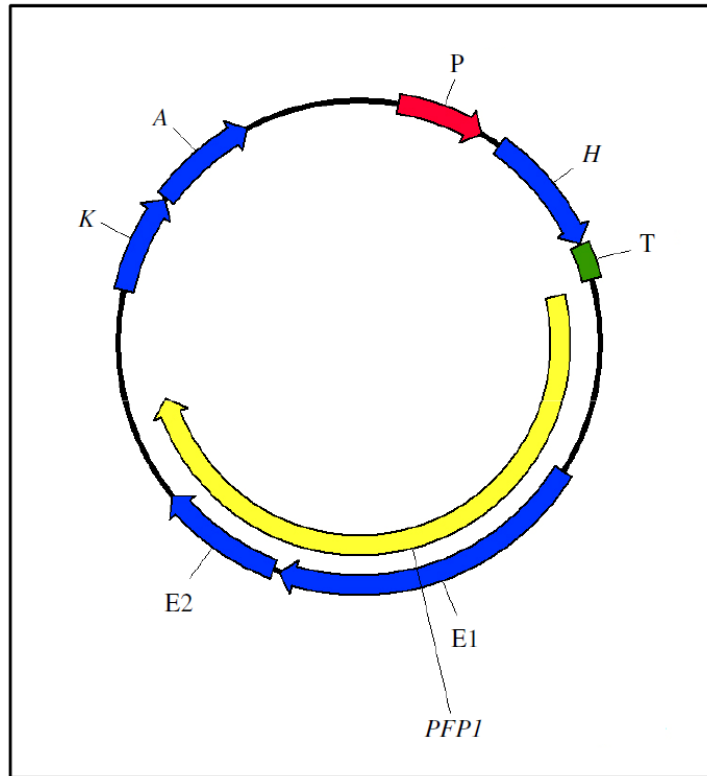


Abbildung 3.64a

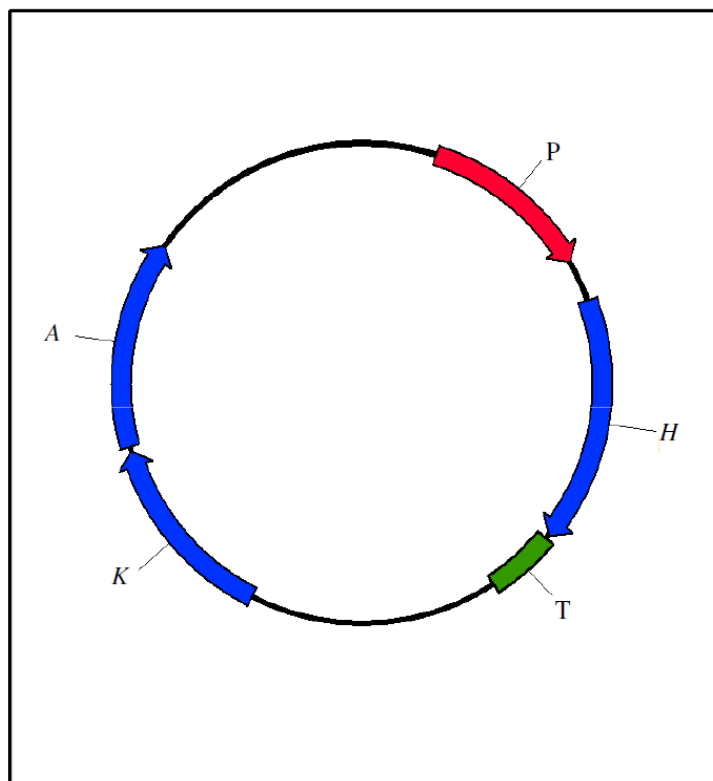


Abbildung 3.64b

Abbildung 3.64: Komplementationsvektor pCR2.1-HPH-PFP1 sowie des Kontrollvektor pCR2.1-HPH.

Die Abbildungen zeigen die Vektorkonstrukte pCR2.1-HPH-PFP1 (a, 12128 bp) und pCR2.1-HPH (b, 6145 bp). Der Klonierungsvektor pCR2.1 enthält Ampicillin (A)- und Kanamycin (K)- Resistenzkassetten. Für die Konstruktion der für die Komplementation genutzten Vektoren wurden die *PFPI*-Gensequenz sowie die Hygromycin-B-Resistenzkassette in die *multiple cloning site* des Vektors kloniert.

E1 bzw. E2 – Exon 1 und 2 der *PFPI*-Gensequenz; P – Promotorsequenz der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* (P_{gpd}); H – kodierende Sequenz der Hygromycin-B-Phosphotransferase (*HPH*), T – Terminator-Sequenz des *TRPC*-Gens aus *A. nidulans* (T_{trpC}).

3.6.2 Charakterisierung der Δ *PFPI*-Komplementationsmutanten

Jeweils sechs Komplementationsmutanten bzw. drei Vektorkontrollen wurden zufällig ausgewählt und erneut auf Agarplatten umgesetzt. Gleichzeitig wurden von diesen Mutanten Myzelstückchen zur Isolierung der genomischen DNA bei -20°C eingefroren. Die ausgewählten Transformanden wurden zunächst per PCR verifiziert, gefolgt von Analysen zur *PFPI*-Expression *ex planta*. Durch Inokulation suszeptibler Pflanzen sowie mikroskopische Analysen *ex planta* und *in planta* sollten Aufschluss über den Phänotyp der Mutanten und damit die Komplementation des *PFPI*-Gens geben.

3.6.2.1 Verifizierung der Δ *PFPI*-Komplementationsmutanten durch PCR

Die Verifizierung der erfolgreichen Transfektion der Δ *PFPI*-Mutanten mit dem Komplementationskonstrukt sowie dem Kontrollvektor erfolgte durch PCR. Dafür wurde zunächst von den ausgewählten Transformanden genomische DNA isoliert, die auf das Vorhandensein der *PFPI*-Gensequenz getestet wurde. Für die PCR wurden die Oligonukleotide PFP2as und PFP3s (#52/#51) eingesetzt. In allen Proben konnte ein DNA-Fragment in der erwarteten Größe (402 bp) nachgewiesen werden (Abb. 3.65). Die Vektorkontrollen zeigten keine Bande. Die Transfektion der Deletionsmutanten mit dem Komplementationskonstrukt war somit also erfolgreich verlaufen, da in allen untersuchten Transformanden die *PFPI*-Gensequenz ins Genom integriert wurde. Die für diese Arbeit analysierten Komplementationsmutanten werden im Folgenden als Δ *PFPI*-1(bzw. -2, -3, -4)-*PFPI*-(Nr. der jeweiligen Transformande) bezeichnet.

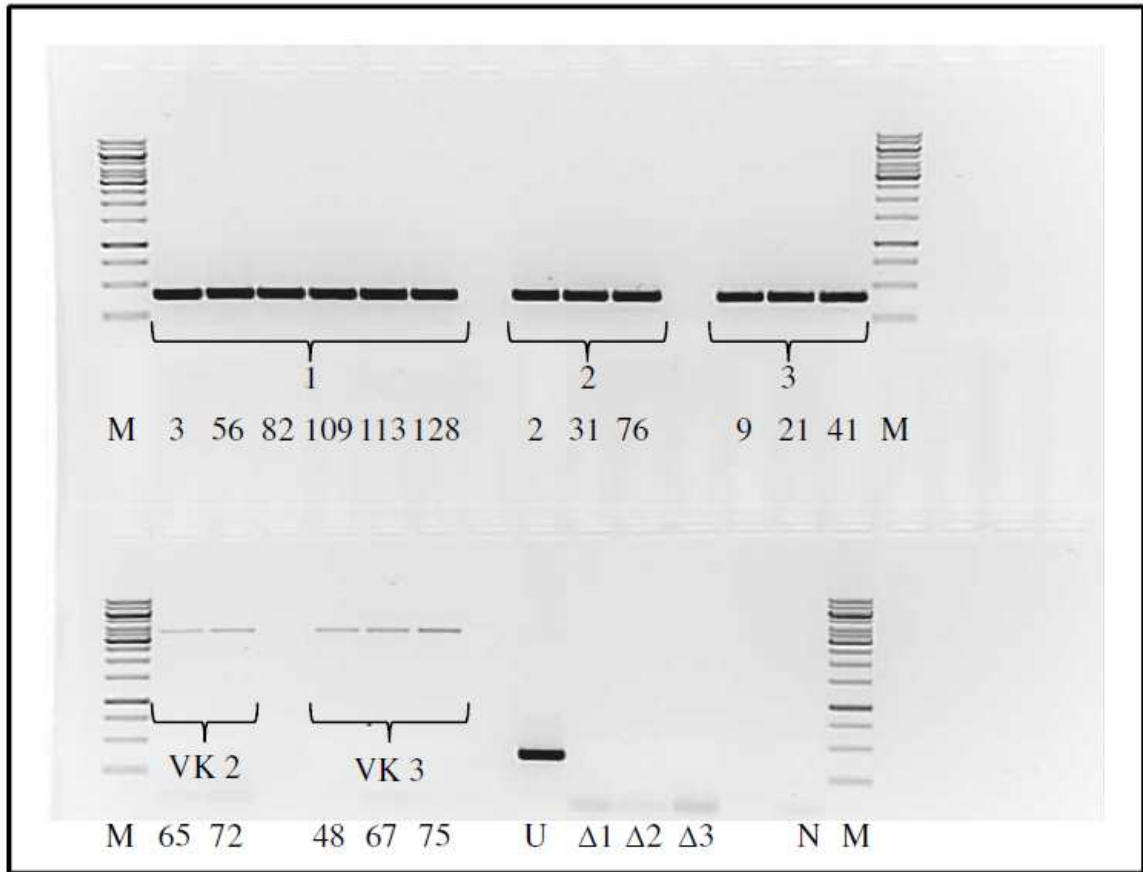


Abbildung 3.65a

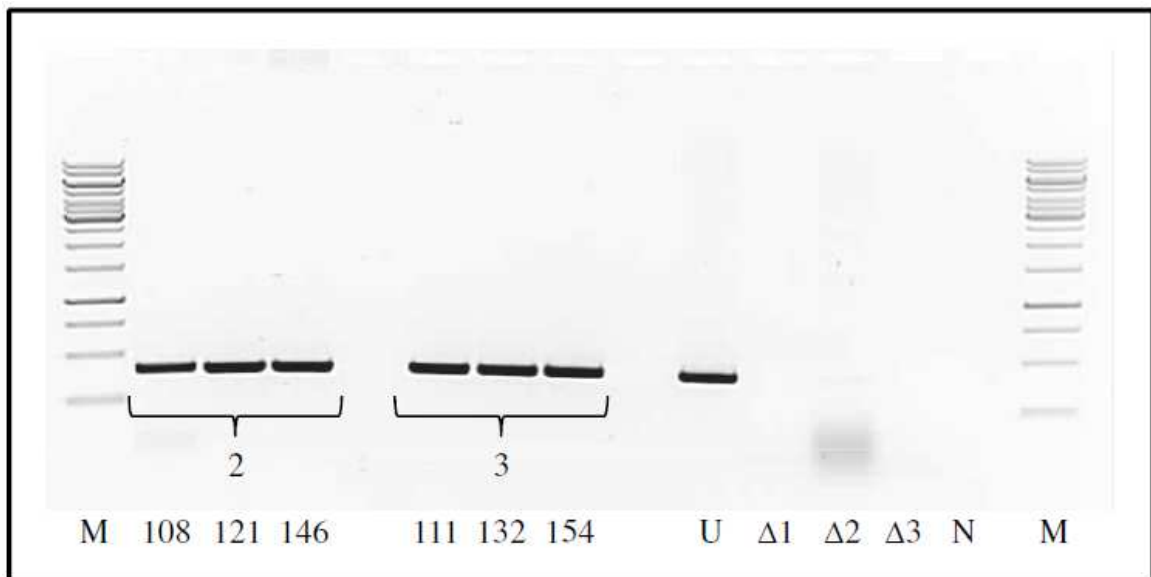


Abbildung 3.65b

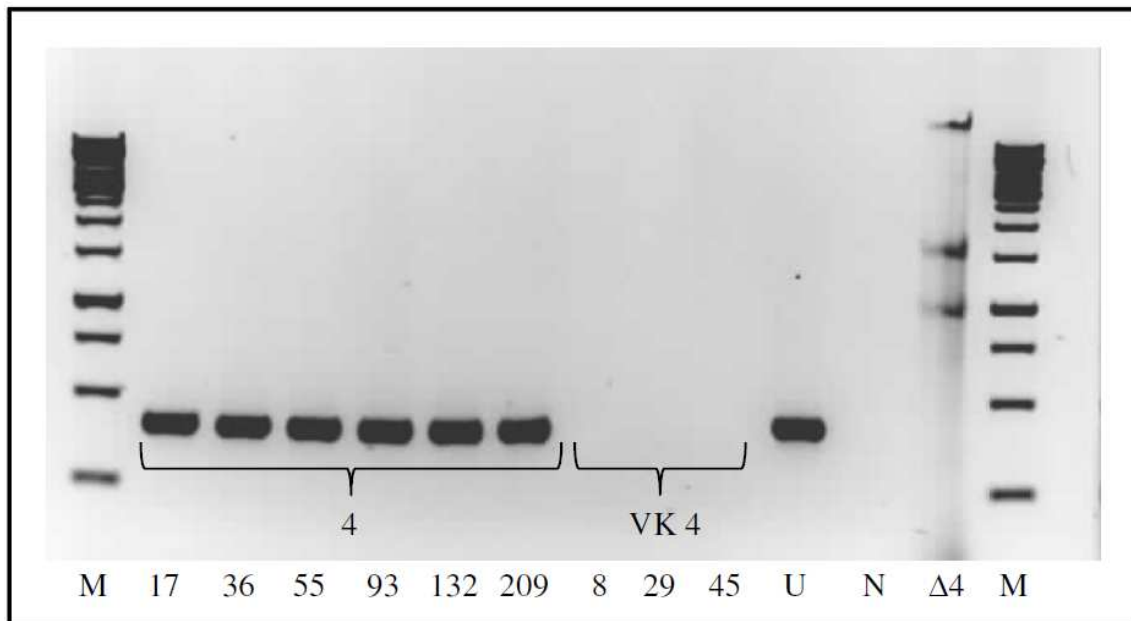


Abbildung 3.65cc

Abbildung 3.65: Gelelektrophoretische Auftrennungen der PCR-Produkte zum Nachweis der Komplementation der Deletionsmutanten mit der *PFPI*-Wildtyp-Gensequenz.

Die Abbildungen 3.65a-c zeigen jeweils die Auftrennungen der PCR zur Amplifizierung eines DNA-Fragments der Wildtyp-*PFPI*-Gensequenz zum Nachweis der Komplementation der Deletionsmutanten. Die Zahlen 1 bis 4 bezeichnen die Komplementationsmutanten der jeweils transfizierten Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 oder -4. VK2 bis 4 bezeichnen die jeweils zugehörigen Vektorkontrollen. Die Zahlen unter den DNA-Banden bezeichnen die Nummern der jeweils getesteten Transformanten. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Wildtyps UK7 (U) eingesetzt. Die Negativkontrolle der PCR enthielt keine Matrizen-DNA (N). $\Delta 1$ bis $\Delta 4$ bezeichnen die Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -2, -3 sowie -4. Als Größenstandard wurde eine 1 kb-DNA-Leiter genutzt (M).

3.6.2.2 Untersuchung der *PFPI*-Expression

Bei allen ausgewählten Komplementationsmutanten konnte die *PFPI*-Gensequenz im Genom durch PCR nachgewiesen werden. Als nächster kritischer Schritt sollte die *PFPI*-Genexpression der Mutanten analysiert werden. Für diese Untersuchungen wurden jeweils drei der sechs Komplementationsmutanten, und eine zugehörige Vektorkontrolle ausgewählt. Experimentell wurde zunächst das Vorhandensein der *PFPI*-Transkripte durch semiquantitative RT-PCR nachgewiesen und anschließend deren Expressionsrate durch quantitative Real-Time-PCR bestimmt. Die Expressionsanalysen wurden nur mit den Komplementationen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 durchgeführt. Die Expression der Komplementationsmutanten von $\Delta PFPI$ -2 wurden nicht untersucht.

Für die semiquantitative RT-PCR wurde zunächst aus allen ausgewählten Komplementationsmutanten sowie Vektorkontrollen die Gesamt-RNA des 14 Tage alten

Pilzmyzels isoliert. Als Kontrolle wurde Gesamt-RNA des Wildtyps UK7 mitgeführt. Alle Proben wurden DNase-behandelt und schließlich revers transkribiert. Die so erhaltene cDNA wurde als Matrize zum Nachweis der *PFPI*-Transkripte in eine PCR eingesetzt. Dabei wurden die genutzten Oligonukleotide so positioniert, dass ihre Bindungsstellen zum einen im ersten, zum anderen im zweiten Exon der *PFPI*-Gensequenz lagen. Als Kontrolle für die intakte cDNA wurde zusätzlich in allen Proben ein Fragment der *GPD*-Gensequenz amplifiziert. Die Abbildung 3.66 zeigt die elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Reaktionen. In 3.66a ist die PCR auf *GPD* gezeigt. In allen Proben ist ein Fragment der erwarteten Größe zu sehen. Das Gen wird demnach in allen ausgewählten Proben exprimiert und steht als Nachweis für eine intakte cDNA. Die Abbildungen 3.66b und c zeigen die PCR auf die *PFPI*-cDNA. In allen Komplementationsmutanten ist jeweils ein Fragment der richtigen Größe nachweisbar. Die *PFPI*-Gensequenz wird also unter Kontrolle des endogenen Promotors transkribiert.

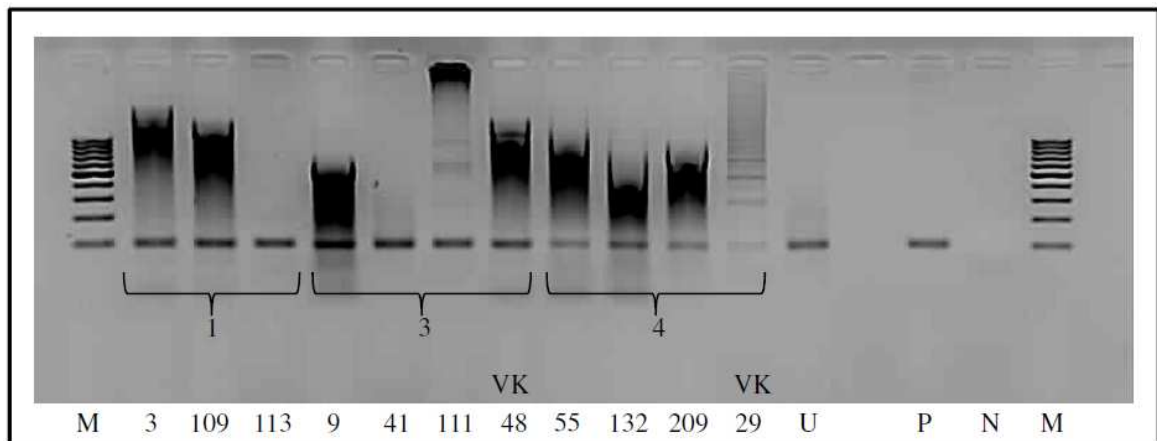


Abbildung 3.66a

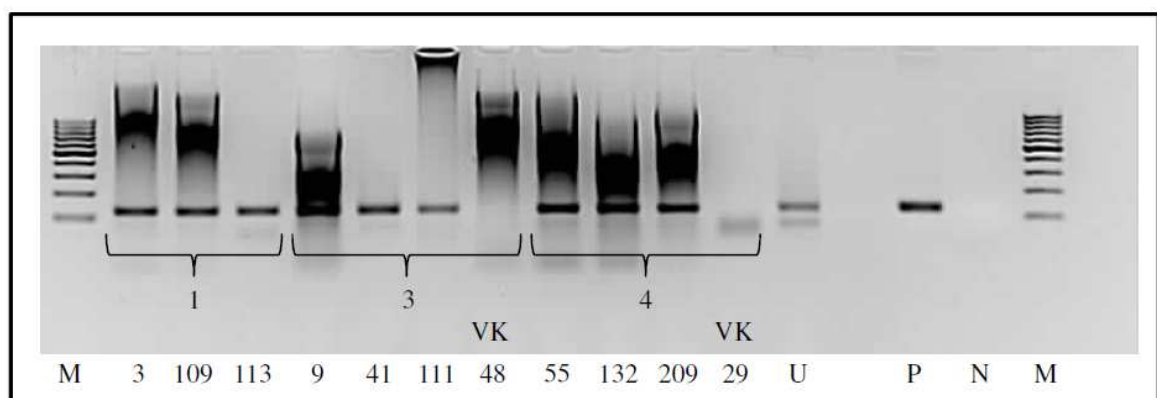


Abbildung 3.66b

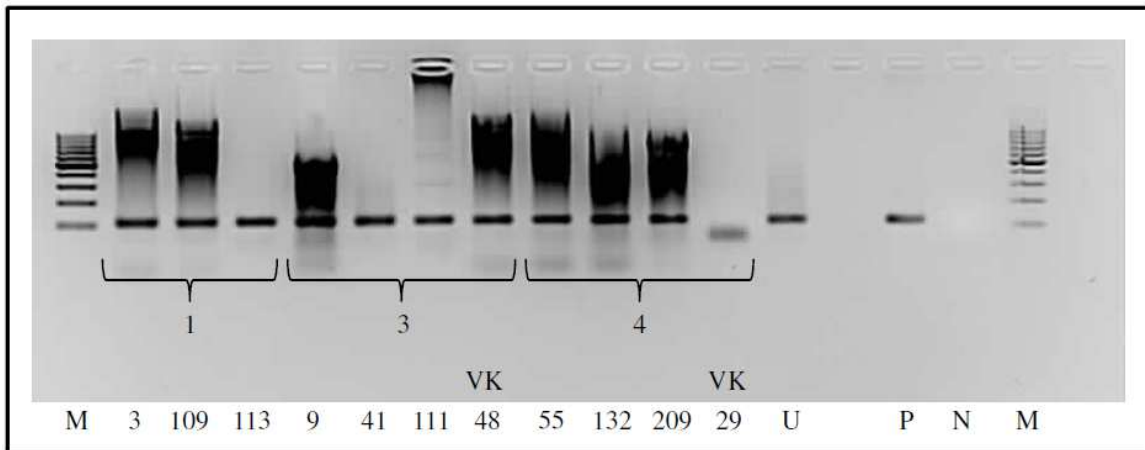


Abbildung 3.66c

Abbildung 3.66: Gelelektrophoretische Auftrennung der semiquantitativen RT-PCR zum Nachweis der *PFPI*-Genexpression der Komplementationsmutanten.

Die Abbildung 3.66a zeigt die Auftrennung der Amplifikation des *GPD*-Gens, 3.66b und c jeweils *PFPI*. Dabei wurde sowohl ein Fragment des ersten (b) sowie des zweiten Exons (c) der Gensequenz amplifiziert. Pro Deletionsmutanten (1, 3 und 4) wurden zufällig drei Komplementationsmutanten ausgewählt. Sie sind durch die Nummern am unteren Bildrand gekennzeichnet. Zu den Mutanten $\Delta PFPI$ -3 und -4 wurde zusätzlich jeweils eine Vektorkontrolle analysiert (VK). Als Positivkontrolle diente cDNA des Wildtyps UK7 (U). Für die Kontrolle der PCR wurde genomische DNA von UK7 als Matrize verwendet (P). Die Negativkontrolle enthielt keine Matrizen-DNA (N). Als Größenstandard fungierte eine 100 bp-DNA-Leiter (M).

Um die Rate der *PFPI*-Genexpression in den jeweils ausgewählten Komplementationsmutanten zu bestimmen, wurde die Methode der quantitativen Real-Time-PCR genutzt. Als Matrize wurde cDNA der bereits für die RT-PCR ausgewählten Komplementationsmutanten von $\Delta PFPI$ -1, -3 und -4 sowie des Wildtyp-Isolats UK7 eingesetzt. Neben dem Zielgen *PFPI* diente *GPD* als Referenzgen (vgl. Abb. 3.7). Beide Gene wurden zu gleichen Bedingungen in derselben Real-Time-PCR-Maschine in jeweils drei technischen Wiederholungen amplifiziert. Abb. 3.67 zeigt die gemittelten Expressionswerte des *PFPI*-Gens bezogen auf die konstitutive *GPD*-Expression. Fast alle ausgewählten Komplementationsmutanten zeigen eine gegenüber dem Wildtyp veränderte *PFPI*-Expression. Dieses Ergebnis ist nicht ungewöhnlich, da die Integration des Konstrukts zur *PFPI*-Komplementation möglicherweise mehrfach an unterschiedlichen Stellen im Genom der Deletionsmutanten stattgefunden hat. Damit ist vermutlich auch die hohe Variation der *PFPI*-Expressionsraten in den einzelnen Komplementationsmutanten zu erklären. Ist der endogene Promotor an jeder zufälligen Insertionsstelle des Konstrukts aktiv, erhöht dies die Expressionsrate des Gens im Organismus. Wird die Gensequenz in weniger stark transkribierte Bereiche im Genom

eingebaut, erniedrigt dies das Expressionsniveau. Die Anzahl der jeweils integrierten Kopien wurde jedoch für die einzelnen Komplementationsmutanten nicht bestimmt. Dazu sind im Normalfall DNA-Hybridisierungen notwendig, auf deren Durchführung für diese Arbeit aus Zeitgründen verzichtet werden musste.

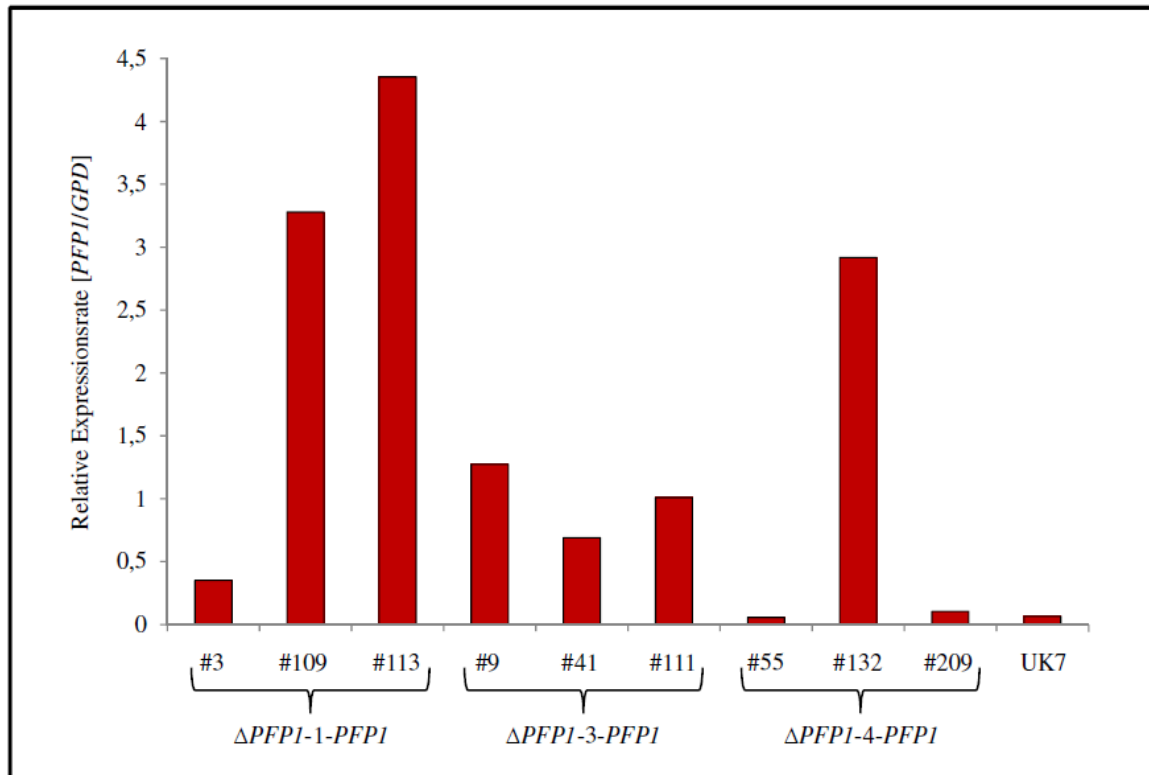


Abbildung 3.67: Relative *PFPI*-Expression in den Komplementationsmutanten $\Delta PFPI(-1, -3, \text{ bzw. } -4)-PFPI$.

Die Abbildung zeigt die durch quantitative Real-Time-PCR ermittelten relativen *PFPI*-Expressionsraten der Komplementationsmutanten im Vergleich zum Wildtyp UK7. Die C_T -Werte wurden aus jeweils drei technischen Replikaten gemittelt. Die Berechnung der relativen Expressionsrate von *PFPI* erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Pfaffl, 2001).

Das konstitutiv exprimierte *GPD* diente als Referenzgen oder Bezugsgröße zum Zielgen *PFPI*.

3.6.2.3 Inokulationsversuche

Nachdem die erfolgreiche Integration der *PFPI*-Gensequenz ins Genom der Deletionsmutanten sowie die Transkription des Gens unter Kontrolle des endogenen Promotors nachgewiesen wurde, sollte die Virulenz der Komplementationsmutanten auf suszeptiblen Gerstenpflanzen getestet werden. Die Deletionsmutanten $\Delta PFPI-1, -3$ und -4 hatten nach wiederholten Inokulationsversuchen der anfälligen Gerstensorte Ingrid eine stark eingeschränkte Virulenz gezeigt. Die Symptome waren zeitlich verzögert und blieben auch 21 Tage nach Inokulation auf wenige kleine Nekrosen beschränkt. Eine

erfolgreiche Komplementation der Deletionsmutanten sollte die Re-Etablierung des Wildtyp-Phänotyps, also die Wiedererlangung der vollständigen Virulenz gegenüber suszeptiblen Gerstpflanzen zur Folge haben. Obwohl die Mutante $\Delta PFPI-2$ nicht die reduzierte Virulenz der anderen drei Deletionsmutanten gezeigt hatte, wurde sie ebenfalls komplementiert und auf ihre Symptomausprägung hin untersucht.

Die Inokulationen wurden mit Konidiosporen des vierten Transfers durchgeführt. Bereits bei ihrer Isolierung fiel auf, dass die Komplementationsmutanten ähnlich wie die Deletionsmutanten eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte Sporulation zeigten. Der Titer lag zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger, als beim Wildtyp (5×10^4 Sporen/ml bzw. 5×10^5 Sporen/ml). Die Inokulationen wurden deshalb mit Sporentitern von 1×10^4 bzw. 1×10^5 Sporen pro zehn Pflanzen durchgeführt. Die Symptombildung auf den Gerstenblättern wurde 21 Tage nach Inokulation fotografisch festgehalten. Die Abbildung 3.68 zeigt die in zwei unterschiedlichen Inokulationsversuchen infizierten Primärblätter sowie die zugehörigen Kontrollen. Entgegen den Erwartungen zeigen sich auf den Primärblättern der mit den Sporen der Komplementationsmutanten infizierten Gerstpflanzen nach 21 Tagen nur leichte Symptome. Die Nekrosen bleiben sehr klein und sind vergleichbar mit denen, die zuvor bei den Deletionsmutanten beobachtet worden waren. Auch die Symptomatik der Komplementationsmutanten, die aus derselben Deletionsmutante generiert wurden, ist sehr unterschiedlich. Sie reichen von spärlichen Symptomen an den Blatträndern bis zu kleineren runden Nekrosen auf der Blattspreite (vgl. Abb. 3.68b, Vergleich $\Delta PFPI-1-PFPI-3$ und $\Delta PFPI-1-PFPI-109$ bzw. -113). Insgesamt können die Blattsymptome der Komplementationsmutanten nicht mit denen des Wildtyps UK7 gleichgesetzt werden. Die ausgewählten Mutanten zeigen trotz nachgewiesener *PFPI*-Expression keine Komplementation des Phänotyps der $\Delta PFPI$ -Deletionsmutanten auf der Pflanze. Die Virulenz der Deletionsmutanten konnte demnach durch die Rückführung des *PFPI*-Gens nicht vollständig wiederhergestellt werden.

Da die Ausbildung des Phänotyps auf der Pflanze von der „Fitness“ der verwendeten Konidiosporen abhängig ist, sollten alle Komplementationsmutanten von suszeptiblen Pflanzen reisoliert werden, um die Inokulationen mit Pilzisolaten zu wiederholen, die eine höchstmögliche Virulenz besaßen. Da die Komplementation der Deletionsmutante $\Delta PFPI-4$ zeitlich später als die der anderen drei stattfand, wurden zunächst nur die Komplementationen der Deletionsmutanten $\Delta PFPI-1$, -2 und -3 reisoliert. Die nachfolgend durchgeführten Inokulationsversuche mit Konidiosporen des zweiten Transfers zeigten jedoch keine Änderungen in der Blattsymptomatik (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde auf eine Reisolierung der Komplementationsmutanten $\Delta PFPI-4-PFPI$ verzichtet.

Abbildung 3.68: Symptomausprägung der Komplementationsmutanten nach Inokulation der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid.

Die Abbildungen zeigen Aufnahmen der mit den Komplementationsmutanten ($\Delta 1$ -*PFPI* (b), $\Delta 2$ -*PFPI* (c), $\Delta 3$ -*PFPI* (d), $\Delta 4$ -*PFPI* (e)) sowie dem Wildtyp UK7 (U-1, -2 und -3 (f)) infizierten Primärblätter der Gerstensorte Ingrid 21 nach Inokulation. Es wurden jeweils zehn Pflanzen pro Topf mit 1×10^4 bzw. 1×10^5 Sporen infiziert. Die Negativkontrollen blieben uninferiert (K-1, -2 (a)). Fotografiert wurden jeweils Oberseite (A) und Unterseite (B) der Blätter. Die Aufnahmen der Komplementationsmutanten Δ *PFPI*-*PFPI* stammen aus einem anderen Inokulationsexperiment. Aus diesem Grund sind die zugehörigen Positiv- und Negativkontrollen (K-2, U-3) zusätzlich abgebildet.

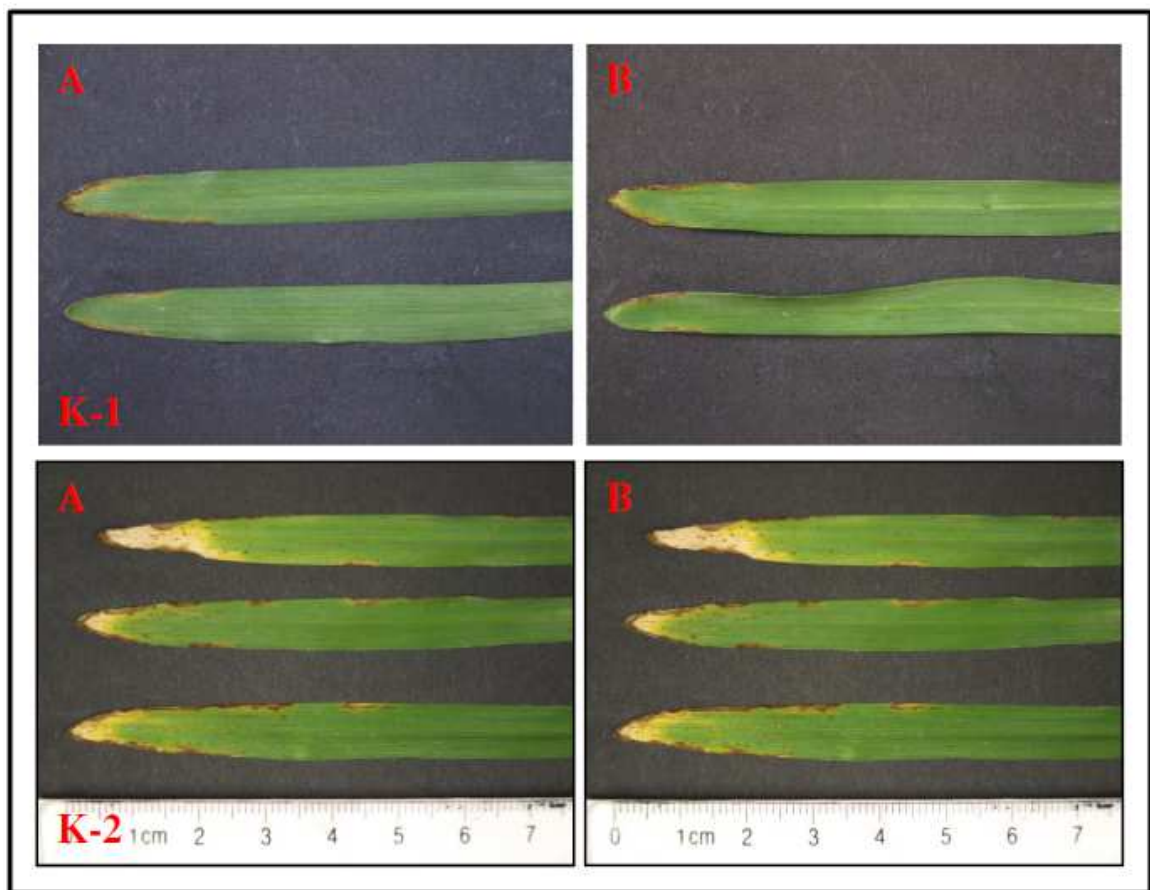


Abbildung 3.68a: Uninfizierte Kontrollen.

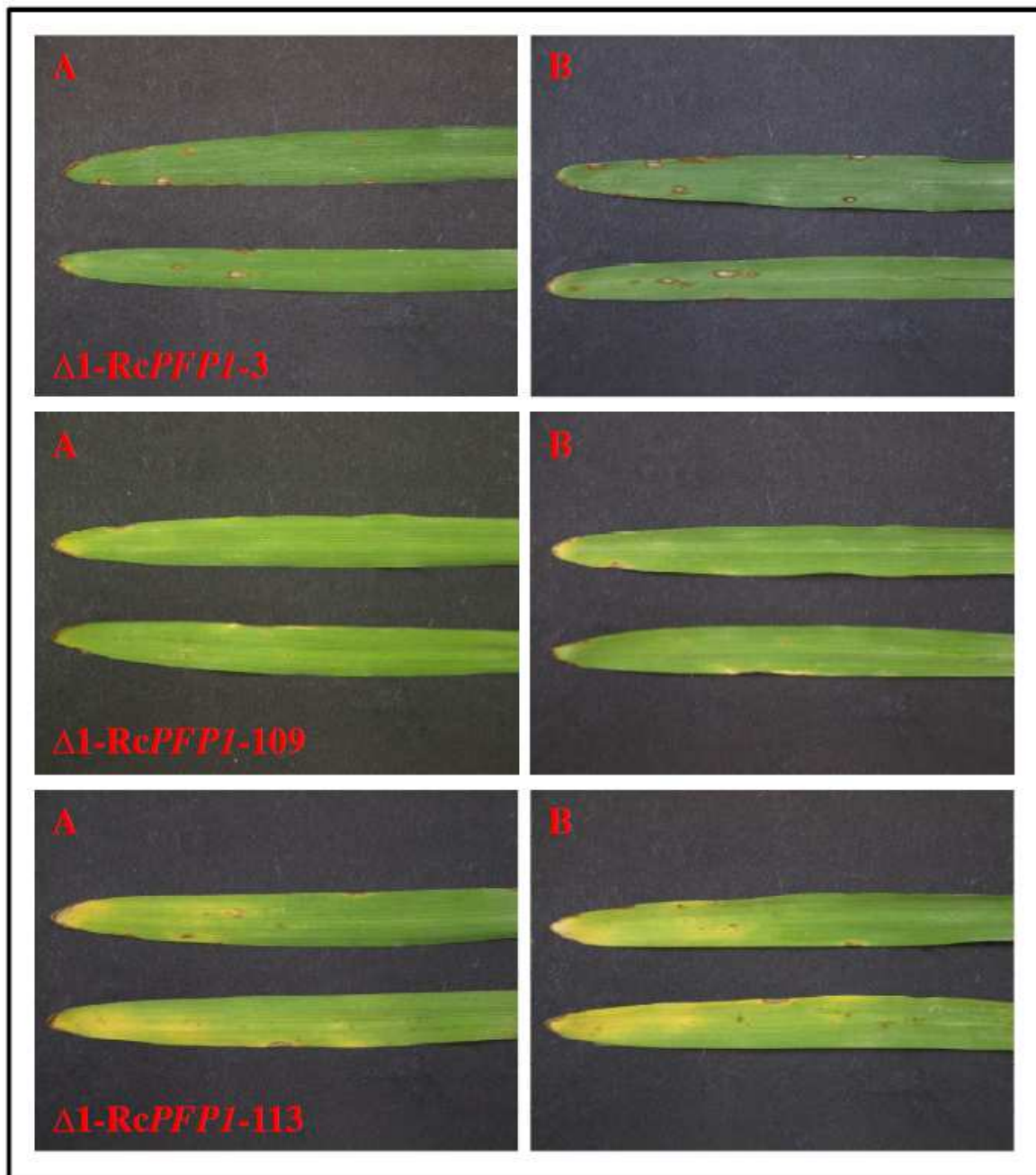


Abbildung 3.68b: Gersten-Primärblätter infiziert mit jeweils 1×10^4 Sporen der Komplementationsmutanten $\Delta PFPI-1-PFPI-3$, -109 und -113.

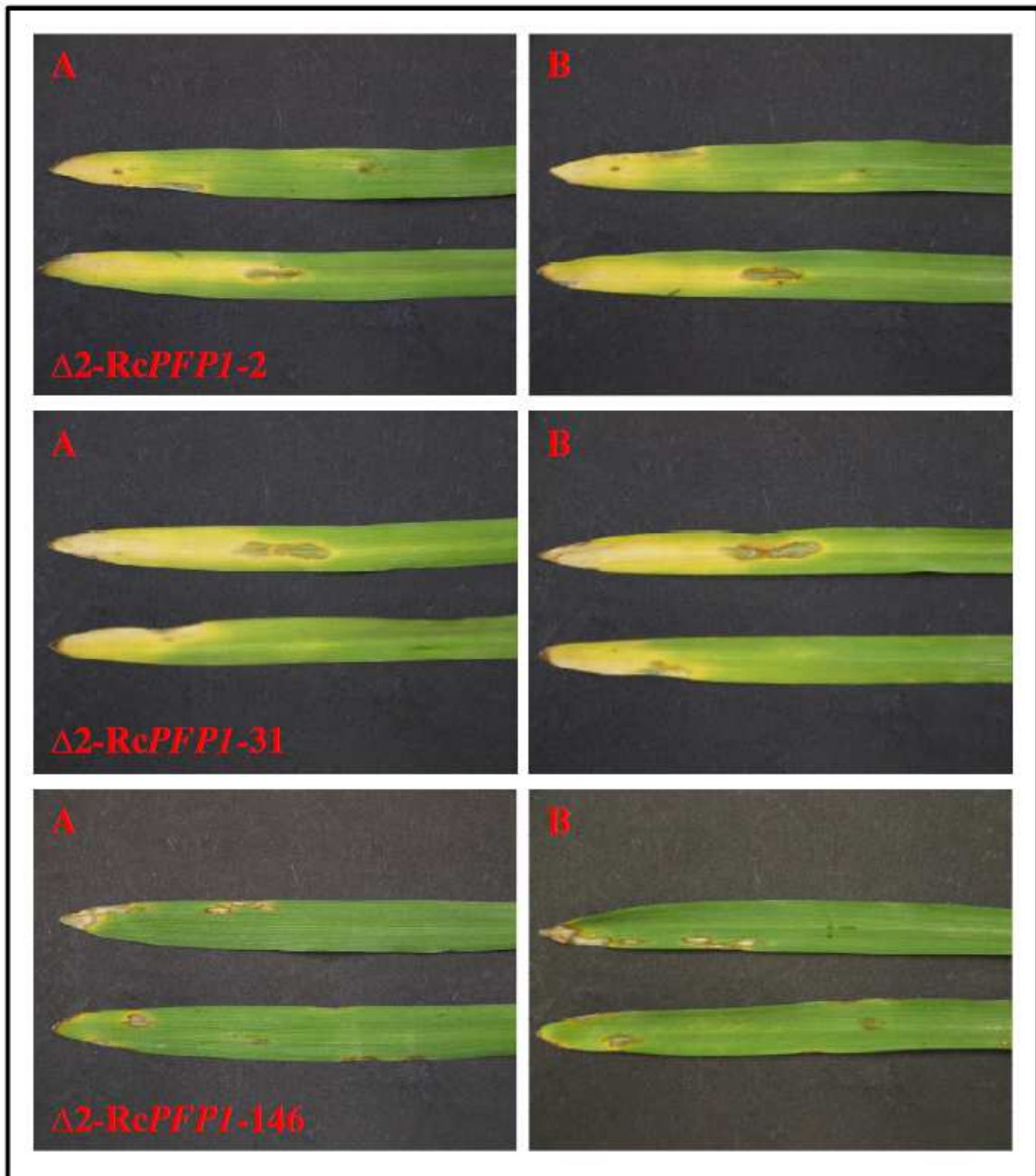


Abbildung 3.68c: Gersten-Primärblätter infiziert mit jeweils 1×10^4 ($\Delta PFPI-2-PFPI-2$, -31) bzw. 1×10^5 ($\Delta PFPI-2-PFPI-146$) Sporen der Komplementationsmutanten $\Delta PFPI-2-PFPI-2$, -31 und -146.

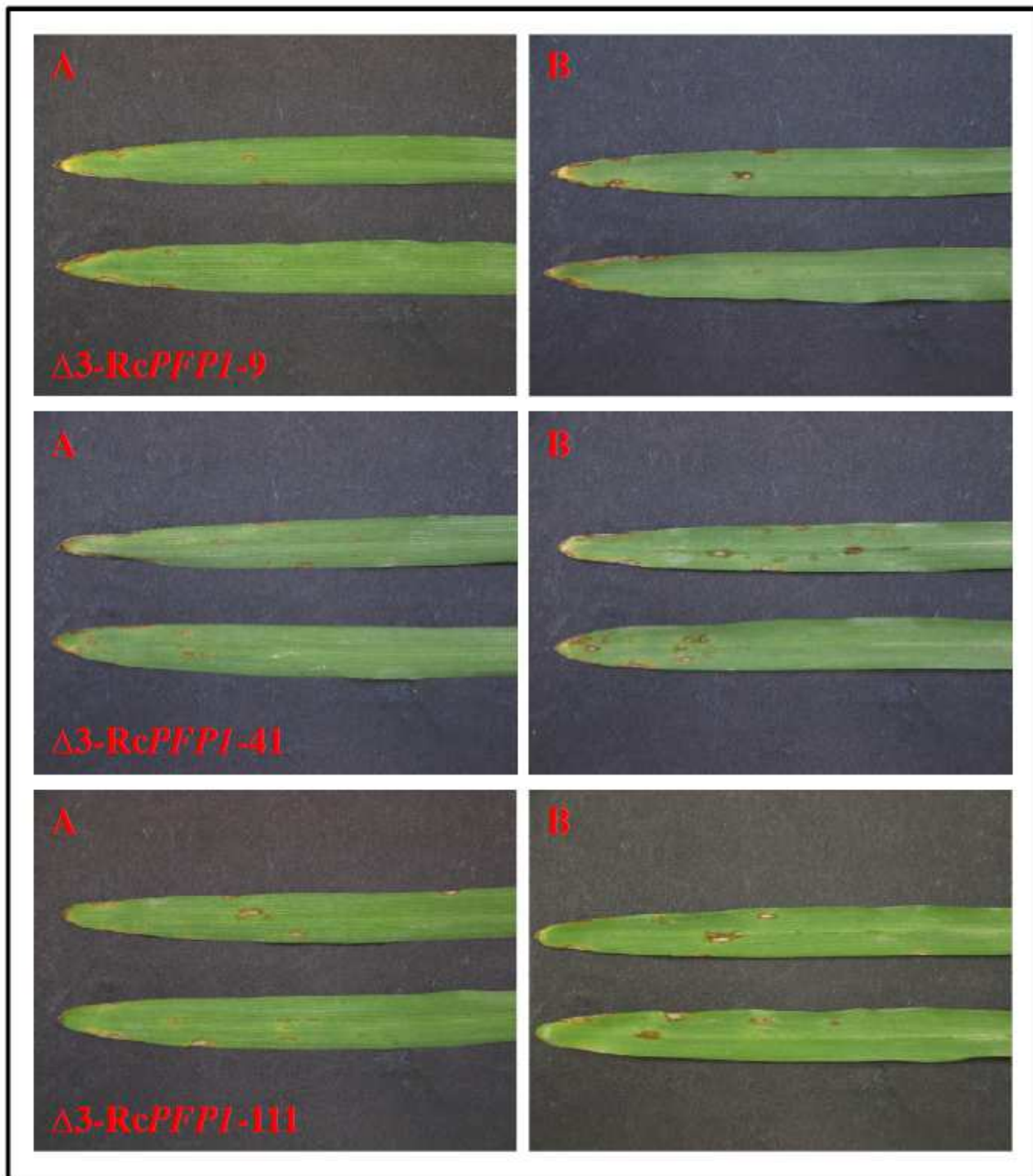


Abbildung 3.68d: Gersten-Primärblätter infiziert mit jeweils 1×10^4 Sporen der Komplementationsmutanten $\Delta PFPI-3-PFPI-9$, -41 und -111 .

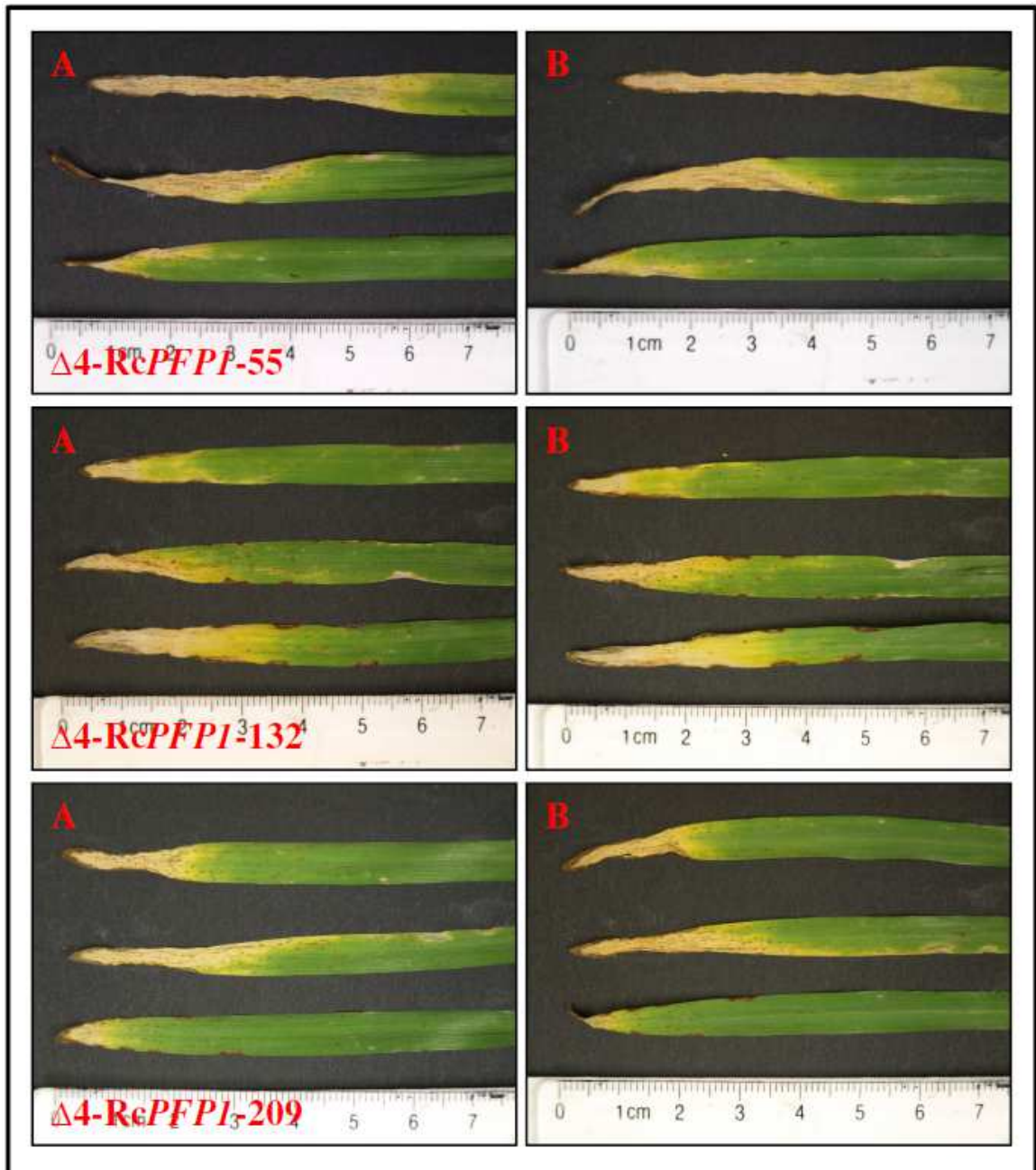


Abbildung 3.68e: Gersten-Primärblätter infiziert mit jeweils 1×10^5 Sporen der Komplementationmutanten $\Delta PFPI-4-PFPI-55$, -132 und -209 .

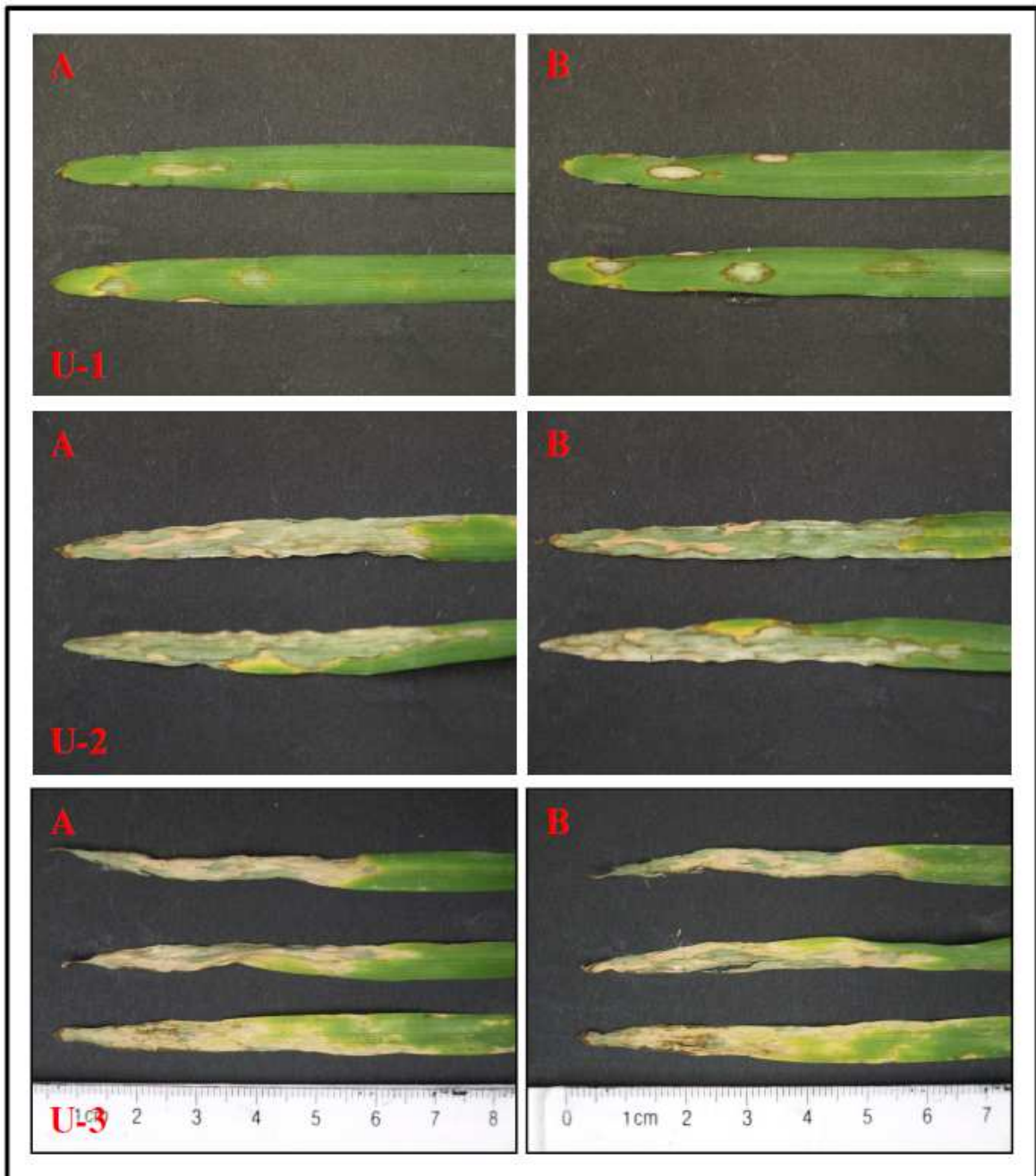


Abbildung 3.68f: Gersten-Primärblätter infiziert mit 1×10^4 (U-1) bzw. 1×10^5 (U-2, U-3) Sporen des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7.

3.6.2.4 Mikroskopische Untersuchung der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten

Wachstum und Entwicklung der Komplementationsmutanten wurden im Vergleich zum Wildtyp mikroskopisch analysiert. Dazu wurde das Pilzmyzel zu verschiedenen Zeitpunkten auf suszeptiblen Gerstenpflanzen (*in planta*) und im Flüssigmedium untersucht (*ex planta*).

3.6.2.4.1 Mikroskopische Untersuchung der Pilzentwicklung *in planta*

Für die mikroskopischen Untersuchungen *in planta* wurden Gerstenpflanzen der anfälligen Sorte Ingrid mit den Komplementationsmutanten infiziert. Nach 7, 14 und 21 d wurden die Primärblätter geerntet und eine Färbung des Pilzmyzels mit Trypanblau durchgeführt. Die Blätter wurden danach entfärbt und in einer 50%igen Glycerin-Lösung im Hellfeld mikroskopiert. Abb. 3.69 zeigt die Pilzentwicklung zu verschiedenen Zeitpunkten. Pro Komplementation wurden die drei bereits genannten Transformanten analysiert. Die Komplementationsmutanten $\Delta PFPI-2-PFPI$ wurden nicht untersucht, da die zugehörige Deletionsmutante auf der Pflanze einen abweichenden Phänotyp im Vergleich zu den anderen Mutanten gezeigt hatte, und deshalb für die $\Delta PFPI$ -Komplementation von geringerer Bedeutung war. Als Positivkontrolle diente der Wildtyp UK7. Die Komplementationsmutanten zeigten keine dem Wildtyp vergleichbaren Symptome auf der Pflanze nach 21 Tagen. Dem entsprach eine zeitliche Verzögerung des pilzlichen Wachstums der Mutanten gegenüber UK7 *in planta*. Sieben Tage nach Inokulation hat der Wildtyp die pflanzliche Kutikula penetriert und beginnt sich im Blatt auszubreiten (3.69a, J). Die Mutanten sind ausgekeimt, zeigen jedoch noch keine Penetrationsstellen (3.69a, A–I). Nach weiteren sieben Tagen hat der Wildtyp das Blatt fast vollständig durchwachsen und beginnt Pilzstroma auszubilden (3.69b, J). Die Komplementationsmutanten haben die Kutikula nur an einigen Stellen penetriert. Allerdings ist dies nicht bei allen Mutanten zu beobachten (3.69b, D-F). Nach 21 Tagen (3.69c) zeigen alle Mutanten subkutikuläres Wachstum. Während der Wildtyp jedoch ein dicht gepacktes Stroma ausgebildet hat, lässt sich dies bei den Mutanten nur vereinzelt beobachten (3.69c, G und H). Die mikroskopischen Aufnahmen *in planta* zeigen also, dass die Komplementationsmutanten in der Lage sind auszukeimen und die pflanzliche Kutikula zu penetrieren. Dies geschieht jedoch ähnlich wie bei den $\Delta PFPI$ -Deletionsmutanten mit einer zeitlichen Verzögerung. Die Infektionsstellen sind vereinzelt und rufen eine spärliche Symptomausbildung auf den Blättern hervor.

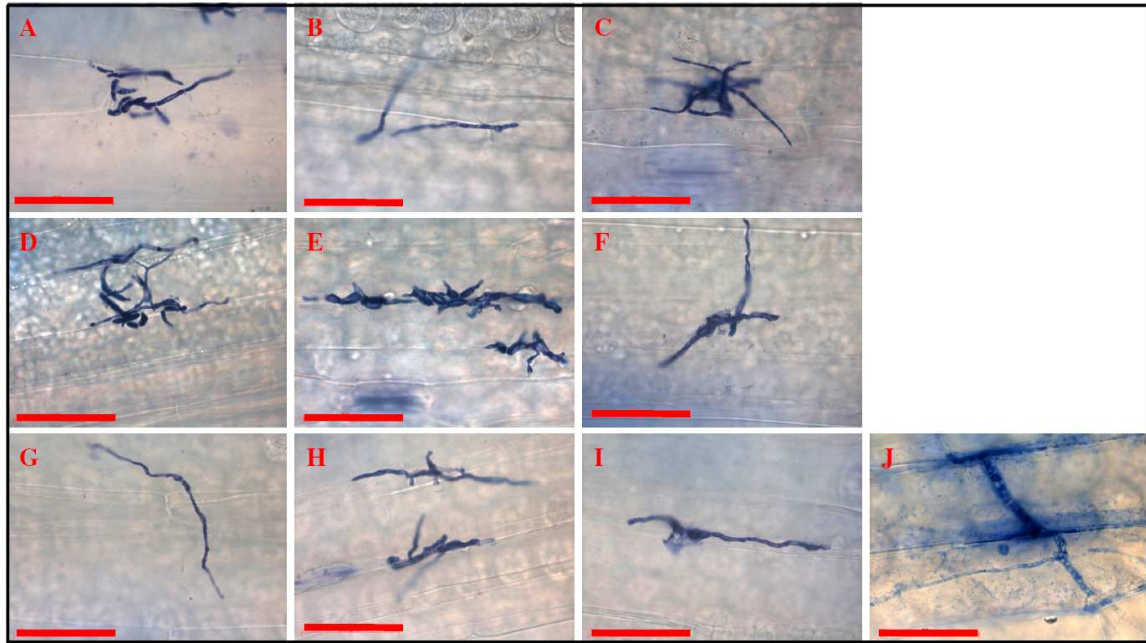


Abbildung 3.69a

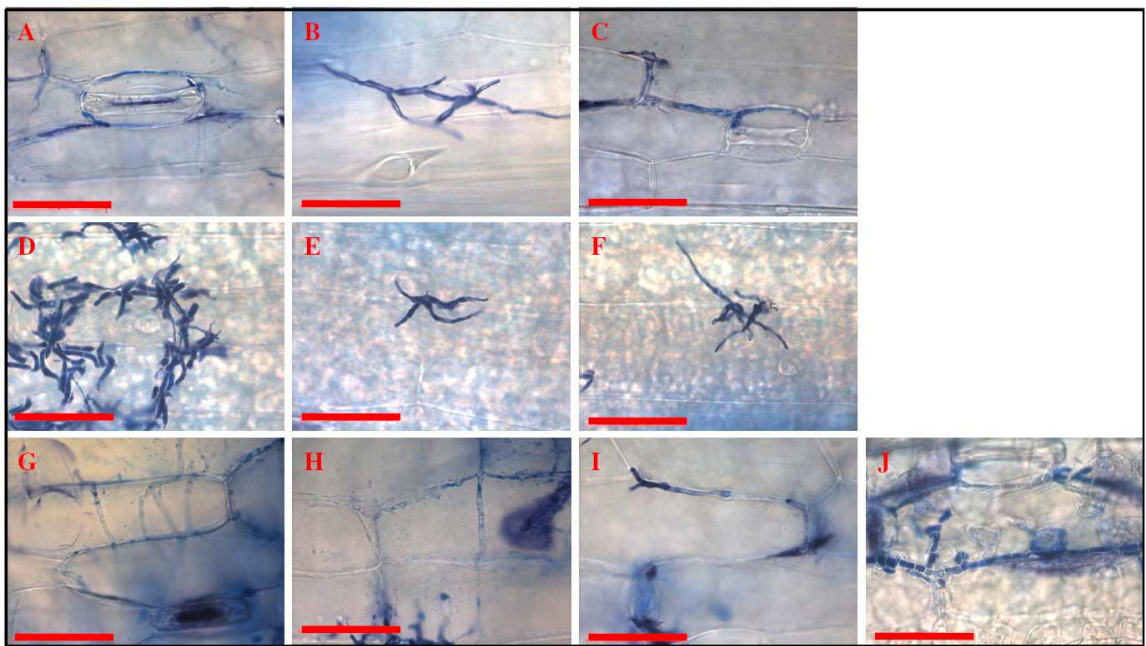


Abbildung 3.69b

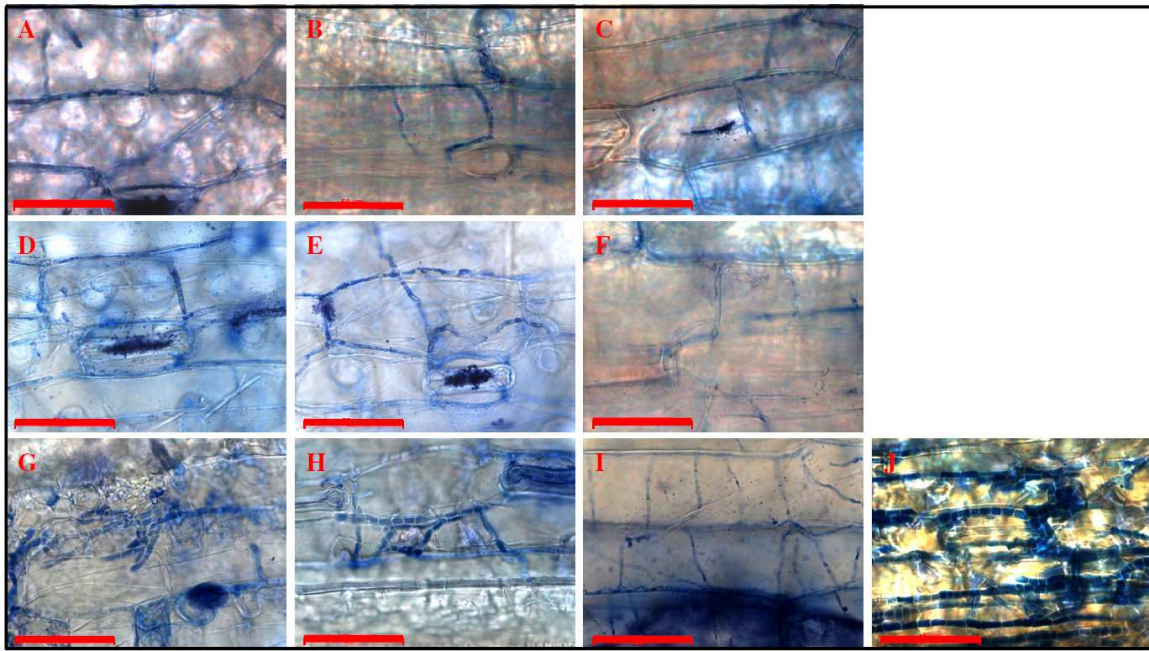


Abbildung 3.69c

Abbildung 3.69: Mikroskopische Aufnahmen der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten *in planta*.

Die Abbildungen zeigen das Wachstum der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten auf der suszeptiblen Gerstensorte Ingrid 7 (a), 14 (b) und 21 Tage (c) nach Inokulation. Für die Infektion wurden Konidiosporen des vierten Transfers verwendet. Die Färbung der Blätter erfolgte mit Trypanblau-Ethanol-Lösung über Nacht. Die Buchstaben A–I bezeichnen die untersuchten Mutanten. In Abbildung J ist jeweils UK7 zu sehen. Die Bilder wurden in 1000-facher Vergrößerung aufgenommen.

A bis C - $\Delta PFPI$ -1- $PFPI$ -3, -109 und -113

D bis F - $\Delta PFPI$ -3- $PFPI$ -9, -41 und -111

G bis I - $\Delta PFPI$ -4- $PFPI$ -55, -132 und -209

Maßstabsbalken – 50 μ m

3.6.2.4.2 Mikroskopische Untersuchung der Pilzentwicklung *ex planta*

Nach der phänotypischen Untersuchung der Komplementationsmutanten auf der Pflanze konnte keine vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Status festgestellt werden. Die Mutanten wuchsen nach wie vor langsamer, und die Blattsymptome waren erheblich schwächer ausgebildet als beim Wildtyp. Mikroskopische Analysen der Komplementationsmutanten *ex planta* sollten Aufschluss über deren Entwicklung außerhalb der Pflanze geben und mögliche morphologische Besonderheiten aufzeigen. Die Komplementationsmutanten wurden in FRIES-Medium angezogen und nach 1, 3, 6 und 14 Tagen mikroskopiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.70 dargestellt. Sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten sind 24 h nach Beimpfung des Mediums ausgekeimt.

Auch zu den folgenden Zeitpunkten zeigen sich keine markanten Unterschiede zwischen den Komplementationenmutanten und dem Wildtyp. Die Hyphen wachsen lang und fädig. Sie zeigen eine große Zahl an Vakuolen und sind vielfach unregelmäßig verzweigt. Lichtmikroskopisch sind auch nach 14 d keine Unterschiede zum Wildtyp erkennbar. Die Chlamydosporen-ähnlichen Strukturen, die bei den Deletionsmutanten aufgetreten waren, konnten nicht beobachtet werden.

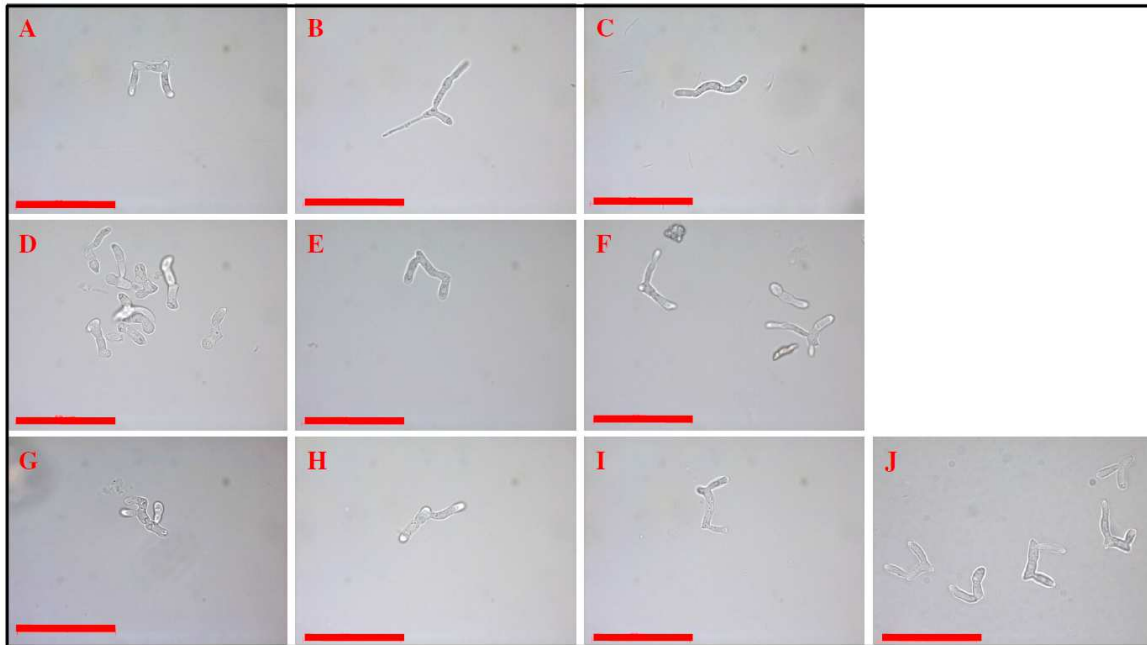


Abbildung 3.70a

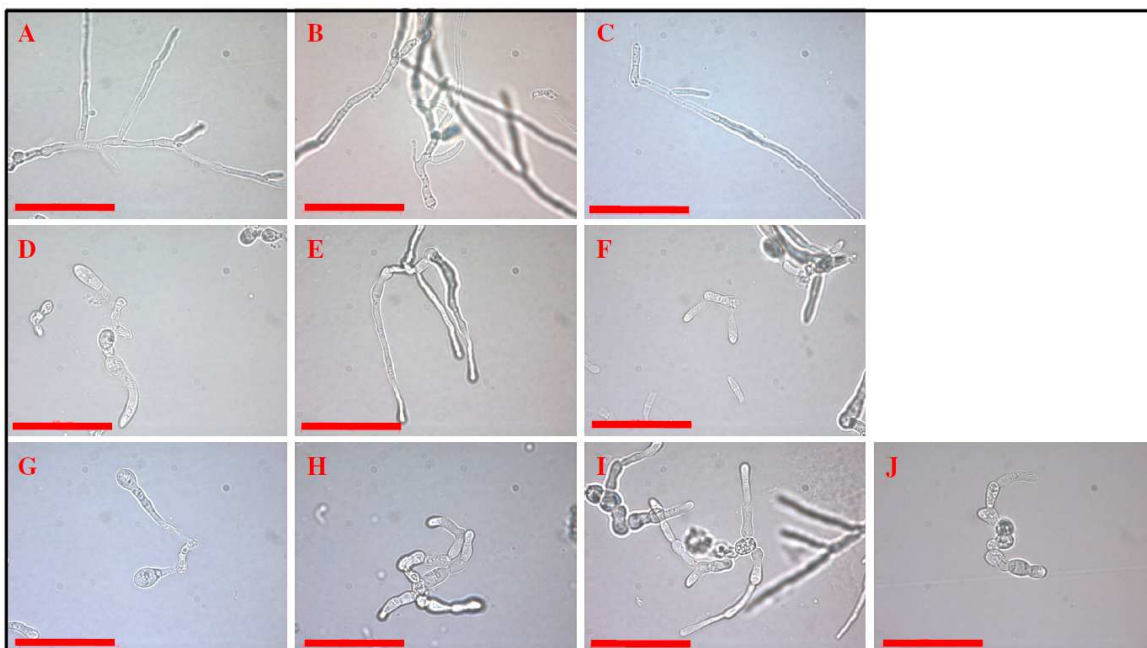


Abbildung 3.70b

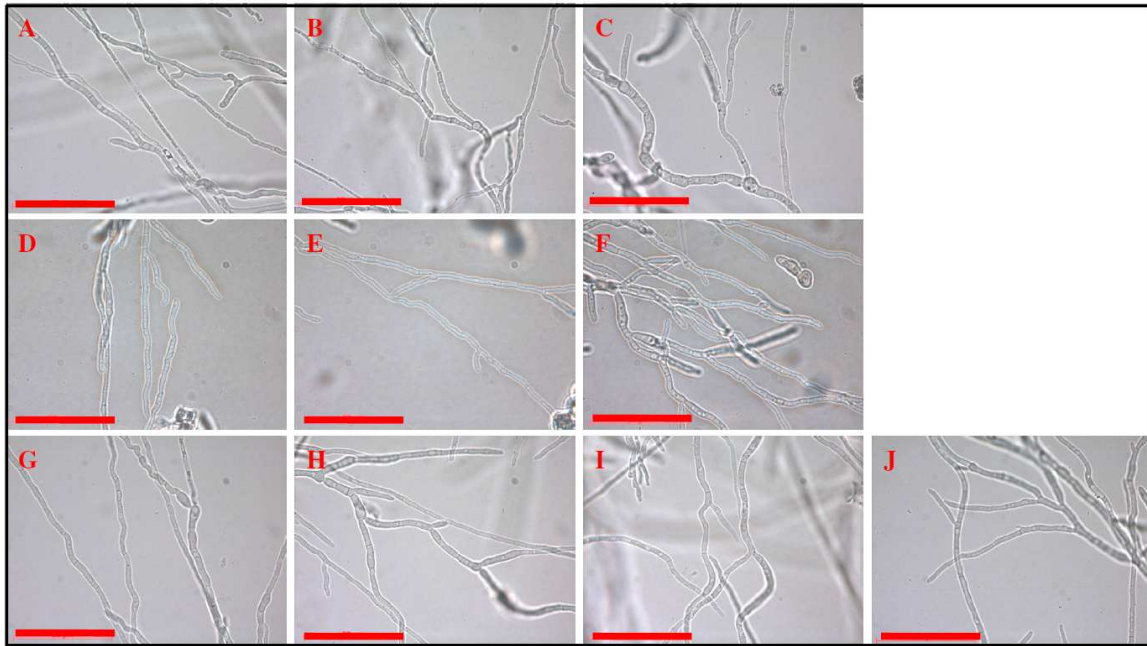


Abbildung 3.70c

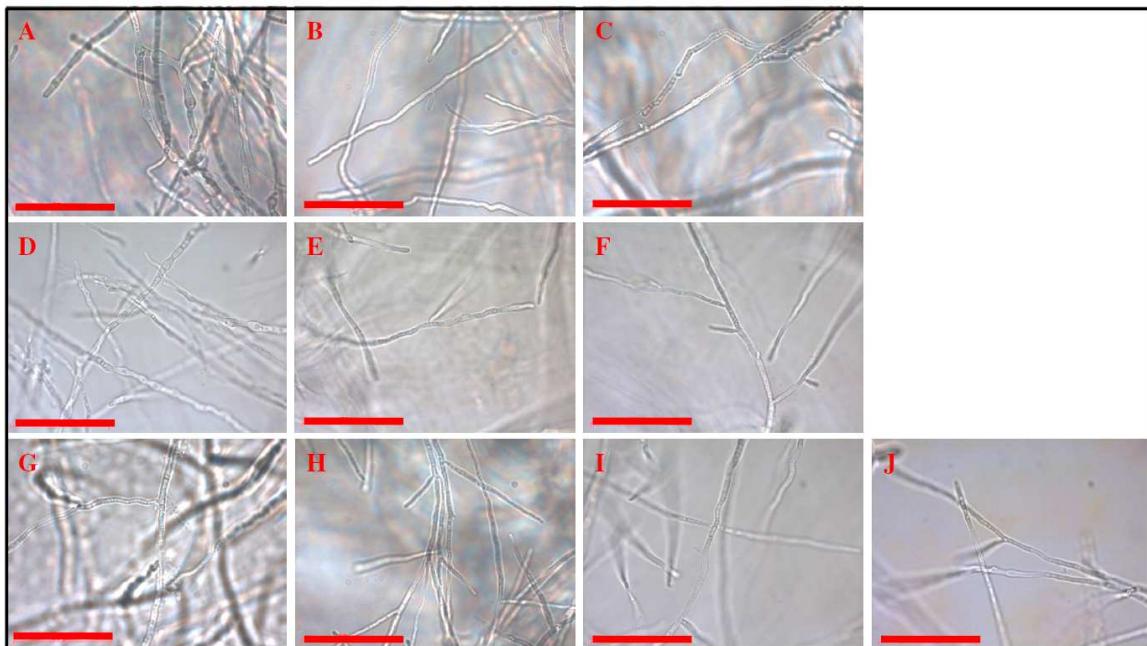


Abbildung 3.70d

Abbildung 3.70: Entwicklung der $\Delta PFPI$ -Komplementationsmutanten *ex planta*.

Die Abbildungen zeigen die Komplementationsmutanten in FRIES-Flüssigmedium nach 1 (a), 3 (b), 6 (c) und 14 Tagen (d). Die Beimpfung des Mediums wurde mit jeweils 5000 Konidiosporen des vierten Transfers durchgeführt. Die Buchstaben A–I bezeichnen die Komplementationsmutanten. Die Abbildung J zeigt jeweils UK7 zum Vergleich.

A bis C - $\Delta PFPI$ -1- $PFPI$ -3, -109 und -113

D bis F - $\Delta PFPI$ -3- $PFPI$ -9, -41 und -111

G bis I - $\Delta PFPI$ -4- $PFPI$ -55, -132 und -209

Maßstabsbalken – 50 μ m

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine phänotypische Komplementation der *PFPI*-Deletion durch die Rückführung der *PFPI*-Gensequenz in das Genom der Deletionsmutanten nicht erreicht werden konnte. Die Integration der *PFPI*-Gensequenz sowie die Transkription des Gens in den Komplementationsmutanten konnte zwar nachgewiesen werden. Jedoch konnte der Wildtyp-Phänotyp auf der Pflanze nicht wiederhergestellt werden. Die Blattsymptomatik beschränkte sich auf kleinere nekrotische Läsionen an den Blatträndern und auf den Blattspreiten. Auch die Verlangsamung des Wachstums sowie die eingeschränkte Sporulation der Deletionsmutanten konnten durch die Rückführung der *PFPI*-Sequenz nicht aufgehoben werden. Lediglich der beobachtete Phänotyp *ex planta* war mit dem Wildtyp vergleichbar, da keine Chlamydosporen-ähnlichen Strukturen mehr nachzuweisen waren. Dieses Merkmal konnte damit als einziges durch eine erneute *PFPI*-Expression rückgängig gemacht werden. Weshalb die Rückführung der *PFPI*-Gensequenz in die Deletionsmutanten die eingeschränkte Entwicklung sowie die Virulenz auf der Pflanze nicht komplementieren konnte, bleibt weiterhin unklar.

4. Diskussion

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation konnte die REMI-Mutante LB20₅₇ des Gerstepathogenen Pilzes *Rhynchosporium commune* als apathogen auf suszeptiblen Gerstenpflanzen identifiziert werden. *Ex planta* zeigte die Mutante keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp. Des Weiteren führte die Komplementation der REMI-Mutante mit der *PFPI*-Wildtyp-Gensequenz zu einer Re-Etablierung des pathogenen Phänotyps *in planta*, wenn auch mit eingeschränkter Virulenz (s. 1.5.4).

Die genannten Beobachtungen führten zu der Annahme, dass es sich bei dem identifizierten Gen *per definitionem* um einen Pathogenitätsfaktor handeln könnte. Diese Tatsache machte *PFPI* zu einem interessanten Thema für die weiterführende Forschung und damit zum Ausgangspunkt der hier vorliegenden Dissertationsarbeit.

Die Frage nach der potentiellen Funktion des Pfp1-Proteins während der Pathogenese des Pilzes bzw. seine eventuelle Beteiligung an wichtigen Entwicklungsprozessen sollte mit verschiedenen Versuchsansätzen geklärt werden. Nicht alle Fragen konnten während dieser Arbeit eindeutig beantwortet werden und nicht alle Ergebnisse entsprachen den zuvor gesetzten Erwartungen. Dies soll jedoch nicht den daraus erzielten Erkenntnisgewinn negieren. Vielmehr war es möglich, einen Einblick in eventuelle zelluläre Funktionen von Pfp1 während der Entwicklung des Pilzes zu erhalten und damit neue Ansätze für die künftige Forschung zu diesem Thema zu definieren.

4.1 Insertionsbedingte Beeinträchtigung der *PFPI*-Expression in der REMI-Mutante LB20₅₇ – mögliche Ursachen

Die Integration des Vektors pAN7-1 in den Promotorbereich des *PFPI*-Gens in der REMI-Mutante führte vermutlich zu ihrer Apathogenität *in planta*. Da die proteinkodierende Sequenz nicht betroffen war, wurde angenommen, dass durch die Insertion der Fremd-DNA die Regulation der *PFPI*-Genexpression auf transkriptioneller Ebene gestört wurde. Aufgrund des apathogenen Phänotyps der Mutante wurde dabei zunächst eine mehr oder weniger stark eingeschränkte Genexpression vermutet.

Semi-quantitative (RT-PCR) und quantitative (Real-Time-PCR) Untersuchungen der *PFPI*-Expression in der REMI-Mutante LB20₅₇ (s. 3.1.2) zeigten jedoch eine erhöhte Expression des Gens in Bezug auf den Wildtyp UK7. Dieser Befund entsprach nicht den Erwartungen und lässt sich durch drei Überlegungen diskutieren.

(1) Die Expression des *PFPI*-Gens wird im Wildtyp durch die Bindung eines Repressors an bestimmte DNA-Sequenzen im Promotorbereich reprimiert. Die Integration des

pAN7-1-Vektors an dieser Stelle stört diese transkriptionelle Repression, da das verantwortliche Protein nicht mehr binden kann bzw. der Abstand zum Transkriptionsstart dadurch verschoben wird. Dies führt zur Erhöhung der *PFPI*-Genexpression in der REMI-Mutante.

(2) An der *PFPI*-Genregulation sind in der Nähe des Transkriptionsstarts stromaufwärts gelegene offene Leserahmen, sogenannte uORFs (*upstream open reading frames*), beteiligt. Diese kurzen Leserahmen haben größtenteils eine Funktion in der translationalen Reprimierung der Genexpression vieler eukaryotischer Gene. Sie sind jedoch auch an der Destabilisierung von mRNA-Molekülen beteiligt. Durch die Integration der Vektor-DNA in diesem Bereich der *PFPI*-Gensequenz kommt es zur Unterbrechung jener regulatorischen Elemente. Folgt man dieser Annahme kann dies zum Nachweis einer erhöhten Menge an *PFPI*-Transkripten in der REMI-Mutante führen.

(3) Eine Möglichkeit zur Erklärung der erhöhten *PFPI*-Expression in der REMI-Mutante kann in der integrierten Vektor-DNA selbst gefunden werden. Diese konnte zweifach in „Kopf-Schwanz“-Orientierung durch DNA-Hybridisierung nachgewiesen werden. Da die *Bam*HI-Schnittstelle im Plasmid direkt stromabwärts von der kodierenden Sequenz des Hygromycin-B-Phosphotransferasegens (*HPH*) liegt (vgl. Abb. 3.4a), kann eine vollständige Termination der Transkription des Gens unter Kontrolle des P_{gpd} -Promotors nicht vorausgesetzt werden. Durch die Integration des pAN7-1-Vektors in die *Bam*HI-Schnittstelle im Promotorbereich des *PFPI*-Gens wurde die kodierende Sequenz des *HPH*-Gens direkt stromaufwärts der *PFPI*-Gensequenz positioniert. Die Transkription des Hygromycin-B-Resistenz-Gens schließt damit die nachfolgende Transkription der *PFPI*-Gensequenz nicht aus. Somit entsteht eine polycistronische mRNA, die zusätzlich zum endogenen *PFPI*-Transkript durch die angegebenen PCR-Methoden nachgewiesen werden könnte (s. 3.1.1, Abb. 3.2).

Die Möglichkeit der transkriptionellen Repression

Transkriptionelle Repression ist ein wichtiger Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression sowohl in Prokaryoten als auch in eukaryotischen Organismen. Von besonderer Bedeutung ist dabei die genspezifische Repression, bei welcher die Transkription eines bestimmten Gens oder einer Gruppe von Genen durch die Aktivität eines genspezifischen Repressors oder Corepressors kontrolliert wird. Die drei Hauptwege transkriptioneller Repression sind dabei die Inhibierung der basalen Transkriptionsmaschinerie, die Aufhebung der Aktivator-Funktion sowie Chromatin-Remodelling. Die dabei funktionell agierenden Proteine nennt man Repressoren. Sie können in drei Klassen unterteilt werden. Zum einen sind dies Proteine, die direkt an die DNA binden, entweder sequenzspezifisch oder an methylierte DNA (CpG-Inseln). Zum anderen sind Proteine bekannt, die an DNA-gebundene Proteine binden wie andere Repressoren oder Transkriptionsfaktoren. Eine dritte Gruppe umfasst Proteine, die an

Aktivatoren, Coaktivatoren oder den Präinitiationskomplex binden und diese posttranslational modifizieren (Gaston & Jayaraman, 2003).

Die Möglichkeit der Reprimierung der *PFPI*-Expression im *R.-commune*-Wildtyp UK7 und deren mutmaßliche Aufhebung durch die REMI-Integration kann nur durch die Annahme eines sequenzspezifisch an die DNA bindenden Repressor-Proteins, dessen Bindungsstelle durch die Plasmid-Insertion beeinträchtigt wird, erklärt werden. Beispiele für solche Faktoren in eukaryotischen Organismen sind in der Literatur zu finden.

In der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* sind mehrere solcher Proteine bekannt. Dazu gehören die beiden C2H2-Zink-Finger-Proteine Krüppel (Kr) und Hunchback (Hb) sowie die Homöodomänen-Proteine (Helix-Turn-Helix-Motiv, HTH) Engrailed (En) und Even-skipped (Eve). Alle vier genannten Proteine binden mit ihren DNA-Binde-Domänen an spezifische DNA-Sequenzen und greifen als Repressoren in die transkriptionelle Regulation verschiedener Gene ein. Zum Teil regulieren sie sich auch untereinander. Krüppel und Hunchback sind sogenannte Gap-Gene. Sie werden im Embryonen-Stadium der Fruchtfliege exprimiert und sind für die Ausbildung der korrekten Körper-Segmentierung verantwortlich. Sie werden entlang der Anterior-Posterior-Achse exprimiert und sind an der Einteilung des Embryos in breite Körperbereiche (vorn – Mitte – hinten) beteiligt. Sowohl Krüppel als auch Hunchback binden an eine jeweils spezifische 10 bp-DNA-Sequenz im Promotorbereich der *hunchback*-Genesequenz (5'-AAGGGGTAA-3' für Kr; 5'-ACNCAAAAANTA-3' für Hb). Krüppel reprimiert damit die Expression von Hunchback, während Hunchback sich selbst reguliert (Treisman & Desplan, 1989). Auch *even-skipped* wird durch Krüppel und Hunchback reguliert. Dabei verhält sich Hunchback als Aktivator, Krüppel als Repressor der Genexpression. Gezielt eingeführte Mutationen im Promotorbereich von *eve*, bei denen die DNA-Erkennungssequenzen der beiden Proteine verändert oder entfernt wurden, führten entweder zur Reduzierung (Hb-) oder zur Steigerung der *eve*-Genexpression (Kr-) (Štanojević *et al.*, 1989; Small *et al.*, 1992).

Even-skipped selbst ist ein sogenanntes Pair-rule-Gen und ist an der Organisation der Parasegmentierung beteiligt, die in sieben Streifen entlang der Körperachse verläuft (Jaynes & Fujioka, 2004). Eve ist als Repressor mehrerer anderer Entwicklungsgene in *Drosophila* bekannt: *ultrabithorax* (*ubx*), *fushi-tarazu* (*ftz*) und *wingless* (*wg*) (Carroll & Scott, 1986; Ingham *et al.*, 1988; Martinez-Arias & White, 1988). Das Protein bindet mit zwei seiner Homöodomänen direkt an eine AT-reiche DNA-Sequenz von 10 bp (5'-AATTAAATTC-3'; Hirsch & Aggarwal, 1995). Dabei reprimiert Eve die Transkription der Gene über zwei Mechanismen: kooperative Bindung (*Ubx*; TenHarmsel *et al.*, 1993) und kooperatives Blocken (Austin & Biggin, 1995).

Auch *engrailed* gehört zu den *Drosophila*-Genen, die eine Funktion in der Embryonalentwicklung der Fliege haben. Als Segmentpolaritätsgen ist es für die korrekte Segment-Unterteilung des Embryos verantwortlich (Hidalgo, 1996). Funktionell ist das Protein ein Repressor, der beispielsweise die Transkription der Gene *ultrabithorax*

(Mann, 1994) und *fushi-tarazu* (Jaynes & O'Farrell, 1988) reguliert. Ähnlich Even-skipped bindet auch Engrailed dabei direkt an die DNA mit der Kernsequenz 5'-TAATTA-3' (Draganescu & Tullius, 1998). Des Weiteren konnte eine Bindung des Proteins an die TATA-Box des *Drosophila-Hsp70*-Promotors sowie anderer eukaryotischer Promotoren nachgewiesen werden. Dabei wurde in *in vitro*-Experimenten gezeigt, dass Engrailed mit dem TATA-Box-Bindeprotein (TBP) des Transkriptionsfaktors IID (TFIID) konkurriert und damit die Repression des entsprechenden Gens veranlasst (Ohkuma *et al.*, 1990).

Die Konkurrenz verschiedener Repressor-Proteine mit Aktivatoren oder anderen Transkriptionsfaktoren um spezifische DNA-Bindestellen ist ein bekannter Mechanismus in der Kontrolle der Genexpression. Zwei Beispiele hierfür sind im Menschen zu finden. Der sogenannte GC-Faktor (GCF) wurde aus einem cDNA-Klon isoliert. Das Protein bindet an GC-reiche DNA-Elemente in den Promotorsequenzen des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR), des β -Aktin-Gens sowie einer Calcium-abhängigen Protease (CANP) (5'-NNGCGGGGCN-3') und reprimiert deren Expression. Co-Transfektionsexperimente, in denen die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des *EGFR*-Promotors mit und ohne GC-reiche Sequenzen analysiert wurde, zeigten eine weniger signifikante Repression des Gens unter Einfluss der „GC-losen“ Promotorsequenzen. Da bekannte Transkriptionsfaktoren und Aktivator-Proteine wie Sp1 und ETF ebenfalls an GC-reiche Sequenzen binden, wird angenommen, dass GCF mit diesen um die DNA-Bindestellen konkurrieren kann. Eine Bindestelle für Sp1 befindet sich beispielsweise auch in der Promotorregion des β -Aktins (Kageyama & Pastan, 1989).

Ein weiteres Beispiel für diesen Mechanismus ist der Transkriptionsfaktor AP-1. Eigentlich als Aktivator-Protein bekannt übt er eine Repressorfunktion bei der Expression des Osteocalcin-Gens aus. AP-1 bindet die DNA-Konsensussequenz 5'-TGACTCA-3', die auch in der Promotorsequenz des Gens zu finden ist. AP-1 konkurriert durch Bindung an diese Sequenz mit dem Retinolsäure-Rezeptor-Protein, das als Aktivator der Osteocalcin-Expression fungiert (Schüle *et al.*, 1990).

Auch in pilzlichen Organismen spielt die transkriptionelle Repression bestimmter Gene eine wichtige Rolle. Ein sehr bekanntes Beispiel ist die Regulation der hypoxischen Genexpression in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* unter aeroben Bedingungen. Hefen sind fakultative Anaerobier, d.h. sie sind auch unter Sauerstoffmangel noch lebensfähig durch die Möglichkeit des Umschaltens von aerober Zellatmung zu anaerober Gärung (Zitomer *et al.*, 1997). Die Genexpression für den anaeroben Stoffwechsel unterliegt einer strengen Regulation. Ist genügend Sauerstoff vorhanden, wird die Expression hypoxischer Gene durch Rox1 reprimiert (Balasubramanian *et al.*, 1993). Das Protein besitzt an seinem N-Terminus eine sogenannte HMG (*high mobility group*)-DNA-Bindedomäne. Dieses Motiv ist in einer Reihe von Proteinen nachgewiesen worden, die an DNA binden und deren Konformationsänderung (Krümmung) bewirken können. Auch

bei Rox1 ist diese Funktion nachgewiesen worden (Deckert *et al.*, 1999). Dabei bindet das Protein an eine hypoxische Erkennungsstelle im Promotorbereich vieler unter Sauerstoffmangel exprimierter Gene, die die Kernsequenz 5'-ATTGTT-3' umfasst (Balasubramanian *et al.*, 1993). Deckert *et al.* (1998) untersuchten die Spezifität der Repressor-Bindung an diese Sequenz durch einzeln eingeführte Basenaustausche in der Kern-Erkennungssequenz. Besonders die Austausch der beiden Thymidine gegen Adenine an den Positionen drei und vier führten zu dramatischen Verlusten der Rox1-Bindung an die DNA-Sequenz *in vitro*. Durch Einführung gleicher Mutationen in der DNA-Erkennungssequenz im Promotorbereich des hypoxischen Gens *ANBI* konnte eine mit den oben beschriebenen Mutationen korrelierende signifikante Reduktion in der Repression des Gens *in vivo* nachgewiesen werden.

Ein weiteres bekanntes Beispiel ist der Repressor CreA von *Aspergillus nidulans*. Das Protein fungiert als negativer Regulator des Kohlenstoff-Katabolismus. Ist eine favorisierte Kohlenstoffquelle wie Glukose im Wachstumsmedium vorhanden, werden z.B. Gene wie die des Ethanol-Regulons durch CreA reprimiert. Dies geschieht durch zwei Stufen. Zum einen reprimiert CreA die Expression des Transkriptionsaktivators *alcR*, zum anderen die der Strukturgene *alcA* (Alkohol-Dehydrogenase I) sowie *aldA* (Aldehyd-Dehydrogenase) (Ruijter & Vissera, 1997). Dabei bindet CreA an GC-reiche DNA-Bereiche mit der Erkennungssequenz 5'-SYGGRG-3' (Kulmburg *et al.*, 1993). In der Promotorregion des *alcR*-Gens konnten neun putative CreA-Bindestellen mit der Konsensussequenz 5'-G/CYGGRG-3' nachgewiesen werden. Durch gezielte Mutagenese der DNA-Sequenzen konnten vier der neun Stellen als relevant für die CreA-Bindung identifiziert werden, da alle Mutanten eine De-Repression der *alcR*-Expression unter Glukose-Zufuhr zeigten (Mathieu *et al.*, 2000). Ähnliche Studien wurden zur Repression des *alcA*-Strukturgens durchgeführt. In dessen Promotorbereich konnten sieben putative CreA-Erkennungsstellen (Konsensus: 5'-C/GYGGRG-3') identifiziert werden, wovon die drei dem Translationsstart am nächsten gelegenen durch gezielt eingeführte Deletionen als CreA-Bindestellen nachgewiesen wurden. Alle Mutanten zeigten eine De-Repression der *alcA*-Transkription (Panozzo *et al.*, 1998).

Diese Beispiele zeigen, dass die transkriptionelle Repression bestimmter Gene in eukaryotischen Organismen weit verbreitet ist. Die funktionelle Aktivität vieler bekannter Repressor-Proteine ist sehr häufig untrennbar mit der Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen im Promotorbereich der reprimierten Gene verbunden. Es ist deshalb denkbar, dass auch die Expression des *PFPI*-Gens zu einem bestimmten Grad im Wildtyp reprimiert wird. Für diese Überlegung spricht, dass die *PFPI*-Transkript-Menge bei Wachstum des Pilzes *in planta* und *ex planta* zwar über einen langen Zeitraum nachgewiesen werden konnte, jedoch durchgängig auf einem sehr geringen Niveau (s. 3.2.2).

Zudem konnte der Transkriptionsstart des *PFPI*-Gens wenige Basenpaare stromabwärts von der REMI-Integrationsstelle nachgewiesen werden (s. 3.2.1.1 & Abb. 7.2.1.1). Die

Insertion der Fremd-DNA an dieser Stelle könnte also durchaus regulatorische Mechanismen beeinflussen, zum Beispiel durch die Unterbrechung spezifischer DNA-Signaturen, die für die repressive Kontrolle der Transkription verantwortlich sind, und damit zur Erhöhung des *PFPI*-Transkriptlevels in der REMI-Mutante führen.

Die konstitutive Expression des *PFPI*-Gens *in planta* spricht allerdings auch gegen die oben genannten Überlegungen, da eine vollständige Reprimierung der *PFPI*-Expression niemals nachgewiesen werden konnte. Auch konnten durch *in-silico*-Analysen des 5'-untranslatierten Bereiches keine der oben genannten DNA-Kernsequenzen als potentielle Bindestellen für Repressor-Proteine in der Nähe des Transkriptionsstarts des Gens identifiziert werden.

uORFs als negative Effektoren der mRNA-Stabilität

Stromaufwärts gelegene kurze offene Leserahmen oder uORFs (*upstream open reading frames*) innerhalb der 5'-Leader-Region einer mRNA sind in eukaryotischen Gensequenzen weit verbreitete regulatorische Elemente. Sie umfassen in ihrer minimalen Länge ein Starttripllett (uAUG), mindestens ein weiteres Sinncodon und ein Stopptripllett (Hood *et al.*, 2009). Sie können jedoch auch über 100 Basenpaare umfassen (Vilela & McCarthy, 2003). uORFs haben einen negativen regulatorischen Effekt auf die Translation stromabwärts gelegener genuiner Leserahmen. Dies geschieht durch unterschiedliche Mechanismen wie z.B. die verfrühte Initiation (*preemptive initiation*) und nachfolgende Termination der Translation an einem uORF, was eine Ablösung des Präinitiationskomplexes von der mRNA zur Folge hat. Dadurch wird die Translation des stromabwärts gelegenen Leserahmens verhindert. Weitere Mechanismen sind beispielsweise die Hemmung des Terminationsprozesses der Translation am Stoppcodon des uORFs (*ribosome stalling during termination*) oder das Blockieren des Verlaufs der translationellen Elongation an einem uORF (*ribosome stalling during elongation*). Die somit ausgelöste Blockade kann als eine Barriere für andere Ribosomen fungieren, die stromabwärts gelegene Startcodons des eigentlichen Leserahmens nicht mehr erreichen können (Hood *et al.*, 2009).

Für eukaryotische uORFs konnte noch eine weitere wichtige Funktion nachgewiesen werden, nämlich die der Destabilisierung von mRNA-Molekülen. uORFs „imitieren“ demzufolge mRNAs mit verfrühten Stoppcodons, welche im Normalfall als „genetischer Abfall“ (*nonsense-mediated decay*) durch unterschiedliche Abbauege degradiert werden (Geballe & Sachs, 2000). Bekannte Beispiele hierfür sind in der Bäckerhefe zu finden. Der AP1-ähnliche Transkriptionsfaktor *YAP2* kodiert für ein Protein, das in die zelluläre Stress-Antwort involviert ist (Rodrigues-Pousada *et al.*, 2004). Das Gen enthält im 5'-untranslatierten Bereich seiner mRNA zwei uORFs. uORF1 umfasst sechs, uORF2 23 Basentriplets. Beide Leserahmen tragen dazu bei, den ribosomalen Scann-Vorgang durch vorzeitige Termination zu blockieren. Damit verbunden konnte eine Destabilisierung der

mRNA nachgewiesen werden. Verglichen mit einer mutierten mRNA, bei welcher die Starttripletts beider uORFs in AAG konvertiert wurden, war diese um das Fünffache erhöht (Vilela *et al.*, 1998; 1999). Zudem konnte der destabilisierende Effekt der YAP2-uORFs auch auf andere mRNAs übertragen werden, sowohl auf die homologer Gene aus Hefe, als auch auf mRNAs heterologer Reportergene (Vilela *et al.*, 1999).

Als ein weiteres Beispiel für eine negative Regulation der Genexpression durch uORFs kann *CPAI* aus *S. cerevisiae* genannt werden. Das Gen kodiert für die kleine Untereinheit der Carbamoylphosphatsynthetase A (CPSase A). Dieses Enzym ist für die ATP-abhängige Umsetzung des Amidstickstoffs von Glutamin und Hydrogencarbonat zu Carbamoylphosphat, ADP, anorganischem Phosphat sowie Glutamat verantwortlich. Carbamoylphosphat ist in Hefe für die Arginin-Biosynthese essentiell (Lacroute *et al.* 1965; Davis, 1986). In Anwesenheit von genügend Arginin im Wachstumsmedium konnte eine negative Regulation der *CPAI*-Expression auf einem post-transkriptionellen Level nachgewiesen werden (Thuriaux *et al.*, 1972). Die biochemischen Grundlagen dieser Repression wurden jedoch erst später aufgeklärt. Werner *et al.* (1985) wiesen im 5'-untranslatierten Bereich der *CPAI*-Gensequenz einen kurzen offenen Leserahmen von 25 Basentripletts nach, welcher nicht im selben Leserahmen der kodierenden Sequenz des Gens verlief. Durch spezifisch eingeführte Mutationen des uORFs konnte in den betreffenden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp eine konstitutive *CPAI*-Expression auch unter Arginin-Zufuhr nachgewiesen werden. Demnach wurde eine negative regulatorische Funktion des uORFs in Verbindung mit der Arginin-spezifischen Repression angenommen (Werner *et al.*, 1987). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, dass das vom uORF kodierte Peptid (*arginine attenuator peptide*, AAP) die Expression auf translationeller Ebene reguliert, indem es eine Arginin-spezifische Blockade der Ribosomen am Terminationstriplet des uORFs auslöst (*termination stalling*; Gaba *et al.*, 2001). Dabei wurde außerdem festgestellt, dass eine erhöhte Besetzung des uORF-Terminationstripletts durch Ribosomen die Degradierung der gesamten mRNA fördert. Dies geschieht durch den Nonsense-Codon-vermittelten Abbauweg nicht-funktionaler mRNA (*nonsense-mediated mRNA decay pathway*, NMD). Dies konnte durch Untersuchung des Expressionslevels eines *CPAI*-Luciferase-Reportergens (*CPAI-LUC*) gezeigt werden. Während das Reportergen-Konstrukt, das den Wildtyp-uORF enthielt in hohem Maße degradiert wurde, konnte dies bei den mutierten Versionen (AAP-Mutation D13N; Wang *et al.*, 1999) nicht nachgewiesen werden (Gaba *et al.*, 2005).

Wie die oben genannten Beispiele beweisen, ist eine post-transkriptionelle Genregulation über uORFs nicht ungewöhnlich. Bei der näheren Untersuchung des 5'-untranslatierten Bereiches der *PFPI*-Gensequenz konnten drei kurze offene Leserahmen identifiziert werden. Zwei dieser uORFs sind überlappend stromaufwärts und stromabwärts der REMI-Integrationsstelle des pAN7-1-Vektors gelegen (vgl. Abb. 7.2.3). uORF1 umfasst 65, uORF2 30 Basentripletts. Diese Kodon-Anzahl ist für uORFs relativ hoch, doch konnten in *S. cerevisiae* auch schon längere 5'-ORFs nachgewiesen werden, wie zum

Beispiel uORF4 des mitochondrialen transkriptionellen Aktivators *PET111* mit 30 Basentriplets oder uORF1 der Protein-Kinase *SCHO9* mit 55 Codons (Vilela & McCarthy, 2003). Ein interessanter Aspekt dieser beiden uORFs ist der Befund, dass das 3'-Ende des einen (uORF1) und das 5'-Ende des anderen Leserahmens (uORF2) genau an der Stelle überlappen, wo die *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle und damit die REMI-Integrationsstelle nachgewiesen werden konnte. Wie oben beschrieben, kann eine Blockade der Ribosomen sowohl am 3'-Ende eines uORFs (*termination stalling*), als auch während der Elongation desselben (*elongation stalling*) stattfinden und damit verbunden der Abbau der gesamten mRNA. Sollte dies bei der Regulation der *PFPI*-Expression der Fall sein, könnte eine Integration des pAN7-1-Vektors an dieser Stelle tatsächlich zu einer Behinderung der Ribosomen-Barriere führen und damit zu einer Stabilisierung der *PFPI*-mRNA. Dies wäre wiederum eine Erklärung für die erhöhte Transkript-Menge in der REMI-Mutante (s. 3.1.2).

Gegen diese Überlegungen spricht jedoch, dass das 5'-Ende der *PFPI*-mRNA nach der *Bam*HI-Schnittstelle, also stromabwärts von uORF1 und 2 liegt. Dies konnte nicht nur während dieser Dissertationsarbeit (s. 3.2.1.1) sondern zudem auch in Vorarbeiten nachgewiesen werden (Albert & Knogge, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine Regulation der Transkription des *PFPI*-Gens über diese beiden uORFs ist somit eher unwahrscheinlich.

Dagegen umfasst der dritte nachgewiesene uORF die Basenpaare 1409 bis 1453 der *PFPI*-Gensequenz (15 Basentriplets) und ist damit dem Translationsstart (1529 bp) am nächsten gelegen. Im Gegensatz zu den anderen beiden uORFs liegt uORF3 stromabwärts vom nachgewiesenen Transkriptionsstart und könnte somit Teil des 5'-untranslatierten Bereiches sein. Eine Destabilisierung der mRNA im Wildtyp durch die oben genannten Mechanismen (*termination stalling* bzw. *elongation stalling*) ist hier demnach denkbar. Zudem konnte uORF3 in einem Leserahmen mit der proteinkodierenden *PFPI*-Sequenz nachgewiesen werden (vgl. Abb. 7.2.3). Eine Insertion des pAN7-1-Vektors in der REMI-Mutante könnte somit zu einer Verschiebung des Leserahmens beispielsweise durch ein verfrühtes Stoppcodon führen und somit die Funktionalität des uORFs beeinflussen.

Die Betrachtungen zu diesem Sachverhalt sind bislang jedoch nur Vermutungen. Sicherheit in kann nur durch Folgeexperimente (z.B. Reportergergestudien) erlangt werden. Bis dahin bleiben diese Überlegungen zwar möglich, jedoch vorerst rein hypothetisch.

Dicistronische Transkription

Die dritte Diskussionsmöglichkeit bezüglich der *PFPI*-Expression in der REMI-Mutante ist die Möglichkeit einer gemeinsamen Transkription des Hygromycin-B-Phosphotransferase- und *PFPI*-Gens zu einer durchgängigen mRNA. Durch die doppelte Integration des pAN7-1-Vektors in *sense*-Richtung, wurde die kodierende Sequenz der Hygromycin-B-Resistenzkassette direkt stromaufwärts der kodierenden *PFPI*-Sequenz

positioniert (vgl. Abb. 3.2). Da die *Bam*HI-Schnittstelle zwischen der Hygromycin-Sequenz und dem T_{trpC} -Terminator liegt, fehlt diese Sequenz in der REMI-Mutante, so dass theoretisch beide Gene unter der Kontrolle des P_{gpd} -Promotors als eine dicistronische mRNA transkribiert werden könnten.

Polycistronische Transkription ist ein Merkmal prokaryotischer Organismen. In Bakterien und Archaea sind Transkripte häufig, die für mehr als ein Peptid oder Protein kodieren. Dies wird polycistronische Genexpression genannt. Funktionell verwandte Gene sind in sogenannten Operonen organisiert, die simultan transkribiert oder translatiert werden. Zu den bekanntesten Beispielen gehört das *LAC*-Operon von *Escherichia coli* (Pi *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu werden eukaryotische Gene meist als monocistronische mRNAs exprimiert. Jedes Gen wird dabei einzeln unter der Kontrolle eines Promotors transkribiert und demzufolge auch einzeln ausgehend von einer spezifischen AUG-Initiationsstelle translatiert (Sachs *et al.*, 1997).

In neuerer Zeit wurden jedoch immer mehr Beispiele eukaryotischer Gene bekannt, die in Operonen organisiert vorliegen und polycistronisch transkribiert werden. Dazu gehören z.B. die funktionell verwandten Gene *FIB-1* und *RPS-16* aus *Caenorhabditis elegans*. Sie kodieren für das Nukleolus-Protein Fibrillarin und die kleine Ribosomen-Untereinheit 16 und werden als dicistronische mRNA transkribiert. Diese wird anschließend durch *trans*- und *cis*-Spleißen in zwei monocistronische mRNAs prozessiert, die einzeln translatiert werden (Pi *et al.*, 2009). Weitere Beispiele sind aus Insekten bekannt. Der *Stoned*-Locus in *Drosophila melanogaster* wurde während eines Screens nach paralytischen Mutanten identifiziert. Die Gene *STNA* und *STNB* werden als eine 8,4 kb lange dicistronische mRNA transkribiert. Die beiden ORFs sind durch nur 55 bp voneinander getrennt (Andrews *et al.*, 1996). Ein weiteres Beispiel aus der Fruchtfliege ist der *ADH/ADHR*-Locus. Er kodiert zum einen für die Alkoholdehydrogenase (*Adh*), zum anderen für ein *Adh*-verwandtes Protein (*Adh related*, *Adhr*; Brogna & Ashburner, 1997). Während *ADH* auch als monocistronische mRNA vorliegt, ist *ADHR* nur als dicistronisches Transkript nachgewiesen worden. Erst kürzlich konnte in *Bombyx mori* eine tricistronische mRNA identifiziert werden, die für das sogenannte paralytische Peptid (PP) oder Zytokin sowie für zwei weitere verwandte Peptide der ENF-Familie kodiert (uENF1 und uENF2 für *upstream of ENF peptide 1* bzw. 2). RT-PCR-Analysen zeigten einen hohen Konservierungsgrad dieser mRNA in anderen Motten-Arten. Des Weiteren konnte mittels Reporter-gen-Studien, bei denen nacheinander alle drei ORFs der mRNA durch die kodierende Sequenz des Luziferase-Gens des Glühwürmchens ersetzt wurden, eine Translation aller drei Proteine in Zell-Linien, Larven-Gewebe und Zell-freien Systemen nachgewiesen werden (Kanamori *et al.*, 2010).

In filamentösen Pilzen tritt polycistronische Transkription seltener auf. Dass sie jedoch auch in diesen Organismen eine Rolle spielt, zeigt die Expression des *CRG1*-Gens in *Cercospora nicotianae* (Chung *et al.*, 2003). *CRG1* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der eine Funktion bei der Produktion von Cercosporin und auch bei

der Entwicklung von Resistenzmechanismen gegen dieses Pilz-Toxin inne hat. Die Klonierung und Sequenzierung der Region stromabwärts der kodierenden Sequenz des *CRGI*-Gens ergaben einen weiteren offenen Leserahmen, der für ein putatives Uracil-Transporter-Protein kodiert (*PUTI*). Durch DNA-RNA-Hybridisierung (*Northern*) konnten sowohl die beiden monocistronischen als auch eine 4,5 kb-lange dicistronische mRNA, die beide ORFs enthielt, nachgewiesen werden. Während sowohl die monocistronische *CRGI*-mRNA als auch das dicistronische Transkript konstitutiv vorhanden waren, wurde die monocistronische *PUTI*-mRNA differentiell in Abhängigkeit vom Medium exprimiert. Dies gilt als eines der wenigen Beispiele für polycistronische Transkription von zwei funktionell nicht miteinander verwandten Genen in Pilzen.

Diese Beispiele zeigen, dass auch in eukaryotischen Systemen polycistronische Transkription ein möglicher Regulationsmechanismus ist. Man könnte sich also durchaus vorstellen, dass durch die zufällige Positionierung der kodierenden Sequenz des Hygromycin-B-Phosphotransferasegens wenige Basenpaare stromaufwärts der kodierenden *PFPI*-Sequenz sowie das Fehlen der Terminator-Sequenz beide Gene als eine disistronische mRNA transkribiert werden. Wenn der Promotor der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* zu einer stärkeren Expression als der endogene *PFPI*-Promotor führte, würde dies die erhöhte Transkriptmenge in der REMI-Mutante erklären.

Diese Überlegung ist zu diesem Zeitpunkt rein hypothetisch. Im Gegensatz zu den beiden anderen oben erwähnten Punkten (Repression, uORFs) kann diese jedoch relativ schnell durch weiterführende Experimente belegt werden. Die einfachste Methode wäre der Nachweis des dicistronischen Transkriptes durch RT-PCR und anschließender Sequenzierung.

Die oben diskutierten Mechanismen könnten Erklärungen für die erhöhte *PFPI*-Transkriptmenge in der REMI-Mutante im Vergleich zum Wildtyp liefern. Ob diese Überlegungen in die richtige Richtung zielen, kann jedoch nur durch weiterführende Experimente geklärt werden. Fakt ist, dass der apathogene Phänotyp der REMI-Mutante nicht auf eine reduzierte oder inhibierte, sondern eher auf eine erhöhte *PFPI*-Genexpression zurückzuführen ist. Die sich daraus ergebende Frage ist, weshalb dies eine Auswirkung auf die Pathogenität des Pilzes hervorrufen sollte. Eine Erklärung dafür wäre, dass es sich bei *PFPI* nicht um einen Pathogenitätsfaktor im eigentlichen Sinne handelt, sondern dass der Phänotyp der REMI-Mutante durch nicht identifizierte, andere Mutationen ausgelöst wurde. Dagegen spricht jedoch die re-etablierte Pathogenität der REMI-Komplementationsmutante. Es war deshalb wichtig eine gerichtete Deletion des *PFPI*-Gens durchzuführen, um den Einfluss möglicher Hintergrund-Mutationen ausschließen zu können.

4.2 Die konstitutive Expression des *PFPI*-Gens – erste Hinweise auf eine regulatorische Funktion?

Die Expression des *PFPI*-Gens wurde sowohl *in planta* (Real-Time-PCR) als auch *ex planta* (*PFPI*-Promotorfusionstudien) im *R.-commune*-Wildtyp-Isolat UK7 untersucht (s. 3.2.2). Dabei wurde in beiden experimentellen Ansätzen eine konstitutive Expression des Gens auf einem niedrigen Niveau nachgewiesen. Zusammen mit den Beobachtungen, die während der Untersuchung der Deletionsmutanten gemacht wurden (s. 4.4), wiesen diese Ergebnisse auf eine eher regulatorische Funktion des Pfp1-Proteins mit möglicher Beteiligung an bestimmten Entwicklungsprozessen hin. Vergleiche mit der transienten Expression des *NIP1*-Gens, das während früher Phasen der *in-planta*-Interaktion hoch exprimiert ist, führten zu der Vermutung einer vom Infektionsprozess unabhängigen Funktion für Pfp1.

Beispiele für konstitutiv exprimierte regulatorische Gene sind auch in anderen pilzlichen Organismen zu finden. In *Saccharomyces cerevisiae* wird der zentrale Regulator des Galaktose-Metabolismus *GAL4* konstitutiv exprimiert. Galaktose wird in Hefe über den sogenannten Leloir-Abbaupfad in Glukose-6-Phosphat umgewandelt und über die Glykolyse verwertet (Kosterlitz, 1943; Leloir, 1951). Die Gene, die für diesen Umwandlungsprozess verantwortlich sind, werden jedoch nur bei Anwesenheit von Galaktose exprimiert. Dies wird durch das Gal4-Protein reguliert, welches mit seiner DNA-Bindedomäne (Cystein-Zink-Finger; Johnston, 1987a) an bestimmte Sequenzen im 5'-Bereich der *GAL*-Gene (*upstream activation sequences*, UAS) bindet und deren Transkription veranlasst (Guarente *et al.*, 1982). Wird der Abbau von Galaktose nicht benötigt, ist Gal4 durch die direkte Interaktion mit dem Repressor-Protein Gal80 blockiert (Johnston, 1987b). Trotzdem wird *GAL4* auch unter Abwesenheit von Galaktose konstitutiv exprimiert. Matsumoto *et al.* (1978) generierten eine Temperatur-sensitive *gal4*-Mutante, die bei 35°C kein Gal4-Protein exprimiert. Bei anschließender Inkubation bei 25°C und Galaktose-Zugabe wird Gal4 jedoch gebildet und induziert die Expression der *GAL*-Gene. Die dabei gemessene Zeitspanne (*lag time*) bis zur Induktion der *GAL*-Genexpression repräsentierte die Zeit, die zur Neusynthese des Gal4-Proteins benötigt wurde (35 min). Im Wildtyp war die gemessene Zeitspanne nach Galaktose-Zugabe kürzer (15 min), so dass angenommen wurde, dass durch konstitutive Expression des *GAL4*-Gens das Gal4-Protein schon vorgebildet in der Zelle existiert.

Ein anderes Beispiel für die konstitutive Expression eines regulatorischen Gens findet sich innerhalb des Stickstoff-Sekundärstoffwechsels. Von pilzlichen Organismen favorisierte Stickstoff-Quellen sind Ammoniak, Glutamin und Glutamat. Stehen diese jedoch nicht zur Verfügung oder sind sie nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden, können auch andere Stickstoff-Quellen wie Nitrat, Nitrit, Purine, Amide, die meisten Aminosäuren und Proteine genutzt werden. Die Verstoffwechslung dieser

Verbindungen unterliegt einer strengen Kontrolle und erfordert die Synthese spezifischer katabolischer Enzyme und Permeasen, deren Expression sonst reprimiert wird (Marzluf, 1997). Die Umsetzung von Nitrat als Stickstoff-Quelle wird in *Neurospora crassa* durch die Enzyme Nit3 (Nitrat-Reduktase) und Nit6 (Nitrit-Reduktase) katalysiert (Bahns & Garret, 1980; Fu & Marzluf, 1987). Deren Expression wird durch das Protein Nit4 reguliert (Soger & Giles, 1965; Marzluf, 1981). Dabei interagiert Nit4 mit den 5'-Promotorregionen beider Gene. In Nit4 konnte ein Zn(II)2Cys6-Zink-Finger-Motiv identifiziert werden, das essentiell für die DNA-Bindung und damit seine regulatorische Funktion ist (Yuan *et al.*, 1991). Die Expression des *NIT4*-Gens konnte als konstitutiv auf einem sehr niedrigen Niveau und unabhängig vom jeweiligen Angebot an Stickstoff-Verbindungen nachgewiesen werden (Fu *et al.*, 1989).

Das Maispathogen *Ustilago maydis* reagiert auf Eisen-Mangel in seiner Umgebung mit der Produktion und Sekretion von hoch-affinen Eisen-Chelatoren (Siderophoren), die als Ferrichrom und Ferrichrom A bezeichnet werden (Bagg & Neilands, 1987; Budde & Leong, 1989). In einer Arbeit von Voisard *et al.* (1993) wurden *U.-maydis*-Mutanten untersucht, die auch unter hohen Eisen-Konzentrationen im Medium noch Siderophore ausbildeten. Dabei wurde das Gen *URBS1* (*U. maydis regulator of biosynthesis of siderophores*) als Regulator der Siderophor-Biosynthese identifiziert, da es in der Lage war, diese Mutanten zu komplementieren. Das Protein Urbs1 enthält zwei Zink-Finger-Motive ähnlich denen des Erythroid-Transkriptionsfaktors GATA-1 in Vertebraten sowie den Regulatoren des Stickstoff-Metabolismus in *Neurospora crassa* (Nit2) bzw. *Aspergillus nidulans* (AreA). RNA-Hybridisierungen ergaben eine konstitutive Expression des Regulator-Gens auf sehr geringem Niveau. Deletionsmutanten von *URBS1* zeigten eine konstitutive Produktion von Siderophoren auch unter Zugabe von Eisen-Verbindungen. Urbs1 wird demnach als Regulator-Protein diskutiert, das direkt oder indirekt die Biosynthese von Siderophoren in *U. maydis* reprimiert.

Die Ausbildung der mutualistischen Symbiose zwischen Rhizobien und Leguminosen vom Beginn der Infektion bis zur Knötchenbildung an den Wurzeln beruht auf der Produktion von Nod-Faktor-Signalmolekülen (Oldroyd & Downie, 2004). Nod-Faktoren (von engl. *nodulation*) sind Lipo-Chitooligosaccharide, die vom Bakterium sekretiert werden und in der Pflanze durch LysM-Rezeptor-Kinasen perzipiert werden (Radutoiu *et al.*, 2003; Madsen *et al.*, 2003; Limpens *et al.*, 2003). Durch nachfolgend erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen im perinuklearen Raum wird eine Calcium- und Calmodulin-abhängige Proteinkinase angeschaltet, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren aktiviert, die für die nachfolgende Expression Nod-Faktor-responsiver Gene verantwortlich sind und deshalb NRFs genannt werden (engl. für *Nod factor response factors*; Smit *et al.*, 2005). Ein solcher NRF ist der Transkriptionsfaktor Nsp1 (*nodulation signaling pathway 1*), der für alle bekannten Nod-Faktor-induzierten Änderungen in der Genexpression in der infizierten Pflanze verantwortlich ist. *NSP1* kodiert ein Protein, das Ähnlichkeit zu Transkriptionsfaktoren vom GRAS-Typ besitzt. *NSP1*-Mutanten, die das für GRAS-

Transkriptionsfaktoren essentielle C-terminale SAW-Motiv nicht mehr besitzen, zeigten einen *loss-of-function*-Phänotyp (Catoira *et al.*, 2000). *NSP1* wird konstitutiv in den Wurzeln exprimiert. Das Expressionsniveau ändert sich nach Rhizobien-Inokulation nicht. Dies spricht ebenfalls für eine Funktion des Transkriptionsfaktors als NRF, da diese bereits in einer inaktiven Form konstitutiv in den Wurzeln vorhanden sind und nach Nod-Faktor-Perzeption aktiviert werden (Smit *et al.*, 2005).

4.3 Pfp1 als Protein mit Epc-N-Domäne – Funktionen homologer Proteine

In-silico-Analysen der Pfp1-Proteinsequenz erbrachten den Nachweis einer Epc-N-Domäne (*Enhancer of the Polycomb-N-terminus*) mit PZP-Motiv (s. 3.3.1). Proteinen mit dieser Strukturdomäne wird eine Rolle bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen zugeschrieben, häufig im Zusammenhang mit epigenetischen Mechanismen wie der Chromatin-Erkennung und -Bindung (Perry, 2006). Des Weiteren wurden Vertreter dieser Gruppe von Proteinen gemäß ihrer zusätzlichen strukturellen Eigenschaften in vier Subfamilien eingeteilt (vgl. Abb. 3.24). Pfp1 konnte der Untergruppe IV zugeordnet werden (s. 3.3.1; Abb. 3.25 und 3.26). Ebenfalls in diese Subfamilie gehören die Proteine Jade-1 (Mensch), Rhinoceros (Rno, *Drosophila melanogaster*) und Nto1p (*Saccharomyces cerevisiae*). Sie zeigen eine hohe Sequenzhomologie zu Pfp1 (vgl. Abb. 3.25). Die ersten beiden der drei genannten Pfp1-Homologen sind strukturell und funktionell gut untersucht. Deshalb sollen sie hier ausführlicher betrachtet werden.

Jade-1 (Phf17)

Das Protein Jade-1 (*gene for apoptosis and differentiation in epithelia*) oder Phf17 (*PHD finger protein 17*) konnte in einem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen als einer der Interaktionspartner des von-Hippel-Lindau-Proteins (pVHL) identifiziert werden (Zhou *et al.*, 2002). Das von-Hippel-Lindau-Gen (*VHL*) kodiert eines der bekanntesten Tumor-Suppressor-Proteine im Menschen. Mutationen des Gens führen zur Ausbildung der von-Hippel-Lindau-Krankheit (VHL), welche sich in der Entwicklung von multiplen Tumoren manifestiert, wie z.B. Tumore der Blutgefäße (Hämangioblastome), der Netzhaut, des Zentralnervensystems, der Nebenniere (Phäochromozytom) und der Niere (Hypernephrom) (Kim & Kaelin Jr., 2003). VHL-Patienten haben im Normalfall erblich bedingt nur ein aktives *VHL*-Allel. Sie sind heterozygot (*VHL*^{+/-}). Die Entwicklung der Krankheit ist meist auf den spontanen Verlust des Wildtyp-*VHL*-Allels in der betroffenen Zelle zurückzuführen (*VHL*^{-/-}) (Kaelin Jr., 2004). Der Mechanismus, über den pVHL in

die Tumor-Suppression involviert ist, bleibt zumindest teilweise ein Mysterium. Einen bekannten Weg stellt die Regulation des HIF-Proteins durch pVHL dar. HIF (*hypoxia-inducible factor*) ist für die Expression verschiedener Hypoxie-induzierter Gene in der Zelle unter Sauerstoffmangel verantwortlich. pVHL wurde als Untereinheit des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes identifiziert, welcher bei Anwesenheit von genügend Sauerstoff die Polyubiquitinierung der HIF- α -Untereinheit und damit den Abbau des Proteins veranlasst. Ein Verlust von pVHL führt daher zur gesteigerten Expression Hypoxie-induzierter Gene in der Zelle. Klinische und biochemische Studien zeigten allerdings, dass Hypoxie-induzierende Faktoren in der Zelle für die Ausbildung der Tumorgenese zwar notwendig, jedoch nicht ausreichend bzw. bestimmend sind. Daher wurde angenommen, dass pVHL noch über andere regulatorische Wege in die Suppression der Ausbildung maligner Tumore involviert ist (Zhou *et al.*, 2004). Ein Ansatz zur Identifizierung und Untersuchung dieser Wege war die Suche nach neuen pVHL-Interaktionspartnern über den oben genannten Hefe-Zwei-Hybrid-Screen. Das so identifizierte Protein Jade-1 ist ein 64 kDa großes Protein. Zunächst wurden in der Proteinsequenz zwei hintereinander gelegene PHD-Domänen sowie ein N-terminal gelegenes PEST-Motiv (bekannte Erkennungssequenz für Ubiquitin-vermittelten Protein-Abbau) nachgewiesen (Zhou *et al.*, 2002, 2004). Die PHD-Domänen konnten in neuerer Zeit als Teil des PZP-Motives und damit als Teil der im Protein enthaltenen Epc-N-Domäne identifiziert werden (Perry, 2006). Jade-1 unterliegt einem hohen Umsatz (*turnover*) in der Zelle (PEST-Sequenzen). Zudem ist es hoch exprimiert in den Zellen der Proximalen Tubuli der Nierenkörperchen, welche als Vorstufen-Zellen für die Ausbildung von Nierentumoren gelten. In Nierenkrebszellen ist es jedoch kaum nachweisbar (Zhou *et al.*, 2005). Das Protein bindet pVHL über seine erweiterte PHD-Domäne und wird dadurch stabilisiert. Mutationen in *VHL* können zum Verlust der Bindung und Stabilisierung der beiden Proteine führen, da diese über die α - und β -Domänen des pVHL vermittelt wird. Aufgrund dieser Tatsache wird angenommen, dass Jade-1 durch Bindung an pVHL eine wesentliche Rolle in der Tumor-Suppression in den Nieren während der VHL-Pathogenese spielt (Zhou *et al.*, 2004). Weiterführende Studien ergaben zudem sowohl eine Funktion des Proteins in der Inhibierung des Wachstums von Nierenkrebszellen als auch in der Förderung der Apoptose. Dies ist auf eine Reduktion der Konzentration von Bcl-2, einem Anti-Apoptose-Protein, in den Zellen zurückzuführen. Jade-1 repräsentiert damit eine proapoptotische Barriere der Zellproliferation, welche in Krebszellen zunächst überwunden werden muss (Zhou *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren lag der Fokus der Arbeiten zu Jade-1 zunehmend auf der Untersuchung seiner molekularen Funktion. Dabei konnten neben den oben genannten noch weitere Charakteristika für Jade-1 definiert werden. Da PHD-Finger-Proteine zunehmend als Module für Chromatin-Remodelling und Protein-Protein-Interaktionen diskutiert wurden, nahm man eine Rolle von Jade-1 als Cofaktor des

Histonacetyltransferase-Komplexes bzw. als Transkriptionsfaktor an. Panchenko *et al.* (2004) konnten endogenes Jade-1 durch die Anwendung eines spezifischen Antikörpers vorwiegend im Zellkern nachweisen. Ko-Transfektionsexperimente viraler Gal4-responsiver Promotorkonstrukte mit Gal4-Jade-1-Fusionsproteinen zeigten eine gesteigerte Expression des jeweiligen Reportergens unter der Kontrolle der viralen Promotoren, was auf eine mögliche Funktion von Jade-1 als Transkriptionsaktivator hinweist. Des Weiteren konnte eine Interaktion des Proteins mit TIP60, einer H4-spezifischen Histonacetyltransferase (HAT), nachgewiesen werden. Beide Funktionen, sowohl die der transkriptionellen Aktivierung als auch die der HAT-Bindung, sind abhängig vom Vorhandensein der beiden PHD-Domänen. Jade-1 wurde damit als neuer Koaktivator transkriptioneller Kontrolle mit HAT-Aktivität diskutiert (Panchenko *et al.*, 2004).

Datenbank-Analysen erbrachten den Nachweis zweier zusätzlicher Jade-1-Paraloge, Jade-2 und Jade-3. Des Weiteren konnten zwei durch alternatives Spleißen entstandene Isoformen von Jade-1 identifiziert werden. Neben der schon bekannten kurzen Form von 509 Aminosäuren (Jade-1) existierte auch noch eine um 333 Aminosäuren längere Form des Proteins (Jade-1L). Zusammen bilden sie die kleine Familie der Jade-Proteine. Jade-1L, Jade-2 und Jade-3 konnten zusammen mit dem Histon H4-spezifischen Histonacetyltransferase-Komplex HBO1 isoliert werden. HBO1 ist ein Homologes des TIP60-Komplexes und verantwortlich für die Acetylierung der Lysin-Reste 5, 8 und 12 des Histons H4, welches in Gen-Regulation und in DNA-Replikation involviert ist (Avvakumov & Cote, 2007; Miotto & Struhl, 2008). In weiterführenden Experimenten konnte eine synergetische Wirkung von Jade-1/1L auf HBO1 gezeigt werden. Die Proteine können demnach nur in Kombination die Histon H4-Acetylierung fördern. Für sich allein bleiben sie ohne Effekt. Zudem stabilisieren sich beide Proteine gegenseitig. Die Bindung von Jade-1/1L wird wiederum durch seine PHD-Domänen vermittelt (Foy *et al.*, 2008).

Eine letzte, jedoch sehr interessante Funktion von Jade-1 konnte in Verbindung mit dem kanonischen Wnt-Signalweg nachgewiesen werden. Dieser ist evolutionär hoch konserviert und spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Zell-Kommunikation und in zahlreichen Entwicklungsmechanismen (Eisenmann, 2005). In einer Studie zur Identifizierung neuer Jade-1-Partner (Hefe-Zwei-Hybrid-System) konnte β -Catenin, ein Onkoprotein und Transkriptionsaktivator des Wnt-Signalweges, als Interaktor identifiziert werden. Dabei wurde eine E3-Ubiquitin-Ligase-Funktion für Jade-1 nachgewiesen, die es ermöglicht, den Abbau von β -Catenin unabhängig von dessen Phosphorylierungsstatus in der Zelle zu steuern. Ist β -Catenin nicht in ausreichender Menge in der Zelle vorhanden, wird der Wnt-Signalweg und damit die Transkription responsiver Gene unterbrochen. Zudem wurde gezeigt, dass das Tumor-Suppressor-Protein pVHL die Expression von β -Catenin Jade-1-abhängig herabreguliert und die Phosphorylierung des Proteins inhibiert. Die Jade-1-vermittelte Inhibierung des Wnt-Signalweges wird somit als ein weiterer

molekularer Mechanismus der pVHL-Tumor-Suppression diskutiert (Chitalia *et al.*, 2008).

Rhinoceros (Rno)

Das Gen *Rhinoceros* (*RNO*) wurde in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* erstmals durch einen EMS-vermittelten Mutagenese-Screen identifiziert. Homozygote *rno*-Mutationen lösten in Geweben für die Antennen- und Augenentwicklung zwei Phänotypen aus. Zum einen konnte eine Deformierung der Antennenborste (Arista) zu einem Bein-ähnlichen Anhang beobachtet werden. Das Auftreten dieser Horn-ähnlichen Struktur am Kopfteil der Fliege verhalf dem Gen zu seinem Namen, wurde jedoch nicht weiter untersucht. Der zweite beobachtete Phänotyp äußerte sich in einer Überproduktion von Photorezeptoren, Kristallkegelzellen und Pigmentzellen in adulten Augen sowie einer Reduzierung der Apoptose undifferenzierter Zellen (Voas & Rebay, 2003).

Die Augenentwicklung in *Drosophila* wird durch einen der bekanntesten Signalwege gesteuert, welcher durch den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*, EGFR) und eine konservierte Signalkaskade vermittelt wird. Der Signalweg schließt die Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade ein, welche ihrerseits durch die Aktivierung einer Ras-GTPase angeschaltet wird. Der Signalweg wird deshalb auch oft als Ras-Signalkaskade bezeichnet (Wasserman & Freeman, 1997). Der EGF-Rezeptor ist eine membranständige Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die in ihrer aktiven Form ein Homodimer ausbildet. Die Dimerisierung wird durch die Bindung eines bestimmten für den erforderlichen Signalweg spezifischen Liganden aktiviert. Bekannte Ligandenproteine in *Drosophila* sind z.B. Spitz (Spi; Rutledge *et al.*, 1992), Gurken (Grk; Ray & Schüpbach, 1996) und Vein (Vn; Schnepf *et al.*, 1996). Die Spezifizierung der verschiedenen Zelltypen in der Augenuntereinheit (Ommatidium) des *Drosophila*-Auges wird durch die sich wiederholende Sekretion des Spitz-Liganden gesteuert. Von der ersten Photorezeptorzelle (R8) ausgehend werden nach und nach alle anderen R-Zellen ausgebildet sowie nachfolgend die Kristallkegel- und Pigmentzellen. Restliche undifferenzierte Zellen werden schließlich durch Apoptose eliminiert (Freeman, 1996).

Aufgrund des besonderen Phänotyps der *rno*-Mutanten (Überproduktion multipler Augenzell-Typen und reduzierter programmierter Zelltod) wurde angenommen, dass Rno eine Funktion als Antagonist des Ras-Signalweges hat. Gestützt wurde diese Annahme durch mehrere Befunde. Erstens führt ein mutiertes *RNO*-Allel zu einer Steigerung des bekannten *aos*-Augen-Phänotyps. *AOS* kodiert in der Fliege für das Protein Argos, das als ein sekretierter Inhibitor des EGFR-Signalweges bekannt ist. Die Expression von *AOS* ist von diesem Signalweg abhängig, so dass die Inhibierung als negativer Feedback-Loop zu betrachten ist (Freeman, 1998). Zweitens verstärkt die *rno*-Mutation einen durch konstitutive Expression des Ras-Proteins ausgelösten Mutanten-Phänotyp (Ras^{V12}, rauhe,

blasige Augenoberfläche). Drittens ist *rno* in der Lage, den dominant-negativen Phänotyp Ebi (EbiN, rauhe verkleinerte Augenoberfläche) zu supprimieren. Ebi erfüllt eine Funktion nach Signalperzeption durch den EGF-Rezeptor, wo es in den Abbau der antagonistischen Transkriptionsfaktoren Tramtrack88 und Su(H) involviert ist (Dong *et al.*, 1999, Tsuda *et al.*, 2002). Und viertens kann in *rno*-Mutanten eine leicht reduzierte Argos-Proteinkonzentration nachgewiesen werden, was auf eine unzureichende Inhibierung des Ras-Signalweges hinweist. Zusammengenommen lassen diese Ergebnisse auf eine Funktion von Rno als Antagonist des EGFR/Ras-Signalweges schließen. Der molekulare Mechanismus dahinter ist allerdings noch nicht verstanden (Voas & Rebay, 2003).

Die abgeleitete Rno-Proteinsequenz umfasst 3241 Aminosäuren. Durch Pfam-Analyse konnte man einen C4HC3-PHD-Finger sowie eine erweiterte Zink-Finger-ähnliche Cystein-reiche Region nachweisen (Voas & Rebay, 2003), die nachfolgend als PZPM-Domäne identifiziert wurde (Perry, 2006). Rno ist dem oben beschriebenen Jade-1 strukturell sehr ähnlich. Zudem konnten Voas & Rebay (2003) eine Lokalisierung des Proteins durch polyklonales anti-Rno Antiserum im Nukleus nachweisen, was eine molekulare Funktion desselben als Chromatin-Remodelling- bzw. Transkriptionsfaktor denkbar macht.

Eine zweite interessante Funktion von Rno konnte durch die Analyse einer *rbf/rno* Doppelmutante in *Drosophila* nachgewiesen werden. Das Retinoblastoma-Protein (pRb) ist in Säugetieren als wichtiger Tumor-Suppressor bekannt und liegt in Krebszellen häufig mutiert oder inaktiviert vor (Classen & Harlow, 2002; Weinberg, 1995). In *Drosophila* ist das Protein ebenfalls konserviert (Rbf) und reguliert im Normalfall wichtige zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose (Du & Pogoriler, 2006; van den Heuvel & Dyson, 2008). Während seine Rolle in ersterem und letzterem gut untersucht ist, sind die Mechanismen zur Regulierung der Zelldifferenzierung weniger bekannt. Da *rbf*-Mutationen nur leichte Defekte zeigten, ging man zunehmend von der Existenz redundanter Mechanismen zur Kontrolle der Zelldifferenzierung aus. Steele *et al.* (2009) führten einen genetischen Screen durch, der zur Identifizierung von Mutationen mit synergistischen Defekten in der Zelldifferenzierung in Verbindung mit der *RB*F-Inaktivierung führen sollte. Dabei konnte man die oben genannte Doppelmutante identifizieren, die starke Defekte in der Differenzierung der Zellen des *Drosophila*-Auges hervorrief. Neben einer ungewöhnlich glänzenden Augenoberfläche, unregelmäßiger Ommatidienformen und ungeordneter Struktur derselben fielen im Detail die verzögerte Differenzierung der Photorezeptorzellen, die defekte Ausbildung der Kristallkegelzellen und vor allem multiple R8-Zellen auf. Besonders letztgenannter Phänotyp war wiederholt in Mutationen beobachtet worden, die die Notch- oder EGFR-Signalwege betreffen. Notch ist ein membranständiger Rezeptor, der die lokale Zell-Zell-Kommunikation vermittelt und über einen konservierten Signalweg (Notch-Signalweg) die Zelldifferenzierung und die

Entwicklung spezifischer Gewebe reguliert (Lai, 2004). Die Notch-Signalkaskade wird durch die Bildung des Ligandenproteins Delta (Dl) aktiviert. Eine Funktion des Notch-Signalweges ist die Determinierung der R8-Zellen als erste Photorezeptoren in der Augenkemmscheibe. Die Doppelmutanten *rbf/rno* zeigten eine reduzierte *DL*-Expression. Heterozygote *dl*-Mutanten vor dem Doppelmutanten-Hintergrund konnten den *rbf/rno*-Phänotyp der multiplen R8-Zellen noch verstärken, während eine verstärkte *DL*-Expression den Phänotyp supprimierte. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerte man, dass Dl ein Ziel sowohl für Rbf als auch Rno darstellt, da für beide Proteine eine Funktion als Transkriptionsaktivatoren diskutiert wird (Steele *et al.*, 2009). Für Rbf ist diese Rolle schon länger bekannt. Das Protein aktiviert oder reprimiert die Expression bestimmter Gene durch die Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren (Dyson, 1998). Aufgrund seiner Struktur ist auch für Rno eine solche Rolle möglich. Damit ist für Rno eine duale Funktion als Protagonist des Notch-Signalweges und Antagonist der Ras-Kaskade denkbar.

Nto1p

Das Protein Nto1p aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist weniger gut untersucht als Jade-1 und Rno. Nto1p ist jedoch als eine Untereinheit des in Hefe gut untersuchten NuA3-Histonacetyltransferase-Komplexes nachgewiesen worden (Lee & Workman, 2007). Ihm wird eine Funktion in der Erkennung epigenetischer Signaturen, speziell von Histon-Methylierungen nachgesagt. Für eine andere Untereinheit der NuA3-HAT, Yng1p, konnte eine solche Funktion schon nachgewiesen werden. Yng1p erkennt spezifisch trimethylierte Lysin-K4-Reste des Histon-H3-Proteins und vermittelt die nachträgliche Acetylierung, was zur aktiven Transkription bestimmter Gene führt (Taverna *et al.*, 2006).

Homologe Proteine aus anderen filamentösen Pilzen und *R. commune*

Auch in filamentösen Pilzen sind bisher mehrere Proteine mit sehr hoher Homologie zu Pfp1 annotiert worden (Proteinvergleich Pfp1 mit Pilzdatenbanken ExPASy, NCBI). Ein Sequenzvergleich von Pfp1 mit verschiedenen pilzlichen Vertretern dieser Proteinfamilie ist im Anhang in Abbildung 7.2.2.1 dargestellt und zeigt deutlich die hohe Ähnlichkeit von Pfp1 zu diesen Proteinen. Pfp1 ist demnach ein hoch konserviertes Protein und eines der ersten dieser Proteinfamilie, das in einem pilzlichen Organismus untersucht wurde.

Zusätzlich zu der Genom-Datenbank wurde kürzlich auch eine Datenbank exprimierter Gene (ESTs) von *Rhynchosporium commune* generiert (Navarro-Quezada & Knogge, unveröffentlichte Ergebnisse). Aus den vorhandenen Nukleotidsequenzen konnten 22500 offene Leserahmen abgeleitet werden. Über *pfam-search* (Sonnhammer *et al.*, 1997;

Durbin *et al.*, 1998; Finn *et al.*, 2006; Wellcome Trust Sanger Institute Cambridge, UK) und Verwendung der UniProt-Datenbank (The UniProt Consortium, 2007) konnten mögliche funktionelle Domänen der abgeleiteten Proteinsequenzen identifiziert werden. Dabei konnten in jeweils 13 der Proteinsequenzen Ähnlichkeiten zu PHD-Zink-Finger-Domänen nachgewiesen werden. Diese Sequenzen wurden daraufhin auf weitere Struktur motive wie den *Zn-knuckle* und PHD-Derivate untersucht und mit der Proteinsequenz des Pfp1-Proteins verglichen. In einer der 13 analysierten Sequenzen wurden die genannten Signaturen zusätzlich zur PHD-Domäne identifiziert. Allerdings konnten nicht alle konservierten Aminosäuren einer Epc-N-Domäne nachgewiesen werden und auch sonst zeigt das Protein, das vorerst als Pfp2 bezeichnet wurde, nur eine Sequenzähnlichkeit von 25% zu Pfp1. Abb. 7.2.2.2 im Anhang zeigt einen Vergleich der gesamten Sequenz der beiden Proteine. In Abb. 7.2.2.3 sind nur die Sequenzbereiche, die die PHD-Zink-Finger-Domänen umfassen miteinander verglichen. Aufgrund der geringen Ähnlichkeit der beiden Proteine zueinander hat Pfp2 höchstwahrscheinlich eine andere Funktion als Pfp1 in *R. commune*.

Die *PFPI*-Sequenz selbst konnte in der EST-Datenbank nicht nachgewiesen werden. Vermutlich wird das Gen unter den gewählten Anzucht-Bedingungen nicht exprimiert.

4.4 Betrachtungen zum Verhalten der *PFPI*-Deletionsmutanten – Hinweise auf mögliche Funktionen des *PFPI*-Gens

Die Generierung von Deletionsmutanten war ein wichtiger Schritt zur weiteren Analyse des *PFPI*-Gens. Die Mutanten $\Delta PFPI-1$, -2 und -3 exprimierten noch einen Teil des 3'-Bereiches der Gensequenz. In der vierten Mutante ($\Delta PFPI-4$) war die gesamte kodierende Sequenz des Gens deletiert (s. 3.4.4). Mit Ausnahme der Mutante $\Delta PFPI-2$ zeigten $\Delta PFPI$ -Mutanten in den hier durchgeführten Analysen phänotypisch keine Unterschiede zueinander. Deshalb konnte man davon ausgehen, dass der exprimierte Teil des 3'-Bereiches kein funktionsfähiges Protein ergab und dies somit keinen Einfluss auf das Verhalten der Mutanten hatte.

Die Deletionsmutante $\Delta PFPI-2$ stellte eine Besonderheit dar: der durch sie *in planta* verursachte Phänotyp war dem Wildtyp vergleichbar und unterschied sich somit von dem der anderen Mutanten. Dies war ungewöhnlich, da die *PFPI*-Wildtypsequenz auch in $\Delta PFPI-2$ deletiert war. In der Literatur sind solche Fälle sehr selten zu finden, da Deletionsmutanten, die keinen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp generieren, im Normalfall nicht näher untersucht werden. Eine Erklärung für das Verhalten der zweiten Deletionsmutante konnte deshalb bislang nicht gefunden werden. Eine mögliche ektopische Integration des Deletionskonstruktes in einen Bereich des Genoms, der in seiner Auswirkung den Phänotyp der *PFPI*-Deletion aufhebt, ist sehr unwahrscheinlich.

Die Mutante $\Delta PFPI-2$ wurde deshalb nur in den ersten Versuchen mitgeführt. Alle anderen Untersuchungen wurden nur mit den Mutanten $\Delta PFPI-1$, -3 und -4 durchgeführt und ausgewertet.

Die drei Deletionsmutanten zeigten *in planta* eine stark reduzierte Virulenz. Im Gegensatz zur REMI-Mutante kann hier nicht von Apathogenität gesprochen werden, da die Mutanten Symptome auf den Blättern suszeptibler Gerstensorten hervorriefen. Die Symptombildung war jedoch gegenüber dem Wildtyp zeitlich verzögert und enorm eingeschränkt. Mikroskopisch konnten dementsprechend sehr viel weniger Penetrationsereignisse beobachtet werden. Dieses Verhalten der Deletionsmutanten legte zunächst die Vermutung nahe, dass es sich bei *PFPI* tatsächlich um einen Faktor handelt, der entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese hat, auch wenn sich dies nicht in vollständiger Apathogenität, sondern lediglich in stark reduzierter Virulenz äußert.

Im Gegensatz dazu steht jedoch der ebenfalls bei allen Deletionsmutanten beobachtete *ex planta*-Phänotyp. Alle Mutanten zeigten sowohl auf Limabohnenagarplatten als auch in Flüssigmedium ein im Vergleich zum Wildtyp stark verlangsamtes Wachstum. Zudem war die Sporulation der Mutanten auf Agarplatten eingeschränkt. Nachfolgende Versuche ergaben, dass das verlangsamte Wachstum nicht auf eine reduzierte Keimungsrate, sondern auf eine eingeschränkte Biomassenproduktion pro Zeiteinheit zurückzuführen war. Im weiteren Sinne kann dies als Ergebnis einer vermutlich verlangsamten Zellteilung angesehen werden. Die eingeschränkte Sporulation wäre dann als eine Folge davon zu sehen. Des Weiteren konnte bei allen Mutanten *ex planta* die Ausbildung blasenähnlicher Strukturen beobachtet werden. Diese ähneln Chlamydozysten (s. S. 241 ff.). Im Wildtyp sind solche Strukturen bislang nur nach Gramin-Behandlung beschrieben worden (Kirsten *et al.*, 2011).

Pathogenitätsfaktoren sind als Faktoren beschrieben worden, die essentiell für die Pathogenität sind. Mutanten zeigen also einen apathogenen Phänotyp *in planta*, jedoch keine veränderten Eigenschaften *ex planta*. Nach dieser Definition kann man *PFPI* nicht als Pathogenitätsgen bezeichnen. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass es sich hier um ein Gen handelt, dessen Produkt indirekt oder direkt bestimmte Entwicklungsprozesse des Pilzes steuert, demzufolge also eher eine regulatorische Funktion besitzt. Dafür spricht auch der pleiotrope Phänotyp der *PFPI*-Deletionsmutanten. Proteine mit regulatorischer Funktion sind häufig an der Steuerung bestimmter Signalwege oder an epigenetischen Kontrollmechanismen beteiligt. Dies geschieht meist über Interaktionen mit anderen Proteinen. Im Folgenden sind bekannte Beispiele solcher Proteine aus anderen pilzlichen Organismen diskutiert. Aufgrund der zu $\Delta PFPI$ ähnlichen Phänotypen ihrer Deletionsmutanten könnten solche Funktionen auch für Pfp1 denkbar sein.

Die mögliche Funktion von *PFPI* innerhalb epigenetischer Mechanismen

Als epigenetische Prozesse bezeichnet man eine Vielzahl von Vorgängen an der genomischen DNA eines Organismus, die zum Teil Langzeitauswirkungen auf die Expression bestimmter Gene haben. Diesen Vorgängen gehen jedoch keine Mutationen der DNA-Sequenzen voraus (Delcuve *et al.*, 2009). Zu den epigenetischen Mechanismen, die Veränderungen am Chromatin hervorrufen, zählt z.B. das ATP-abhängige Chromatin-Remodelling. Dieser Vorgang bezeichnet die durch ATP-Hydrolyse vermittelte lokale Auflösung von DNA-Histon-Bindungen, die Veränderungen der Nukleosomen- bzw. Chromatin-Struktur hervorruft (Vignali *et al.*, 2000). Ein zweiter Mechanismus umfasst alle posttranslationalen Modifikationen an Histon-Proteinen, die strukturelle sowie funktionelle Auswirkungen auf die Chromatin-Struktur haben (Turner, 2007). Dazu gehören z.B. die Acetylierung von Lysin-Resten (Loidl, 1994; Sterner & Berger, 2000), die Methylierung von Lysin- und Arginin-Resten (Zhang & Rheinberg, 2001; Lachner & Jenuwein, 2002), die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten (Nowak & Corces, 2004) und die Ubiquitinierung von Lysin-Resten (Davie & Murphy, 1990). Ein dritter Mechanismus beinhaltet die Modifizierung der DNA selbst durch Methylierung bestimmter Basen. Dies geschieht meist an Cytosinen innerhalb Cytosin-Guanin-reicher DNA-Sequenzen (CpG-Inseln; Dobosy & Selker, 2001).

Alle genannten Mechanismen tragen in ihrer Gesamtheit dazu bei, bestimmte lebenswichtige Prozesse eines Organismus wie Wachstum, Differenzierung und Metabolismus im Hinblick auf veränderte interne und externe Signale zu regulieren (Brosch *et al.*, 2008). Meist sind an diesen Prozessen mehrere Proteine beteiligt, die in großen Komplexen miteinander interagieren und nur in dieser Form funktionell sind. Dazu gehören Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen (HDAC), Histon-Methyltransferasen und Histon-Demethylasen, DNA-Methyltransferasen und Chromatin-Remodelling-Komplexe (Brosch *et al.*, 2008). Fehlfunktionen dieser Komplexe durch Mutationen bzw. durch künstlich herbeigeführte Deletionen führen meist zu pleiotropen Phänotypen. Die betroffenen Organismen sind häufig in ihrer Entwicklung gestört. Bei Pathogenen wirkt sich diese Tatsache zudem auf deren Virulenz aus.

Der humanpathogene Pilz *Candida albicans* gilt als ein gut untersuchtes Beispiel für die Steuerung morphologischer Prozesse und Pathogenität durch epigenetische Kontrollmechanismen. Der Pilz kann drei unterschiedliche Wuchsformen ausbilden: die einzellige Hefe-Form (Blastokonidien), das sogenannte Pseudomyzel und aus echten, septierten Hyphen bestehendes Myzel. Welche Wuchsform jeweils bevorzugt wird, hängt von externen Stimuli ab. Wichtig ist jedoch, dass die Pathogenität von *C. albicans* mit der Fähigkeit korreliert, zwischen den unterschiedlichen Morphen zu wechseln. Ein Verlust dieser Eigenschaft führt zu reduzierter Virulenz oder sogar Avirulenz des Pilzes (Lo *et al.*, 1997; Braun *et al.*, 2000, 2001; Phan *et al.*, 2000; Bensen *et al.*, 2002).

Mao *et al.* (2006) konnten eine essentielle Funktion des ATP-abhängigen Swi/Snf-Chromatin-Remodelling-Komplexes während der Hyphen-Entwicklung in *C. albicans* nachweisen. Deletionen der Gene *SWI1* oder *SNF2* verhinderten die Ausbildung echter Hyphen in allen untersuchten Induktionsmedien und führten zu dauerhaftem Wachstum von Pseudomyzel. Des Weiteren konnte eine eingeschränkte Expression mehrerer spezifischer Gene für die Hyphenentwicklung beobachtet werden. Die beiden Null-Mutanten (*swi1/swi1* und *snf2/snf2*) waren zudem avirulent gegenüber Mäusen.

In einer weiteren Arbeit dazu konnte nachgewiesen werden, dass für die Bindung des Swi/Snf-Komplexes an die Promotor-Sequenzen der Hyphen-spezifischen Gene die vorangegangene nukleosomale Histon4 (H4)-Acetylierung wichtig ist. Diese findet durch die Efg1-vermittelte Rekrutierung einer NuA4-Histon-Acetyltransferase an die Promotoren jener Gene statt (Lu *et al.*, 2008).

Der Transkriptionsfaktor Efg1 nimmt eine zentrale Rolle während der Hefe-Hyphen-Morphogenese ein. Er gehört zu der APSES-Familie (für *Asm1*, *Phd1*, *Sok2*, *Efg1* und *StuA*) pilzlicher Proteine, die als Regulatoren zellulärer Differenzierung in Ascomyceten bekannt sind. Mitglieder dieser Familie haben eine konservierte bHLH-(*basic-helix-loop-helix*) DNA-Bindungsdomäne. Efg1 ist ein essentieller Regulator der Hyphen-Entwicklung, der Chlamydosporen-Bildung und des Wechsels zwischen weißer und grauer Kolonie-Ausprägung in *C. albicans* (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 1999; Srikantha *et al.*, 2000; Zordan *et al.*, 2007). Zudem autoreguliert Efg1 seine Transkription, indem es vermutlich die Bildung des transkriptionellen Initiationskomplexes behindert. In Promotorstudien konnte die Beteiligung der TATA-Box als DNA-Bindungsstelle zur Autoregulierung der *EFG1*-Transkription identifiziert werden. Zusätzlich wurde die Bindung von Sin3, einer Untereinheit des Sin3/Rpd3-Histon-Deacetylase-Komplexes, am *EFG1*-Promotor nachgewiesen. *sin3*-Mutanten wachsen ausschließlich in einer knospenden Pseudohyphen-Form und sind nicht fähig, echte Hyphen auszubilden. Dieser Phänotyp konnte auch bei Mutanten beobachtet werden, die *EFG1* konstitutiv exprimieren. Für die exakte Morphogenese ist also eine strenge Regulierung der *EFG1*-Expression notwendig. Dies geschieht durch Interaktion von Efg1 mit Sin3 und deren anschließender Bindung am *EFG1*-Promotor. Die negative Autoregulierung der *EFG1*-Transkription wird also vermutlich über Histon-Deacetylierungsmechanismen gesteuert (Tebarth *et al.*, 2003).

Erst kürzlich konnte erneut die Beteiligung zweier unterschiedlicher Histon-Deacetylasen an der Steuerung der *Candida*-Morphogenese nachgewiesen werden. Dabei fungiert Hos2 als Repressor, Hda1 als Förderer der Hyphenentwicklung. Als mögliche Mechanismen hierfür werden zum einen die funktionelle Assoziation von Hos2 und Hda1 mit positiven und negativen transkriptionellen Regulatoren der Hyphenbildung und zum anderen die Deacetylierung jener Transkriptionsfaktoren oder anderer Proteine, die direkt oder indirekt in die Morphogenese involviert sind, diskutiert (Zacchi *et al.*, 2010). Hos2 ist zusätzlich eine Komponente des Set3/Hos2-Histon-Deacetylase-Komplexes (Set3C).

Set3C ist ein Repressor des Hefe-Hyphen-Wuchsformwechsels. Zellen, denen bestimmte Kernkomponenten des Komplexes fehlen, können zwar alle Phasen der Entwicklung erreichen, sind jedoch hypersuszeptibel für Hyphen-induzierende Signale. Dies wird durch einen hyperaktiven cAMP-/Proteinkinase-A-Signalweg vermittelt, über den auch im Normalfall die morphogenetischen Prozesse gesteuert werden. *SET3*-Null-Mutanten (*set3/set3*) zeigen zudem eine stark eingeschränkte Virulenz gegenüber Mäusen (Hnisz *et al.*, 2010).

Eine Beteiligung von Histon-Deacetylasen an der Regulierung bestimmter morphologischer Prozesse und damit verbundener Ausprägung der Virulenz ist auch schon in anderen pilzlichen Organismen untersucht worden. Das Gen *HDC1* aus dem Mais-pathogenen Pilz *Cochliobolus carbonum* ist homolog zur Histon-Deacetylase *HOS2* aus *Saccharomyces cerevisiae* (Baidyaroy *et al.*, 2001). *HDC1*-Deletionsmutanten bilden kleinere und weniger häufig septierte Konidien aus. Die HDAC-Aktivität in Rohextrakten der *hdc1*-Mutanten ist um ~50% reduziert. Des Weiteren zeigen die Mutanten eine stark eingeschränkte Virulenz als Folge reduzierter Penetrationseffizienz. Das Wachstum *ex planta* ist normal auf Glukose-Medium und leicht eingeschränkt auf Saccharose. Auf anderen Kohlenstoff-Quellen ist es jedoch um 30 bis 73% reduziert. Weiterführende Untersuchungen erbrachten den Nachweis einer eingeschränkten extrazellulären Depolymerase-Aktivität und der reduzierten Expression korrespondierender Gene. Damit scheint *HDC1* eine wichtige Funktion in der Expression verschiedener Glukose-reprimierter extrazellulärer Enzyme zu haben. Die damit verbundene eingeschränkte Expression Zellwand-depolymerisierender Enzyme wird zudem als Ursache für die reduzierten Penetrationsereignisse und somit als Grund für die reduzierte Virulenz des Pilzes diskutiert.

RpdA, ebenfalls eine Histon-Deacetylase vom RPD3-Typ aus *Aspergillus nidulans*, ist essentiell für Wachstum und Entwicklung des Pilzes (Tribus *et al.*, 2010). Mutanten mit nahezu stillgelegter Genexpression (*rpda*) zeigen ein stark verlangsamtes Wachstum und den Verlust der Sporulationsfähigkeit. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass eine konservierte Region im C-Terminus des Proteins sowohl für seine physiologische Funktionalität als auch für dessen enzymatische Aktivität notwendig ist und damit eine essentielle Rolle für die Lebensfähigkeit des Pilzes spielt.

Neben den Histon-Deacetylasen konnten auch für andere Histon-modifizierende Enzyme Funktionen in Wachstum und Entwicklung und der damit verbundenen Virulenz pathogener Pilze nachgewiesen werden. Das Gen *ESAI* (*essential SAS2-related acetyltransferase*) aus *Saccharomyces cerevisiae* kodiert für eine Histon-Acetyltransferase, die zur sogenannten MYST-Familie (für MOZ, YBF2/SAS3, SAS2 und Tip60; Borrow *et al.*, 1996; Neuwald & Landsman, 1997) gehört (Smith *et al.*, 1998). Das Enzym acetyliert bevorzugt bestimmte Lysin-Reste an Histon 4 (H4). Eine Punktmutation (G315E) in einer als Motiv A bezeichneten Region des Proteins führte zu einem Verlust der Acetyltransferase-Aktivität *in vitro*. Eine Deletionsmutante (*esai*)

zeigte zudem einen extremen Phänotyp: sie war im Wachstum eingeschränkt, da die Zellteilung 30-40fach langsamer als beim Wildtyp stattfand. Außerdem bildeten sich große, hantelförmige Zellen aus, die schließlich nach vier bis fünf Zellteilungen abstarben. Die Histon-Acetyltransferase Esa1 ist also essentiell für das Wachstum und die Histon-Acetylierung demzufolge ein lebenswichtiger Vorgang in Hefe (Smith *et al.*, 1998).

Der humanpathogene Pilz *Cryptococcus neoformans* ist ein opportunistisches Pathogen, das auf Veränderungen in seiner Umgebung wie z.B. hohe Temperaturen, oxidativen Stress, hohe Salzkonzentrationen, verschiedene pH-Werte und hohe CO₂-Konzentrationen angemessen reagieren kann. Diese Stresstoleranz wird durch die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege und die damit verbundene Transkription diverser Stress-Gene bewirkt (Ko *et al.*, 2009). Die Rolle von Chromatin-Remodelling-Mechanismen in Bezug auf die transkriptionelle Stressantwort war bisher jedoch wenig untersucht. O'Meara *et al.* (2010) konnten eine Funktion der Histon-Acetyltransferase Gcn5 in der Stresstoleranz des Pilzes nachweisen. Deletionsmutanten des Gens (*gcn5*) zeigten verschiedene Phänotypen in Bezug auf unterschiedliche Umweltbedingungen. Die Mutanten waren im Wachstum bei 37°C verzögert und reagierten sensitiver auf oxidativen Stress. Zudem konnte ein Defekt in der Kapselbildung der Zellen festgestellt werden. Die Kapseln gelten im Wildtyp in vielerlei Hinsicht als ein Schutzmechanismus des Pilzes während der Infektion des Wirtes. Die Kapseln der *gcn5*-Mutanten waren kleiner als die des Wildtyps und zeigten eine reduzierte Oberflächen-Bindung. Des Weiteren waren die Mutanten avirulent gegenüber Mäusen. Zusätzlich zeigten sie eine veränderte Expression jener Gene, die im Wildtyp in die Stressantwort des Pilzes involviert sind. Gcn5 spielt also eine kritische Rolle in der Adaption von *Cryptococcus neoformans* an seinen Wirt. Dies lässt sich vermutlich auf die Unfähigkeit der Deletionsmutanten zur Acetylierung bestimmter Histone zurückführen, was wiederum zu einer unzureichenden Rekrutierung von Transkriptionskomplexen führt, die für die Stress-responsive Genexpression wichtig sind.

In *Candida albicans* konnte Set1 als eine Histon-Methyltransferase identifiziert werden, die bevorzugt Lysin-Rest 4 an Histon 3 methyliert (Raman *et al.*, 2006). Deletionsmutanten des Gens zeigten in verschiedenen Agarmedien ein hyperfilamentöses Wachstum und eine reduzierte negative Ladung der Zell-Oberflächen. Auch konnte eine reduzierte Anhaftung der Mutanten an Epithel-Zell-Linien beobachtet werden. Mit den Null-Mutanten infizierte Mäuse überlebten durchschnittlich bis zu 30 Tage länger als die mit dem Wildtyp infizierten. Zusätzlich zu den morphologischen Charakteristika reguliert Set1 vermutlich mehrere Prozesse, die in ihrer Gesamtheit für die Pathogenität und die Ausbildung der Candidose verantwortlich sind.

Die mögliche Rolle von *PFPI* als transkriptioneller Regulator

Eine andere putative Funktion für *PFPI* ist eine Rolle als transkriptioneller Aktivator innerhalb essentieller konservierter Signalwege. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür stellt dabei der bereits zuvor erwähnte Transkriptionsfaktor Efg1 aus *Candida albicans* dar. Dieser ist in die Regulation der Hyphenmorphogenese involviert. *EFG1*-Deletionsmutanten sind noch in der Lage, Pseudohyphen, jedoch keine echten Hyphen mehr auszubilden, während eine Überexpression des Gens zu verstärktem filamentösem Wachstum in Pseudohyphen-Form führt (Lo *et al.*, 1997; Stoldt *et al.*, 1997). Nachfolgende Studien ergaben, dass die Aktivität von Efg1 sowohl über eine konservierte MAP-Kinase-Kaskade als auch über einen cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA)-Signalweg reguliert wird (Lo *et al.*, 1997; Sonneborn *et al.*, 2000; Bockmühl *et al.*, 2001). Efg1-Mutanten, denen die potentielle PKA-Phosphorylierungsstelle fehlte, waren nicht mehr in der Lage, zu filamentösem Wachstum zu wechseln (Bockmühl & Ernst, 2001). Efg1 scheint demnach ein direktes Zielprotein der beiden Proteinkinasen Tpk1 und Tpk2 zu sein. Über Änderung seines Phosphorylierungsstatus wird Efg1 aktiviert und kann so in die Morphogenese des Pilzes eingreifen: entweder über die Initiierung Hyphen-spezifischer Gene oder durch Repression des Hefe-Entwicklungsprogramms (Tebarth *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu dieser positiven Regulation ist für das Protein Nrg1 aus *C. albicans* eine negative Funktion in Bezug auf die Morphogenese nachgewiesen worden (Munir *et al.*, 2001). Nrg1 enthält eine C2H2-Zink-Finger-Domäne und ist verwandt mit Nrg1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Inaktivierung des Gens ruft filamentöses, invasives Wachstum des Pilzes hervor, eine Derepression Hyphen-spezifischer Gene, erhöhte Stress-Sensitivität sowie reduzierte Virulenz (Munir *et al.*, 2001). Eine negative Regulation der Hyphen-Entwicklung ist auch schon für das Protein Tup1 in *C. albicans* nachgewiesen worden. Deletionsmutanten des Gens riefen *nrg1*-ähnliche Phänotypen hervor. Zudem scheint Tup1 unabhängig von den MAPK- und cAMP/PKA-Signalwegen zu fungieren (Braun & Johnson, 1997, 2000). Für Nrg1 wird deshalb eine Funktion als Interaktor von Tup1 diskutiert. In einem Modell von Munir *et al.* (2001) rekrutiert Nrg1 dabei vermutlich Tup1 an die Promotoren spezifischer Gene, die in Hyphen-Entwicklung, Stress-Antwort oder Virulenz involviert sind, und reprimiert damit deren Transkription.

Im Maispathogen *Ustilago maydis* konnte der Transkriptionsfaktor Ust1 als Mitglied der APSES-Familie mit bHLH-Motiv identifiziert werden (García-Pedrajas *et al.*, 2010). Deletionsmutanten zeichneten sich durch ausschließlich filamentöses Wachstum, fehlende Paarung, Gallenproduktion sowie Bildung sexueller Teliosporen *in planta* aus. Da Dimorphismus und sexuelle Fortpflanzung essentielle Prozesse im Lebenszyklus des Pilzes darstellen, sind *ust1*-Mutanten zudem in ihrer Virulenz stark eingeschränkt. Um die regulatorische Funktion von Ust1 besser zu verstehen, wurden die Expressionsprofile des während filamentösen Wachstums herabregulierten Gens UM00205 sowie des

Teliosporen-spezifischen Gens *spl1* untersucht. Dabei konnte für Ust1 eine negative regulatorische Rolle auf transkriptioneller Ebene in Bezug auf beide Gene nachgewiesen werden. Ob jedoch Ust1 selbst, ähnlich Efg1 aus *Candida albicans*, ausschließlich über cAMP-Signalwege reguliert wird, bleibt bislang unklar (García-Pedrajas *et al.*, 2010).

Im Erreger der Grauschimmelfäule, *Botrytis cinerea*, konnte der C2H2-Zink-Finger-Transkriptionsfaktor Crz1 als essentiell für Wachstum, Entwicklung und Virulenz des Pilzes identifiziert werden (Schumacher *et al.*, 2008). Deletionsmutanten wuchsen nicht auf Minimalmedium und zeigten ein reduziertes Wachstum in Medien mit darin enthaltenen Pflanzenextrakten. Die Hyphen waren dünner und verzweigter als beim Wildtyp. Zudem zeigten die Mutanten reduzierte Konidien-Produktion und waren unfähig, Sklerotien auszubilden. Des Weiteren waren Zellwand- und Membran-Integrität betroffen sowie die Fähigkeit pilzlicher Hyphen, die pflanzliche Oberfläche zu penetrieren. Da in den Deletionsmutanten zusätzlich die Expression bestimmter Calcineurin-abhängiger Gene verändert war, wird eine Funktion von Crz1 als regulatorisches Protein des Calcium/Calmodulin-abhängigen Calcineurin-Signalweges angenommen. Crz1 wird dabei vermutlich von der Calcium-abhängigen Calcineurin-Phosphatase im Zytoplasma dephosphoryliert, was in dessen Translokation in den Zellkern und damit verbundener transkriptioneller Aktivierung bestimmter Gene resultiert. Für dieses Modell spricht, dass die Lokalisierung eines Gfp-Crz1-Fusionsproteins in den Zellkern nur in Abhängigkeit von erhöhten Calcium-Konzentrationen in der Zelle nachzuweisen ist und dass dieser Vorgang durch bestimmte Calcineurin-Inhibitoren blockiert wird (Schumacher *et al.*, 2008).

Ein Homologes zu Crz1 konnte auch in *Aspergillus fumigatus* nachgewiesen werden (Cramer Jr. *et al.*, 2008). CrzA beinhaltet ebenfalls ein C2H2-Zink-Finger-Motiv und fungiert als transkriptioneller Regulator. Deletionsmutanten von CrzA zeigen Defekte in der Konidien-Keimung, dem polarisierten Hyphen-Wachstum, der Zellwand-Struktur durch reduzierte β -1,3-Glukan-Level und der asexuellen Entwicklung. Zudem sind sie avirulent in Mäusen. Aufgrund des vergleichbaren Phänotyps von *crzA* zur Calcineurin A-Deletionsmutante (*cnaA*) wird auch für CrzA eine Rolle als Effektor-Protein des Calcineurin-Signalweges angenommen (Cramer Jr. *et al.*, 2008).

Ein anderer transkriptioneller Regulator in *Aspergillus fumigatus* ist LaeA. Das Protein fungiert als Regulator mehrerer Gencluster des Sekundärmetabolismus in *Aspergilli* und ist konserviert in filamentösen Pilzen (Keller *et al.*, 2006). Deletionsmutanten des Gens zeigten eine reduzierte Konidiophoren- bzw. Konidien-Produktion *ex planta*, eingeschränktes Wachstum und einen Verlust der Gliotoxin-Produktion. Zudem konnte eine erhöhte Suszeptibilität der Konidien gegenüber Makrophagen-Phagozytose und eine reduzierte Fähigkeit zum Abtöten von Neutrophilen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde wird LaeA als globaler Regulator diskutiert, der, selbst aktiviert durch einen Proteinkinase-A-Signalweg (Jahn *et al.*, 2000), verschiedene Eigenschaften des Pilzes reguliert, die ihrerseits für eine volle Virulenz essentiell sind (Bok *et al.*, 2005).

Die Ausbildung spezieller Hyphenstrukturen der Deletionsmutanten

Die $\Delta PFPI$ -Mutanten bildeten während ihres *ex-planta*-Wachstums nach 10 bis 14 d blasige, runde und dickwandige Strukturen an den Hyphen aus. Diese waren häufig interkalar, jedoch auch an den Hyphenspitzen zu beobachten. Im Wildtyp sowie in den Komplementationsmutanten waren diese Strukturen nicht nachzuweisen, so dass ihr Auftreten mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die *PFPI*-Deletion zurückzuführen war.

Aus zeitlichen Gründen konnten während dieser Arbeit diesbezüglich jedoch keine näheren Untersuchungen durchgeführt werden. Die Daten beruhen nur auf mikroskopischen Beobachtungen. Deshalb können keine eindeutigen Aussagen über Charakteristik sowie Bedeutung der Strukturen gemacht werden.

Die Strukturen könnten zum einen als einfache Hyphenschwellungen angesehen werden, in diesem Fall als morphologische Ausprägung der *PFPI*-Deletion. Durch Mutationen veränderte Hyphen-Phänotypen sind bereits in unterschiedlichen Pilzen beschrieben worden.

Vom Basidiomyceten *Coprinus cinereus* ist eine Temperatur-sensitive Mutante bekannt (TU25), die bei 37°C ihr Wachstum einstellt und zudem eine ausgeprägte Schwellung der Hyphenspitzen zeigt (Maida *et al.*, 1997). Da beide Eigenschaften gemeinsam vererbt werden, sind sie vermutlich auf ein einziges Gen zurückzuführen, das als *hyt1* (*hyphal tip*) bezeichnet wird. Beide Defekte können zudem durch osmotisch wirksame Substanzen im Medium (NaCl, Saccharose) supprimiert werden, was für eine Funktion des *hyt1*-Genproduktes im Aufbau der Zellwand spricht. Dies konnte jedoch nicht bewiesen werden, da keine Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwand-Polysaccharide zwischen Wildtyp und TU25 nachzuweisen waren. Dem *hyt1*-Genprodukt wird deshalb eine noch nicht näher bekannte Funktion in der Zellwand-Synthese oder im Aufbau des Aktin-Zytoskeletts zugesprochen (Maida *et al.*, 1997).

Schwellungen wurden auch an Hyphen von morphologischen Mutanten des Pilzes *Aspergillus nidulans* beobachtet (Harris *et al.*, 1999). Die Gene *SEPA*, *HYP A*, *PODB*, *PODC* und *PODD* sind für die Etablierung und Aufrechterhaltung der Hyphen-Polarität verantwortlich. *PODB* wird dabei für den Aufbau des Zytoskeletts gebraucht. Eine Mutation des Gens bewirkt apikale und subapikale Schwellungen an den Hyphen. Dies ist auf eine veränderte Zellwand-Deposition zurückzuführen, der eine defekte Organisation des Zytoskeletts zugrunde liegt (Harris *et al.*, 1999).

Eine Mutation des Gens *phsB4* ebenfalls aus *A. nidulans* zeigt erhöhte Sensitivität gegenüber sauren pH-Werten und bewirkt ballonartige Hyphenschwellungen auf Festmedium (Cuadros *et al.*, 2001). Dieser Phänotyp kann nur durch Erhöhung des pH-Wertes über 6,5 aufgehoben werden. Ähnliche Hyphen-Schwellungen konnten zuvor auch bei *Aspergillus*-Mutanten des Gens *chsD*, das für eine Chitin-Synthase kodiert, beobachtet werden. Transfektion der *phsB4*-Mutanten mit *chsD*-Cosmiden führt zur Komplementation des Phänotyps. Für *phsB4* wird deshalb eine Rolle in der Biogenese

bzw. Aufrechterhaltung der Zellwand-Integrität angenommen, was auch die Sensitivität der Mutanten gegenüber niedrigen pH-Werten erklären könnte (Cuadros *et al.*, 2001).

Der Pilz *Aspergillus oryzae* wird in der Industrie häufig zur Herstellung homologer und heterologer Enzyme genutzt. Bei der mikroskopischen Untersuchung eines Isolats zur Herstellung großer Mengen einer Lipase im Fed-Batch-Verfahren konnten Schwellungen der Hyphen-Spitzen beobachtet werden (Haack *et al.*, 2006). Da die morphologische Veränderung zeitlich mit der induzierten, gesteigerten Lipaseproduktion einhergeht, wird diese als Ursache der Schwellungen angesehen. In *Aspergillus niger* konnte zudem die Bindung einer heterologen Lipase an die Zellmembran nachgewiesen werden (Prathumpai *et al.*, 2004). Wenn man einen ähnlichen Vorgang für die Lipase aus *Aspergillus oryzae* annimmt, könnte dies ein Grund für die Hyphenschwellungen sein (Haack *et al.*, 2006).

Die aufgeführten Beispiele zeigen, dass morphologische Veränderungen an den Hyphen von Pilzmutanten durchaus keine Seltenheit darstellen. Meist sind die beobachteten Schwellungen auf Defekte in der Zellwandzusammensetzung, der Organisation des Zytoskeletts oder der Zellmembran zurückzuführen. Eine direkte Funktion von für *PFPI* in diesem Kontext konnte nicht nachgewiesen werden. Aufgrund seiner potentiellen regulatorischen Funktion kann eine Deletion des Gens durchaus auch indirekte Auswirkungen auf die Morphologie des Pilzes haben. Dafür spricht beispielsweise auch das langsame Wachstum der Mutanten.

Alternativ zu Hyphenschwellungen lässt sich eine optische Ähnlichkeit der blasenartigen Strukturen der Δ *PFPI*-Mutanten mit sogenannten Chlamydosporen nicht leugnen. Diese meist runden, dickwandigen großen Zellen sind in einer Reihe pilzlicher Organismen nachgewiesen worden wie zum Beispiel *Candida albicans* und *Candida dubliniensis*, *Fusarium solani* und *Fusarium oxysporum* und *Cryptococcus neoformans*. In *Rhynchosporium commune* sind sie bislang nur nach Gramin-Behandlung beschrieben worden (Kirsten *et al.*, 2011). *Candida albicans* und *Candida dubliniensis* sind dafür bekannt, diese Sporenart als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen wie niedrige Sauerstoffkonzentrationen, wenig Licht, tiefe Temperaturen und mangelndes Nährstoffangebot auszubilden. Deshalb werden sie oft als Überdauerungsformen angesehen (Jansons & Nickerson, 1970). Die beiden genannten *Candida*-Arten sind die einzigen ihrer Gattung, die Chlamydosporen ausbilden können, und werden zudem anhand dieser Fähigkeit unterschieden. Nur *Candida dubliniensis* bildet Chlamydosporen auf einem bestimmten Medium aus, das als Staib-Agar bezeichnet wird. *Candida albicans* ist dazu nicht in der Lage (Staib & Morschhäuser, 2006).

Neuere Studien ergaben, dass die Ausbildung von Chlamydosporen einer spezifischen Regulierung unterliegt. Dabei spielt die transkriptionelle Kontrolle bestimmter Gene und Signalwege eine Rolle (Whiteway & Bachewich, 2007). Bezieht man diese Überlegungen auf die Δ *PFPI*-Mutanten, so löst die Deletion des Gens hier die Ausbildung der

Chlamydosporen-artigen Strukturen aus. *PFPI* wäre nach dieser Interpretation ein Repressor der Chlamydosporen-Bildung in *Rhynchosporium commune*.

Ein solcher Repressor ist in den beiden *Candida*-Arten bekannt. Um deren unterschiedliche Fähigkeit, Chlamydosporen auszubilden, zu analysieren, wurde eine Bibliothek genomischer *C. albicans*-Sequenzen in *C. dubliniensis* integriert. Unter den erhaltenen Transformanten wurde nach solchen gesucht, die keine Chlamydosporen auf Staib-Agar mehr ausbildeten. Dabei konnte der transkriptionelle Regulator *Nrg1* als Schlüsselprotein zur negativen Kontrolle der Chlamydosporen-Bildung identifiziert werden. Eine erhöhte Expression von *NRG1* in *Candida albicans* führt demnach zu einer Blockade der Chlamydosporen-Bildung auf Staib-Agar. Eine *nrg1*-Deletionsmutante in *C. albicans* produzierte im Gegensatz dazu Chlamydosporen auf diesem Medium genau wie *C. dubliniensis*. Das Expressionsniveau von *NRG1* wird in *C. dubliniensis* also spezifisch herunterreguliert. Eine Überexpression von *CdNRG1* resultierte in einer Supprimierung der Chlamydosporen-Produktion (Staib & Morschhäuser, 2005).

Im Ascomyceten *Aspergillus nidulans* sind ähnliche Strukturen als sogenannte Hülle-Zellen bekannt. Sie entstehen als erster Schritt der sexuellen Differenzierung des Pilzes. Hülle-Zellen sind dickwandige, globuläre Zellen. Sie sind über einen kurzen Stiel mit dem vegetativen Myzel verbunden und bilden einen dichten Rasen. Ihre Funktion ist jedoch weithin unbekannt. Es wird vermutet, dass sie die nachfolgende Fruchtkörperbildung durch Versorgung mit Nährstoffen unterstützen. Jedoch stehen experimentelle Belege für diese Hypothese aus. Nach ca. 3 d entwickeln sich Primordien. Diese sind Vorstufen der als Kleistothezien bekannten Fruchtkörper. In diesen findet die Kernfusion und anschließende Meiose statt, woraufhin schließlich die sexuellen Ascosporen gebildet werden (Scherer, 2001; Sohn & Yoon, 2002).

Der Übergang von der asexuellen zur sexuellen Entwicklung unterliegt einer spezifischen Regulation, in die mehrere Signalwege und Transkriptionsfaktoren involviert sind. Dabei wurde das Zn(II)₂Cys₆-Protein *RosA* als negativer Regulator der sexuellen Entwicklung in *Aspergillus nidulans* identifiziert (Vienken *et al.*, 2005). *ROSA*-Deletionsmutanten zeigten eine vermehrte Kleistothezien-Bildung unter Glukose-Mangel und hoher Osmolarität sowie die ungewöhnliche Produktion von Hülle-Zellen in Flüssigkultur. Zudem waren in den Deletionsmutanten erhöhte Transkriptmengen der sexuellen Regulatorproteine *NsdD*, *VeA* und *StuA* vorhanden. Überexpression von *RosA* führte zu verzögertem Hyphenwachstum und durch die massive Produktion von Lufthyphen zu einem *fluffy*-Phänotyp. Aufgrund dieser Ergebnisse wird *RosA* als Repressor der sexuellen Entwicklung in *Aspergillus nidulans* unter bestimmten Umweltbedingungen diskutiert (Vienken *et al.*, 2005).

Die Möglichkeit einer Funktion in der negativen Regulierung bestimmter Entwicklungsvorgänge für *PFPI* ist also durchaus denkbar. Weitere Untersuchungen zur Chlamydosporen-Bildung im Wildtyp unter Gramin-Behandlung werden im Moment durchgeführt. Dagegen spricht allerdings, dass bei *Rhynchosporium commune* bisher

keine sexuelle Entwicklung nachgewiesen wurde. Deshalb bleibt diese Möglichkeit der Interpretation bislang hypothetisch.

4.5 Mögliche Erklärungen für das Verhalten der Komplementationsmutanten

Um den pleiotropen Phänotyp der $\Delta PFPI$ -Mutanten auf die Deletion dieses Gens zurückführen zu können, wurden diese mit der Wildtyp-Sequenz komplementiert. Allerdings ließ sich nur eine Eigenschaft der Deletionsmutanten komplementieren: die Ausbildung Chlamydosporen-ähnlicher Strukturen *ex planta*. Alle anderen Eigenschaften wie das verlangsamte Wachstum, die reduzierte Konidienproduktion und die eingeschränkte Virulenz konnten nicht komplementiert werden. Interessanterweise ist eine reduzierte Virulenz auch schon bei der Komplementation der REMI-Mutante LB20₅₇ beobachtet worden. Hintergrund-Mutationen in der REMI-Mutante konnten jedoch nicht ausgeschlossen werden, weshalb eine gerichtete Deletion des *PFPI*-Gens notwendig war. Die erneute „unvollständige“ Komplementation weist jedoch darauf hin, dass es sich sehr wohl um einen Effekt bezüglich der vorhergehenden Mutation des *PFPI*-Gens handelt. Weshalb die Komplementation der Deletionsmutanten erfolglos blieb, ist bislang unklar, da das Gen nachweislich in allen untersuchten Komplementationsmutanten exprimiert wurde (s. 3.6.2.2). Dies konnte auch nach Komplementation der REMI-Mutante nachgewiesen werden.

Eine mögliche Begründung für das Verhalten der Komplementationsmutanten ist, dass es sich hierbei um das Resultat eines sogenannten Dosiseffektes handeln könnte. Das *PFPI*-Genprodukt liegt aufgrund der vermutlich multiplen Integration seiner Gensequenz in einer vom Wildtyp-Niveau abweichenden Menge vor. Dies stört möglicherweise genau wie die Deletion die Interaktion von Pfp1 mit anderen regulatorischen Proteinen. Dieser Aspekt soll im Folgenden näher erläutert werden.

Ein Dosiseffekt ergibt sich, wenn eine Änderung der Gendosis, z.B. durch Stilllegung eines Allels, eine mehr oder weniger proportionale Änderung der phänotypischen Ausprägung des Gens bewirkt (Stern, 1929; Muller *et al.*, 1931). Reicht das verbliebene Allel im diploiden Organismus für eine normale Funktion des Gens nicht mehr aus, so spricht man von Haploinsuffizienz. Andererseits bezeichnet man die gleichbleibende Expression eines Gens trotz veränderter Kopienzahl als Dosiskompensation (Birchler *et al.*, 2005). Das bekannteste Beispiel hierfür ist die Inaktivierung eines X-Chromosoms im weiblichen Organismus, was zu einer gleichstarken Expression der Gene dieses Chromosoms in beiden Geschlechtern führt (Muller, 1932, 1950; Stern, 1929, 1960).

Neuere Studien haben ergeben, dass besonders die Gendosis von Proteinen mit regulatorischer Funktion im Organismus entscheidend ist. Mit anderen Worten: regulatorische Proteine agieren meist Dosis-abhängig (Birchler & Veitia, 2010). Sie fungieren häufig als Teil makromolekularer Proteinkomplexe, die epigenetische Mechanismen steuern. Des Weiteren können sie als transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren mit anderen regulatorischen Proteinen interagieren und so auf die Transkription von Strukturgenen einwirken. Auf diese Weise sind sie oft an der Steuerung von wichtigen Signalwegen beteiligt und damit Teil einer regulatorischen Hierarchie (Birchler *et al.*, 2001, 2005). Aufgrund dieser komplexen Interaktionen ist es von großer Wichtigkeit, dass alle interagierenden Partner in einer speziellen Dosis vorhanden sind. Ein stöchiometrisches Ungleichgewicht kann zu einer Störung der Funktionalität makromolekularer Komplexe und damit zur Ausbildung Dosis-abhängiger Phänotypen führen (Birchler *et al.*, 2001; Veitia 2002, 2003). Diese können entweder von einer reduzierten Expression (d.h. Haploinsuffizienz) oder von einer Überexpression (z.B. Trisomie) der entsprechenden Proteinuntereinheit herrühren. Man spricht in diesem Zusammenhang von der Gendosis-Balance-Hypothese (Veitia *et al.*, 2008).

Einige wichtige Beweise für die Richtigkeit dieser Hypothese konnten durch Arbeiten an Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) erbracht werden. Eine Untersuchung von Genen, deren Mutanten im homozygoten Zustand letal und im heterozygoten Zustand für eine verminderte Fitness des Organismus verantwortlich waren, zeigte, dass 88% der Gene Proteine kodierten, die mit anderen Proteinen interagieren. Eine zweite Untersuchung zeigte, dass 47% der Proteine, deren Überexpression im Wildtyp letal war, ebenfalls in Protein-Komplexen agieren. Zudem konnte eine signifikante Ko-Expression der Gene zweier interagierender Protein-Partner festgestellt werden. Gen-Paare, die für interagierende Proteinuntereinheiten kodieren, wiesen häufig die gleiche Anzahl an Paralogen im Hefe-Genom auf (um Ungleichgewichte zu vermeiden), während Gene, die zu größeren Familien gehören, selten für komplexbildende Proteine kodieren (Papp *et al.*, 2003).

Ein anderer interessanter Aspekt ergibt sich aus der Überlegung, dass das Ergebnis einer Unter- oder Überexpression einer Proteinkomplexuntereinheit von dem Grad der Verbindung abhängt, welche das Protein zu den anderen Untereinheiten des Komplexes hat (Veitia, 2002, 2003; Bray & Lay, 1997). Dient zum Beispiel eine Untereinheit als „Brücke“ (z.B. Untereinheit B im Trimer A-B-A) zwischen den Partnerproteinen (d.h. hier A), kann seine Überexpression zu einer drastischen Reduktion in der Menge des Gesamtkomplexes führen. Denn der Überschuss von B kann hierbei eine Bildung inaktiver Subkomplexe (z.B. A-B und B-A) auslösen und die des Trimers verhindern (Papp *et al.*, 2003; Veitia *et al.*, 2008). „Brückenproteine“ reagieren also Dosis-sensitiver als andere Komplex-Partner.

Ein Beispiel hierfür ist ebenfalls in Hefe zu finden. Die Gene *GPA1*, *STE4* und *STE18* kodieren für die G-Protein-Untereinheiten α , β und γ (Dietzel & Kurjan, 1987; Nakafuku *et al.*, 1987; Jahng *et al.*, 1988; Whiteway *et al.*, 1989). Als Heterotrimer bindet die α -

Untereinheit GDP und der Komplex ist inaktiv. Nach Rezeptor-Stimulierung wird GDP durch GTP ausgetauscht und der Komplex dissoziiert in α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Diese sind dann in der Lage, mit verschiedenen intrazellulären Effektoren zu interagieren. Durch Hydrolyse des GTP zu GDP wird die α -Untereinheit wieder inaktiviert, bindet erneut die $\beta\gamma$ -Untereinheiten und bildet die inaktive $\alpha\beta\gamma$ -Konfiguration (Neer & Clapham, 1998). In Hefe fungieren die Proteine in der Transduktion der Pheromon-Signale zur Paarung (*mating*) haploider Zellen. Um diesen Vorgang genauer zu charakterisieren bzw. die Interaktion der Proteine besser zu verstehen, wurden diese überexprimiert. Dabei zeigte die Überexpression des „Brückenproteins“ *STE4* allein, zusammen mit *STE18*, nicht aber *STE18* allein eine Pheromon-Signal-Antwort. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass ein Überschuss an Ste4 (β) zu einer Generierung freier Ste4-Ste18-Heterodimere ($\beta\gamma$) und dies zu einer Signaltransduktion ohne vorherige Signalperzeption führt (Cole *et al.*, 1990).

Bezieht man die obigen Überlegungen auf *PFPI*, so ist es durchaus denkbar, dass die Komplementation des Gens in der Mutante einen Dosiseffekt auslöst. Dafür spricht, dass es sich bei *PFPI* mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Gen mit regulatorischer Funktion handelt. Da *Rhynchosporium commune* ein haploider Organismus ist, kann die vermutlich multiple Integration der endogenen *PFPI*-Sequenz das Gleichgewicht der Gendosis empfindlich stören. Das Gen wird in allen untersuchten Komplementationsmutanten in unterschiedlicher Menge exprimiert (s. 3.6.2.2). Ein weiterer Befund, der für diese Hypothese spricht, ist die gegenüber dem Wildtyp erhöhte *PFPI*-Transkriptmenge in der REMI-Mutante LB20₅₇ (s. 3.1.2). Möglicherweise ist der Phänotyp dieser Mutante also ebenfalls auf einen Dosiseffekt zurückzuführen. Dafür könnte auch die unvollständige Komplementation der REMI-Mutante sprechen, die zudem auch eine erhöhte *PFPI*-Expression zeigt (s. 3.1.2).

Ein vergleichbares Beispiel ist für das *PAX6*-Gen bekannt. Heterozygote Mutationen dieses Gens lösen im Menschen eine Unterentwicklung (Hypoplasie) der Iris des Auges (Aniridie) aus. In Mäusen ist dieser Phänotyp als *Small eye* bekannt. Homozygote Mäuse bilden weder Augen noch Nasengruben aus und zeigen Abnormalitäten des Gehirns. In einer Arbeit zur detaillierteren Untersuchung der *PAX6*-Gendosis wurden mittels YAC-Konstrukten transgene Mäuse generiert, die den humanen *PAX6*-Lokus trugen. Transgene Mäuse vor heterozygotem *Small eye*-Hintergrund entwickelten sich dabei normal, während multiple Kopien des *PAX6*-Genlokus vor Wildtyp-Hintergrund (Überexpression) spezifische Abnormalitäten der Augen hervorriefen. Insgesamt konnten fünf verschiedene Augen-Phänotypen in Mäusen mit veränderter *PAX6*-Expression in Verbindung gebracht werden. Dabei werden die Phänotypen sowohl durch zu niedrige als auch durch zu hohe *PAX6*-Expression hervorgerufen, was die hohe Sensitivität der Augen-Entwicklung auf die vorhandene *PAX6*-Gendosis unterstreicht (Schedl *et al.*, 1996).

Dieses Beispiel zeigt, dass eine veränderte *PFPI*-Gendosis sowohl in der einen als auch in der anderen Richtung (Über- und Unterexpression) einen Phänotyp hervorrufen könnte.

Allerdings konnten in der $\Delta PFPI$ -Komplementation keine Chlamydosporen-ähnlichen Strukturen mehr *ex planta* nachgewiesen werden (s. 3.6.2.4.2). Dies ist somit das einzige Merkmal, das komplementiert werden konnte. Betrachtet man *PFPI* als negativen Regulator der Chlamydosporen-Bildung im Wildtyp, so ist diese Funktion möglicherweise an einen anderen Signalweg als die anderen funktionellen Eigenschaften des Proteins gekoppelt. Dies scheint zudem Dosis-unabhängig zu sein. Mit diesen Überlegungen lässt sich eine duale Funktion von *PFPI* im Lebenszyklus von *Rhynchosporium commune* vermuten, nämlich sowohl als positiver als auch als negativer Regulator bestimmter Entwicklungsprozesse des Pilzes.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass eine Rolle von Pfp1 als Pathogenitätsfaktor nicht nachgewiesen werden konnte. Vielmehr handelt es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Protein mit regulatorischen Funktionen innerhalb der Entwicklung von *R. commune*. Diese Hypothese wird durch vier wichtige Ergebnisse gestützt: (1) die konstitutive Expression des *PFPI*-Gens während des gesamten pilzlichen Entwicklungszyklus *in planta* und *ex planta*, (2) die Pfp1-Proteinstruktur, die eine putative Kernlokalisierungssequenz sowie eine konservierte Epc-N-Domäne mit PHD-Zink-Finger-Motiven aufweist, (3) der pleiotrope Phänotyp der *PFPI*-Deletionsmutanten, der sich in reduzierter Virulenz, verlangsamtem Wachstum und eingeschränkter Konidiosporenproduktion sowie Chlamydosporen-Bildung *ex planta* äußert, (4) die Komplementation der Deletionsmutanten, die nicht zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führte (vgl. Abb. 4.1).

Pfp1 erfüllt während des gesamten Entwicklungszyklus von *R. commune* anscheinend eine wichtige Funktion. Dafür spricht die *in planta* und *ex planta* nachgewiesene konstitutive Expression des *PFPI*-Gens. Dies wurde auch schon für andere essentielle regulatorische Gene nachgewiesen (s. 4.2).

Pfp1-Homologe wie Jade-1, Rno und Nto1p sind funktionell sehr divers. Ihnen gemeinsam ist lediglich, dass sie aufgrund ihrer Struktur (PHD-Domänen) meist spezifische regulatorische Funktionen in Signalwegen übernehmen, die durch Interaktionen mit anderen Proteinen vermittelt werden. Zudem werden für diese Proteine Funktionen in epigenetischen Mechanismen, speziell Chromatin-Remodelling und Histon-Modifikationen diskutiert. Für Jade-1 konnte eine Interaktion mit dem HBO1-Histonacetyltransferase-Komplex nachgewiesen werden (Foy *et al.*, 2008). Seine damit verbundenen Funktionen in der Regulierung der Chromatin-Acetylierung sowie der Zellzyklus-Kontrolle sind auch für Pfp1 möglich. Ein Hinweis darauf ist auch das verlangsamte Wachstum der *PFPI*-Deletionsmutanten, was für eine gestörte Regulierung des Zellzyklus (z.B. in der DNA-Replikation) sprechen könnte (s. 4.3).

In der Literatur existieren zahlreiche Beispiele regulatorischer Gene aus filamentösen Pilzen, deren Deletionsmutanten ähnliche Phänotypen wie die $\Delta PFPI$ -Mutanten zeigen (s. 4.4). Dabei kann das C2H2-Zink-Finger-Protein Nrg1 aus *C. albicans* besonders

hervorgehoben werden. Die *NRG1*-Deletionsmutante zeigt morphologische Veränderungen wie invasives, filamentöses Wachstum auf Normal-Medium und Chlamydosporen-Bildung auf Staib-Agar sowie erhöhte Stress-Sensitivität und reduzierte Virulenz. Nrg1 wird als negativer Regulator diskutiert, der durch Interaktion mit anderen Proteinen (d.h. Tup1) die Expression von Genen reprimiert, die in die oben genannten Prozesse involviert sind (Munir *et al.*, 2001; Staib & Morschhäuser, 2005). Reduzierte Virulenz und die Ausbildung Chlamydosporen-ähnlicher Strukturen konnten bei den *PFPI*-Deletionsmutanten ebenfalls nachgewiesen werden, so dass für Pfp1 durchaus eine ähnliche Rolle als transkriptioneller Regulator denkbar ist.

Die Komplementation der *PFPI*-Deletionsmutanten führte nicht zu einer Wiedererlangung des Wildtyp-Phänotyps. Die Re-Transformanden waren weiterhin in ihrem Wachstum sowie der Sporulationsrate eingeschränkt und zeigten eine reduzierte Virulenz *in planta*. Nur die Ausbildung der Chlamydosporen-ähnlichen Strukturen *ex planta* konnte nicht mehr beobachtet werden. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für eine regulatorische Funktion des Pfp1-Proteins, die zudem vermutlich Dosis-abhängig ist (s. 4.5). Die Rückführung der *PFPI*-Gensequenz in die Deletionsmutanten führte dabei durch deren möglicherweise multiple Integration zu veränderten Mengen des Pfp1-Proteins. Dadurch ergibt sich vermutlich ein Dosis-Effekt, welcher die Funktion des Proteins (oder eines putativen Protein-Komplexes) entscheidend beeinflusst.

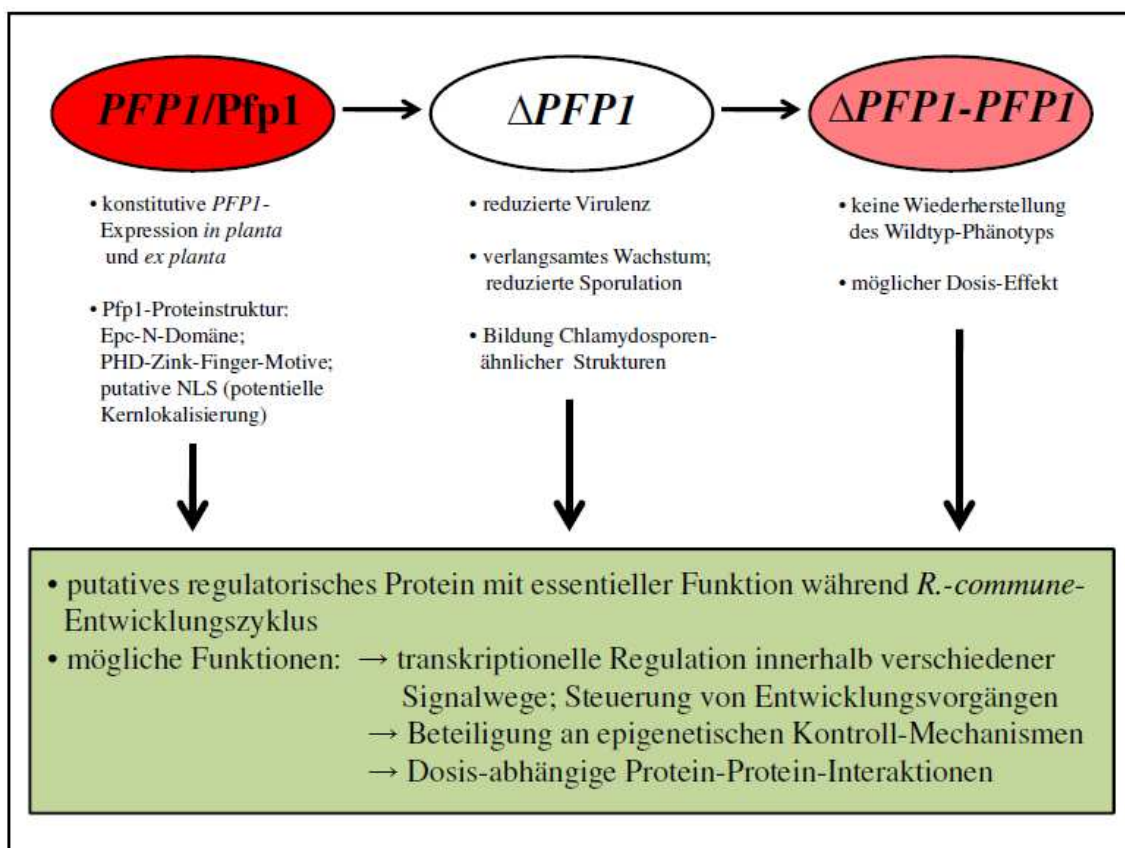


Abbildung 4.1: Zusammenfassung der Ergebnisse sowie der daraus resultierenden möglichen Funktionen für Pfp1.

4.6 Ausblick

Aufgrund der in dieser Arbeit erhaltenen Resultate und Erkenntnisse können Rückschlüsse auf die möglichen zellulären Funktionen von *PFPI* gezogen werden. Die Daten zeigen, dass *PFPI* vermutlich an wichtigen Entwicklungsprozessen im Lebenszyklus von *Rhynchosporium commune* beteiligt ist, die in ihrer Gesamtheit Auswirkungen auf das Wachstum, die Sporulation und schlussendlich auch auf die Virulenz des Pilzes haben. Diese Befunde können allerdings nur einen Einblick in das „Was“ geben, nicht jedoch in das „Wie“ jener Vorgänge. Mit anderen Worten: Eine genaue molekulare Funktion von *PFPI* konnte während dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Dieser Umstand ist nicht zuletzt der sich während dieser Dissertationsarbeit vollzogenen thematischen Verbreiterung geschuldet. Während zu Beginn noch an einem putativen Pathogenitätsfaktor gearbeitet wurde, führten die nachfolgenden Ergebnisse zu neuen umfangreichen Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr analysiert werden konnten. Einige dieser Ansatzpunkte sollen in diesem Teilkapitel Erwähnung finden.

Ein erster Schritt wären mikroskopische Analysen der *ex planta*-angezogenen REMI-Mutante im Hinblick auf die bei den Deletionsmutanten beobachteten Chlamydosporen-ähnlichen Strukturen. Da diese Hyphenformationen erst zum Ende dieser Arbeit entdeckt wurden, konnte eine Analyse der REMI-Mutante nicht mehr durchgeführt werden. Zudem ist die Mutante aufgrund fehlenden *in planta*-Wachstums in ihrer Fitness stark eingeschränkt und zeigt auch zunehmend reduziertes Wachstum *ex planta*, was eine Anzucht zusätzlich erschwert. Sollte dies jedoch gelingen, sind die erhaltenen Ergebnisse sehr wichtig. Denn wenn die bis dato gezogenen Rückschlüsse über die Dosis-unabhängige Regulation der Ausbildung dieser Strukturen zutreffen, sollten diese in der REMI-Mutante aufgrund der erhöhten *PFPI*-Expression nicht zu beobachten sein. Ein weiterer Ansatzpunkt diesbezüglich wäre die Generierung und Analyse einer *PFPI*-Überexpressionsmutante. Sollte die Hypothese der Dosis-abhängigen regulatorischen Funktion von *PFPI* zutreffen, so müssten die Überexpressionsmutanten einen ähnlichen Phänotyp wie die Deletionsmutanten zeigen, ausgenommen die Ausbildung Chlamydosporen-ähnlicher Strukturen.

Zudem wären weiterführende Nachweise zur Identität der Strukturen in den Deletionsmutanten von großer Wichtigkeit. Dazu sind Untersuchungen wie z.B. die Analysen der Strukturen unter anderen Wachstumsbedingungen (niedrige O₂-Konzentrationen, Licht, variable Temperaturen und Nährböden), Keimungsversuche, Färbemethoden und auch elektronenmikroskopische Untersuchungen von Bedeutung.

Ein nächster wichtiger Aspekt ist weiterhin die Lokalisierung des Proteins in der Zelle. Die zu diesem Punkt erhaltenen Resultate waren nicht eindeutig. Aufgrund seiner

Proteinstruktur sowie der *in silico* nachgewiesenen Kernlokalisierungssignale ist eine intrazelluläre Lokalisierung von Pfp1 im Zellkern trotzdem denkbar. Neue eGfp-Fusionskonstrukte sollten jedoch mit der gesamten *PFPI*-Gensequenz generiert werden, die alle putativen Kernlokalisierungssignale enthält. Zudem sollte die Auswirkung eines zellulären Stimulus (z.B. Ca^{2+}) diesbezüglich getestet werden.

Da für Pfp1 auch eine Rolle als Transkriptionsfaktor möglich erscheint, wären Genexpressionsanalysen (*Microarray*) der Deletionsmutanten im Vergleich mit dem Wildtyp interessant. Differenziell exprimierte Gene können Rückschlüsse auf Signalwege und andere zelluläre Prozesse geben, in die *PFPI* potentiell involviert ist.

Des Weiteren sind Interaktionsstudien von großer Wichtigkeit. Da eine Funktion von Pfp1 während epigenetischer Mechanismen angenommen wird, sind sowohl Protein-DNA- als auch Protein-Protein-Interaktionen möglich. Um die Bindung von Pfp1 an DNA nachzuweisen, könnten beispielsweise elektrophoretische Mobilitätsassays durchgeführt werden. Zum Nachweis der durch Proteinbindung geschützten DNA-Bereiche könnten *DNase-Footprint*-Techniken zum Einsatz kommen.

Die Suche nach Interaktionspartnern auf Proteinebene wäre im einfachsten Ansatz mit Hefe-Zwei-Hybrid- oder Ko-Immünpräzipitationstechniken durchzuführen. Identifizierte Partner könnten dann unter Anwendung der Förster-Resonanzenergietransfer-Technik (FRET) oder der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (*bimolecular fluorescence complementation*, BiFC) verifiziert werden.

Ein letzter interessanter Punkt wäre die nähere Untersuchung des durch die EST-Daten identifizierten Gens *PFPI2*. Dessen Produkt hat aufgrund seiner Domänenstruktur höchstwahrscheinlich ebenfalls eine regulatorische Rolle. Da es jedoch zu Pfp1 nur geringe Sequenzähnlichkeit zeigt, muss seine potentielle Funktion abgegrenzt dazu betrachtet werden. Eine erste Möglichkeit, um Hinweise auf die Relevanz des Genprodukts in *R. commune* zu erhalten, wäre beispielsweise die Generierung einer *PFPI2*-Deletionsmutante sowie einer *PFPI-PFPI2*-Doppeldelentionsmutante und deren nachfolgende phänotypische Charakterisierung.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Dissertation war die Charakterisierung eines putativen Pathogenitätsfaktors des Pilzes *Rhynchosporium commune*. Das Gen *PFPI* (für *putative function in pathogenicity*) konnte in Vorarbeiten in einem REMI-Mutagenese-Ansatz zum Nachweis von Pathogenitätsgenen identifiziert werden. Die zugehörige REMI-Mutante LB20₅₇ war apathogen auf suszeptiblen Gerstensorten. Molekulare Analysen der Mutante ergaben eine Integration des für die Mutagenese verwendeten Plasmids pAN7-1 in den Promotorbereich des Gens *PFPI* 274 bp vor dem Starttripllett eines 2613 bp langen offenen Leserahmens.

Zu Beginn dieser Arbeit konnte die doppelte Insertion der Plasmid-DNA in „Kopf-Schwanz-Richtung“ durch DNA-Hybridisierung verifiziert werden. Expressionsanalysen (Real-Time-PCR) des Gens in der REMI-Mutante zeigten eine gegenüber dem Wildtyp (UK7) erhöhte Transkriptmenge, was auf eine gestörte Regulation der *PFPI*-Expression hinwies.

Durch 5'- bzw. 3'-RACE-PCR konnte ein 1017 bp langes zweites Exon der kodierenden Sequenz des Gens nachgewiesen werden. Real-Time-PCR-Analysen des Wildtyps UK7 *in planta* ergaben eine niedrige, aber konstitutive Expression des Gens, die durch nachfolgende Untersuchungen von Fusionskonstrukten der *PFPI*-Sequenz mit *EGFP ex planta* bestätigt werden konnte.

In-silico-Analysen der Proteinstruktur ergaben den Nachweis einer sogenannten Epc-N-Domäne mit PZP-Motiv, welches eine PHD-Zink-Finger-Domäne, einen *Zn-knuckle* sowie ein PHD-ähnliches Motiv umfasst. Da homologe Proteine in anderen Organismen zumeist in Protein-Protein-Interaktionen und an der Beteiligung epigenetischer Mechanismen eine Rolle spielen, wurde auch für *PFPI* eine solche Funktion angenommen.

Durch die Optimierung der Methode zur Protoplasten-Transfektion sowie die Etablierung eines Fusions-PCR-Systems zur schnellen und effektiven Generierung von Deletionskonstrukten für *Rhynchosporium commune* konnten drei Deletionsmutanten für *PFPI* generiert werden. Deren Analyse ergab einen pleiotropen Phänotyp. Alle Mutanten zeigten ein stark verlangsamtes Wachstum *ex planta* und *in planta* sowie eine reduzierte Sporulation. Untersuchungen zur Keimung ergaben jedoch keine signifikante Reduktion der Keimungsrate, so dass das eingeschränkte Wachstum auf eine Verlangsamung der Zellteilung zurückgeführt wurde. Des Weiteren wurde für die Mutanten eine reduzierte Virulenz nachgewiesen. Mikroskopische Analysen *in planta* zeigten nur vereinzelte Penetrationsereignisse. Die Mikroskopie der Deletionsmutanten *ex planta* ergab den Nachweis globulärer Hyphenstrukturen, die im Wildtyp nicht beobachtet werden konnten. Ihre Identität wurde nicht näher bestimmt. Jedoch wurde eine Ähnlichkeit zu sogenannten

Chlamydosporen festgestellt, die in anderen Pilzarten als Überdauerungsformen ausgebildet werden.

Die nachfolgende Komplementation der Deletionsmutanten mit der *PFPI*-Sequenz erbrachte keine vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Die Komplementationsmutanten zeigten weiterhin eingeschränktes Wachstum, Sporulation sowie reduzierte Virulenz. Nur die blasenartigen Hyphenstrukturen waren nicht mehr nachzuweisen. Die bereits zuvor für *PFPI* diskutierte Rolle innerhalb von Protein-Protein-Interaktionen führte zu der Annahme, dass es sich hierbei um einen Dosis-Effekt handeln könnte. Die in den Komplementationsmutanten erhöhte Expression des *PFPI*-Gens führt dabei vermutlich zu einer Störung des empfindlichen Gleichgewichts zwischen miteinander interagierenden Protein-Untereinheiten und damit zur funktionellen Störungen spezifischer Proteinkomplexe. Der Phänotyp der Komplementationsmutanten kann damit als indirekter Hinweis auf eine potentielle regulatorische Funktion von *PFPI* betrachtet werden.

Eine Funktion von *PFPI* als Pathogenitätsfaktor konnte während dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Aufgrund seiner Proteinstruktur, den pleiotropen Phänotypen der Deletionsmutanten sowie der „unvollständigen“ Komplementation muss davon ausgegangen werden, dass es sich bei *PFPI* um ein Gen handelt, dessen Produkt regulatorische Funktionen im Entwicklungszyklus von *Rhynchosporium commune* besitzt. Dabei kann es sowohl an epigenetischen Kontrollmechanismen beteiligt sein als auch als Transkriptionsfaktor innerhalb bestimmter Signalwege fungieren. Für eine genauere funktionelle Charakterisierung von Pfp1 sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

6. Literaturverzeichnis

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. – *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402

ALTSCHUL, S.F., WOOTTON, J.C., GERTZ, E.M., AGARWALA, R., MORGULIS, A., SCHÄFFER, A.A., YU, Y. (2005): Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. – *FEBS Journal* 272: 5101-5109

ANDREWS, J., SMITH, M., MERAKOVSKY, J., COULSON, M., HANNAN, F. AND KELLY, L.E. (1996): The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. – *Genetics* 143: 1699-1711

ANON (1962): *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) Davis. – *Distribution Maps of Plant Diseases* no. 383, ed. 2

ARAVIND, L. AND LANDSMAN, D. (1998): AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. – *Nucleic Acids Research* 26: 4413-4421

ARGANDONA, V.H., ZUNIGA, G.E., CONCUERA, L.J. (1987): Distribution of gramine and hydroxamic acid in barley and wheat leaves. – *Phytochemistry* 26: 1917-1918

ARIE, T, KANEKO, I, YOSHIDA, T., NOGUCHI, M., NORMURA, Y. AND YAMAGUCHI, I. (2000): Mating-type genes from asexual phytopathogenic ascomycetes *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata*. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1330-1339

ARNOLD, G.W. AND HILL, J.L. (1972): Chemical factors affecting selection of food plants by ruminants. – *Phytochemical Ecology, Academic Press New York*: 71-101 (Editor: Harborne, J.B.)

ARONESCU, A. (1934): *Diplocarpon rosae*: from spore germination to haustorium formation. – *Memoirs of the Torrey Botanical Club* 61 : 291-329

AURIOL, P., STROBEL, G., BELTRAN, J.P. AND GRAY, G. (1978): Rhynchosporoside, a host-selective toxin produced by *Rhynchosporium secalis*, the causal agent of scald disease of barley. – *Proceedings of the National Academy of Science USA* 75: 4339-4343

AUSTIN, R.J. AND BIGGIN, M.D. (1995): A domain of the *even-skipped* protein represses transcription by preventing TFIID binding to a promoter: repression by cooperative blocking. – *Molecular and Cellular Biology* 15: 4683-4693

AVVAKUMOV, N. AND COTE, J. (2007): The MYST family of histone acetyltransferases and their intimate links to cancer. – *Oncogene* 26: 5395-5407

AYESU-OFFEI, E.N. AND CLARE, B.G. (1970): Processes in the infection of barley leaves by *Rhynchosporium secalis*. – *Australian Journal of Biological Sciences* 23: 299-307.

AYESU-OFFEI, E.N. AND CLARE, B.G. (1971): Symptoms of scald disease induced by toxic metabolites of *Rhynchosporium secalis*. - *Australian Journal of Biological Sciences* 24: 169-174

BAGG, A., AND NEILANDS, J.B. (1987): Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. – *Microbiological Reviews* 51: 509-518

BAHNS, M. AND GARRETT, R. (1980): Demonstration of de novo synthesis of *Neurospora crassa* nitrate reductase during induction. – *Journal of Biological Chemistry* 255: 690-693

BAIDYAROY, D., BROSCH, G., AHN, J.-H., GRAESSLE, S., WEGENER, S., TONUARI, N.J., CABALLERO, O., LOIDL, P. AND WALTON, J. (2001): A gene related to yeast *HOS2* histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus. – *The Plant Cell* 13: 1609-1624

BALASUBRAMANIAN, B., LOWRY, C.V. AND ZITOMER, R.S. (1993): The repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. – *Molecular and Cellular Biology* 13: 6071-6078

BANNAI, H., TAMADA, Y., MARUYAMA, O., NAKAI, K., MIYANO, S. (2001): Views: Fundamental Building Blocks in the Process of Knowledge Discovery. - *Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference*: 233-238

BANNAI, H., TAMADA, Y., MARUYAMA, O., NAKAI, K., AND MIYANO, S. (2002): Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. - *Bioinformatics* 18: 298-305

BARTELS, F. (1928): Studien über *Marssonina graminicola*. - *Forschungen auf den Gebiet der Pflanzenkrankheiten und Immunität Pflanzenreich, Berlin* 5: 73

- BENT, A.F. AND MACKEY, D. (2007):** Elicitors, effectors, and *R* Genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. - *Annual Reviews in Phytopathology* 45: 399-436
- BELTRAN, J.P. AND STROBEL, C.A. (1978):** Rhynchosporoside binding proteins of barley. - *FEBS Letters* 96: 34-36
- BENSEN, E.S., FILLER, S.G. AND BERMAN, J. (2002):** A forkhead transcription factor is important for true hyphal as well as yeast morphogenesis in *Candida albicans*. - *Eukaryotic Cell* 1: 787-798
- BHAKDI, S., HAHN, H. AND MIKSITS, K. (2009):** Pathogenität und Virulenz. - *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie; Springer Verlag*: 11-12
- BIENZ, M. (2006):** The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. - *Trends in Biochemical Sciences* 31: 35-40
- BIRCHLER, J.A., BHADRA, U., PAL BHADRA, M. AND AUGER, D.L. (2001):** Dosage dependent gene regulation in multicellular eukaryotes: implications for dosage compensation, aneuploid syndromes and quantitative traits. - *Developmental Biology* 234: 275-288
- BIRCHLER, J.A., RIDDLE, N.C., AUGER, D.L. AND VEITIA, R.A. (2005):** Dosage balance in gene regulation: biological implications. - *Trends in Genetics* 21: 219-226
- BIRCHLER, J.A. AND VEITIA, R.A. (2010):** The gene balance hypothesis: implications for gene regulation, quantitative traits and evolution. - *New Phytologist* 186: 54-62
- BISSONNETTE, L. AND ROY, P.H. (1992):** Characterization of Ino of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. - *Journal of Bacteriology* 174: 1248-1257
- BLUM, T., BRIESEMEISTER, S. AND KOHLBACHER, O. (2009):** MultiLoc2: integrating phylogeny and gene ontology terms improves subcellular protein localization prediction. - *BMC Bioinformatics* 10: 274
- BOCKMÜHL, D.P. AND ERNST, J.F. (2001):** A potential phosphorylation site for an A-type kinase in the Efg1 regulator protein contributes to hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. - *Genetics* 157: 1523-1530

BOCKMÜHL, D.P., KRISHNAMURTHY, S., GERADS, M., SONNEBORN, A. AND ERNST, J.F. (2001): Distinct and redundant roles of the two protein kinase A isoforms Tpk1 and Tpk2 in morphogenesis and growth of *Candida albicans*. – *Molecular Microbiology* 42: 1243-1257

BOEDIJN, K.B. (1956): Trypan blue as a stain for fungi. – *Stain Technology* 31: 115-116

BOK, J.W., BALAJEE, S.A., MARR, K.A., ANDES, D., NIELSEN, K.F., FRISVAD, J.C. AND KELLER, N.P. (2005): LaeA, a regulator of morphogenetic fungal virulence factors. – *Eukaryotic Cell* 4: 1574-1582

BOLIVAR, S., RODRIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETLACH, M.C., HEYNEKER, H.L., BOYER H.W., CROSA, J.H. AND FALKOW, S. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles II. A multipurpose cloning system. – *Gene* 2: 95-113

BORROW, J., STANTON, V.P., ANDRESEN, J.M., BECHER, R., BEHM, F.G., CHAGANTI, R.S., CIVIN, C.I., DISTECHE, C., DUBE, I., FRISCHAUF, A.M., HORSEMAN, D., MITELMAN, F., VOLINIA, S., WHATMORE, A.E. AND HOUSMAN, D.E. (1996): The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. - *Nature Genetics* 14: 33-41

BÖRNER, H. (1971): Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz – *Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart*

BRAKHAGE, A.A., ANDRIANOPOULOS, A., KATO, M., STEIDL, S., DAVIS, M.A., TSUKAGOSHI, N. AND HYNES, M.J. (1999): HAP-like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. – *Fungal Genetics and Biology* 27: 243-252

BRAKHAGE, A.A., AL-ABDALLAH, Q., TÜNCHEK, A., SPRÖTE, P. (2005): Evolution of β -lactam biosynthesis genes and recruitment of *trans*-acting factors. – *Phytochemistry* 66: 1200-1210

BRAMEIER, M., KRINGS, A., MACCALLUM, R.M., (2007): NucPred - Predicting nuclear localization of proteins. – *Bioinformatics* 23: 1159-1160

BRANDT, K., EULER, H., HELLSTROM, H. AND LOFGREN, N. (1935): Gramin und zwei Begleiter desselben in Laubblättern von Gerstensorten. – *Zeitschrift für Physiologische Chemie* 235: 37-42

- BRAUN, B.R. AND JOHNSON, A.D. (1997):** Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor TUP1. – *Science* 277: 105-109
- BRAUN, B.R. AND JOHNSON, A.D. (2000):** *TUP1*, *CPH1* and *EFG1* make independent contributions to filamentation in *Candida albicans*. – *Genetics* 155: 57-67
- BRAUN, B.R., HEAD, W.S., WANG, M.X. AND JOHNSON, A.D. (2000):** Identification and characterization of TUP1-related genes in *Candida albicans*. – *Genetics* 156: 31-44
- BRAUN, B.R., KADOSH, D. AND JOHNSON, A.D. (2001):** *NRG1*, a repressor of filamentous growth in *C. albicans*, is down-regulated during filament induction. – *The EMBO Journal* 20: 4753-4761
- BRAY, D. AND LAY, S. (1997):** Computer-based analysis of the binding steps in protein complex formation. – *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 13493-13498
- BRIESEMEISTER, S., BLUM, T., BRADY, S., LAM, Y., KOHLBACHER, O., AND SHATKAY, H. (2009):** SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins. – *Journal of Proteome Research* 8: 5363–5366
- BROGNA, S. AND ASHBURNER, M. (1997):** The Adh-related gene of *Drosophila melanogaster* is expressed as a functional dicistronic messenger RNA: multigenic transcription in higher organisms. – *The EMBO Journal* 16: 2023-2031
- BROSCH, G., LOIDL, P. AND GRAESSLE, S. (2008):** Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. – *FEMS Microbiology Reviews* 32: 409-439
- BUDDE, A.D., AND LEONG, S.A. (1989):** Characterization of siderophores from *Ustilago maydis*. – *Mycopathologia* 108: 125-133
- BUNDOCK, P., DEN DULK-RAS, A., BEIJERSBERGEN, A. AND HOOYKAAS, P.J.J. (1995):** Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. – *The EMBO Journal* 14: 3206-3214
- CALDWELL, R.M. (1937):** *Rhynchosporium* scald of barley, rye and other grasses. – *Journal of Agricultural Research* 55: 175-198

CARROL, S.B. AND SCOTT, M.P. (1986): Zygotically active genes that affect the spatial expression of the *fushi tarazu* segmentation gene during early *Drosophila* embryogenesis. – *Cell* 5: 1611-1621

CATOIRA, R., GALERA, C., DE BILLY, F., PENMETS, V., JOURNET, E.-P., MAILLET, F., ROSENBERG, C., COOK, D., GOUGH, C. AND DÉNARIÉ, J. (2000): Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. – *The Plant Cell* 12: 1647-1665

CHAN, C.Y., KIECHLE, M., MANIVASAKAM, P. AND SCHIESTL, R.H. (2007): Ionizing radiation and restriction enzymes induce microhomology-mediated illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Nucleic Acids Research* 35: 5051-5059

CHANG, Y.C. AND TIMBERLAKE, W.E. (1992): Identification of *Aspergillus brla* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. – *Genetics* 133: 29-38

CHITALIA, V.C., FOY, R.L., BACHSCHMID, M.M., ZENG, L., PANCHENKO, M.V., ZHOU, M.I., BHARTI, A., SELDIN, D.C., LECKER, S.H., DOMINGUEZ, I. AND COHEN, H.T. (2008): Jade-1 inhibits Wnt signalling by ubiquitylating β -catenin and mediates Wnt pathway inhibition by pVHL. – *Nature Cell Biology* 10: 1208-1216

CHUNG, K.-R., DAUB, M.E. AND EHRENSHAFT, M. (2003): Expression of the cercosporin toxin resistance gene (*CRG1*) as a dicistronic mRNA in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae*. – *Current Genetics* 43: 415-424

CHYI, Y.-S., JORGENSEN, R.A., GOLDSTEIN, D., TANKSLEY, S.D. AND LOAIZA-FIGUEROA, F. (1986): Location and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. – *Molecular Genetics and Genomics* 204: 64-69

CLAROS, M.G., VINCENS, P. (1996): Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. – *European Journal of Biochemistry* 241: 779-786

CLASSEN, M. AND HARLOW, E. (2002): The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. – *Nature Reviews in Cancer* 2: 910-917

COKOL, M., NAIR, R., AND ROST, B. (2000): Finding nuclear localization signals. – *EMBO Reports* 1: 411-415

- COLE, G.M., STONE, S.D.E. AND REED, S.I. (1990):** Stoichiometry of G protein subunits affects the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone signal transduction pathway. – *Molecular and Cellular Biology* 10: 510-517
- COOPER, R.M. (1984):** Cell-wall degrading enzymes. - *Plant Disease: Infection Damage and Loss, Oxford: Blackwell*: 13-17 (Wood, R.K.S. and Jellis, G.J., eds)
- CRAMER, JR. R.A., PERFECT, B.Z., PINCHAI, N., PARK, S., PERLIN, D.S., ASFAW, Y.G., HEITMAN, J., PERFECT, J.R. AND STEINBACH, W.J. (2008):** Calcineurin target CrzA regulates conidial germination, hyphal growth and pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*. – *Eukaryotic Cell* 7: 1085-1097
- CUADROS, S.C., BRITO, A.G., MARTINEZ-ROSSI, N.M. AND ROSSI, A. (2001):** The *Aspergillus nidulans* *phsB4* mutation alters colonial growth and development of the mould at acidic pH. – *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17: 779-782
- CUBERO, B. AND SCAZZOCCHIO, C. (1994):** Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. – *The EMBO Journal* 13: 407-415
- DAVIE, J.R. AND MURPHY, L.C. (1990):** Level of ubiquitinated histone H2B in chromatin is coupled to ongoing transcription. – *Biochemistry* 29: 4752-4757
- DAVIS, R.H. (1986):** Compartmental and regulatory mechanisms in the arginine pathways of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae*. – *Microbiological Reviews* 50: 280-313
- DECKERT, J., RODRIGUEZ TORRES, A.M., HWANG, S.-M., KASTANIOTIS, A.J. AND ZITOMER, R.S. (1998):** The anatomy of a hypoxic operator in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Genetics* 150: 1429-1441
- DECKERT, J., KHALAF, R.A., HWANG, S.-M. AND ZITOMER, R.S. (1999):** Characterization of the DNA binding and bending HMG domain of the yeast hypoxic repressor Rox1. – *Nucleic Acids Research* 27: 3518-3526
- DE GROOT, M.J.A., BUNDOCK, P., HOOYKAAS, P.J.J. AND BEIJERSBERGEN, A.G.M. (1998):** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. – *Nature Biotechnology* 16: 839-842

DELCUVE, G.P., RASTEGAR, M. AND DAVIE, J.R. (2009): Epigenetic control. – *Journal of Cellular Physiology* 219: 243-250

DE WIT, P.J.G.M. (2007): How plants recognize pathogens and defend themselves. - *Cellular and Molecular Life Sciences* 64: 2726-2732

DE WIT, P.J.G.M., MEHRABI, R., VAN DEN BURG, H. AND STERGIOLPOULOS, I. (2009): Fungal effector proteins: past, present and future. – *Molecular Plant Pathology* 10: 735-747

DIETZEL, C. AND KURJAN, J. (1987): Pheromonal regulation and sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* SST2 gene: a model for desensitization to pheromone. – *Molecular and Cellular Biology* 7: 4169-4177

DIVON, H.H. AND FLUHR, R. (2007): Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. – *FEMS Microbiology Letters* 266: 65-74

DOBOSY, J.R. AND SELKER, E.U. (2001): Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. – *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 721-727

DONG, X., TSUDA, L., ZAVITZ, K.H., LIN, M. AND LI, S. (1999): ebi regulates epidermal growth factor receptor signaling pathways in *Drosophila*. – *Genes & Development* 13: 954-965

DRAGANESCU, A. AND TULLIUS, T.D. (1998): The DNA binding specificity of engrailed homeodomain. – *Journal of Molecular Biology* 276: 529-536

DROCOURT, D., CALMELS, T., REYNES, J-P., BARON, M. AND TIRABY, G. (1990): Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus ble* gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. – *Nucleic Acids Research* 18: 4009

DU, W. AND POGORILER, J. (2006): Retinoblastoma family genes. – *Oncogene* 25: 5190-5200

DURBIN, R., EDDY S., KROGH, A., MITCHISON G. (1998): Biological sequence analysis. - *Cambridge University Press, Cambridge*

DYCK, P.L. AND SCHALLER, C.W. (1961A): Inheritance of resistance in barley to several physiologic races of the scald fungus. - *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 3: 153-164

- DYCK, P.L. AND SCHALLER, C.W. (1961B):** Association of two genes for scald resistance with a specific barley chromosome. - *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 3: 165-169
- DYSON, N. (1998):** The regulation of E2F by pRB-family proteins. - *Genes & Development* 12: 2245-2262
- EBEL, J. (1984):** Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. - *Annual Reviews in Phytopathology* 24: 235-264
- EISENMANN, D.M. (2005):** Wnt signaling. - *WormBook*: 1-17
- EMANUELSSON, O., NIELSEN, H., BRUNAK, S. AND HEIJNE, G. v. (2000):** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. - *Journal of Molecular Biology* 300: 1005-1016
- ESPESO, E.A., TILBURN, J., SÁNCHEZ-PULIDO, L., BROWN, C.V., VALENCIA, A., ARST JR., H.N. AND PENALVA, M.A. (1997):** Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. - *Journal of Molecular Biology* 274: 466-480
- FARRAR, J.F. (1984):** Plant disease: infection damage and loss - *Oxford: Blackwell* (Wood, R.K.S. and Jellis, G.J., eds)
- FAUST, B. (2000):** Untersuchungen zur Biosynthese von Urdamycin A und Herstellung neuer Naturstoffe mittels molekularbiologischer Methoden. - Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
(http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=963217038&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=963217038.pdf)
- FENG, B. HAAS, H. AND MARZLUF, G.A. (2000):** ASD4, a new GATA factor of *Neurospora crassa*, displays sequence-specific DNA binding and functions in ascus and ascospore development. - *Biochemistry* 39: 11065-11073
- FERNANDES, M., KELLER, N.P. AND ADAMS, T.H. (1998):** Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AfIR, a C₆ zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. - *Molecular Microbiology* 28: 1355-1365

FINN R.D., MISTRY J., SCHUSTER-BOCKLER B., GRIFFITHS-JONES S., HOLLICH V., LASSMANN T., MOXON S, MARSHALL M., KHANNA A., DURBIN R., EDDY S.R., SONNHAMMER E.L., BATEMAN A. (2006): Pfam: clans, web tools and services. - *Nucleic Acids Research* 34: D247-251

FLEMING, G.H., KRAMER, C.M., LE, T. AND SHILLITO, R.D. (1995): Effect of DNA fragment size on transformation frequencies in tobacco (*Nicotiana tabacum*) and maize (*Zea mays*). – *Plant Science* 110: 187-192

FLOR, H.H. (1955): Host-parasite interaction in flax rust - its genetics and other implications. - *Phytopathology* 45:680-685.

FLOR, H.H. (1971): Current status of the gene-for-gene concept. – *Annual Reviews in Phytopathology* 9: 275-296

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) – FAOSTAT, Statistik der FAO, 2009 – aufgerufen am 28.09.2010 – www.fao.org, <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>

FORGAN, A.H., KNOGGE, W. AND ANDERSON, P.A. (2007): Asexual genetic exchange in the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. – *Phytopathology* 97: 650-654

FOSTER, S.J. AND FITT, B.D.L. (2004): Isolation and characterization of the mating-type (*MAT*) locus from *Rhynchosporium secalis*. – *Current Genetics* 44: 277-286

FOY, R.L., SONG, I.Y., CHITALIA, V.C., COHEN, H.T., SAKSOUK, N., CAYROU, C., CYRUS, V., CÔTÉ, J. AND PANCHENKO, M.V. (2008): Role of Jade-1 in the HAT HBO1 complex. – *The Journal of Biological Chemistry* 283: 28817-28826

FREEMAN, M. (1996): Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. – *Cell* 87: 651-660

FREEMAN, M. (1998): Complexity of EGF receptor signalling revealed in *Drosophila*. – *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 407-411

FU, Y.H. AND MARZLUF, G.A. (1987): Molecular cloning and analysis of the regulation of nit-3, the structural gene for nitrate reductase in *Neurospora crassa*. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 8243-8247

FU, Y.-H., KNEESI, J.Y. AND MARZLUF, G.A. (1989): Isolation of *nit-4*, the minor nitrogen regulatory gene which mediates nitrate induction in *Neurospora crassa*. – *Journal of Bacteriology* 171: 4067-4070

GABA, A., WANG, Z., KRISHNAMOORTHY, T., HINNEBUSCH, A.G. AND SACHS, M.S. (2001): Physical evidence for distinct mechanisms of translational control by upstream open reading frames. – *The EMBO Journal* 20: 6453-6463

GABA, A., JACOBSON, A. AND SACHS, M.S. (2005): Ribosome occupancy of the yeast *CPA1* upstream open reading frame termination codon modulates nonsense-mediated mRNA decay. – *Molecular Cell* 20: 449-460

GAISSER, S. (1998): Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Avilamycin-Biosynthese und Resistenz in *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57. – Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

(http://www.pharmazie.uni-freiburg.de/biologie/bechthold/Dissertationen/Diss_Sibylle_Gaisser_Avilamycin-Biosynthese.pdf)

GARCÍA-PEDRAJAS, M., BAEZA-MONTAÑEZ, L. AND GOLD, S.E. (2010): Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation and pathogenic development by a transcription factor with highly conserved APSES domain. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 211-222

GARDINER, D.M. AND HOWLETT, B. (2004): Negative selection using thymidine kinase increases the efficiency of recovery of transformants with targeted genes in the filamentous fungus *Leptosphaeria maculans*. – *Current Genetics* 45: 249-255

GASTON, K. AND JAYARAMAN, P.-S. (2003): Transcriptional repression in eukaryotes: repressors and repression mechanisms. – *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 721-741

GEBALLE, A.P. AND SACHS, M.S. (2000): Translational control by upstream open reading frames (Chapter 18). – *Translational Control of Gene Expression* by Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. and Mathews, M.B.

GIRVITZ, T.L., OUMET, P.M. AND KAPOOR, M. (2000): Heat shock protein 80 of *Neurospora crassa*: sequence analysis of the gene and expression during the asexual phase. – *Canadian Journal of Microbiology* 46:981-991

GOODWIN, S.B. (2002): The barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis* is closely related to the discomycetes *Tapesia* and *Pyrenopeziza*. – *Mycological Research* 106: 645-654

GRANT, M. AND LAMB, C. (2006): Systemic immunity. – *Current Opinion in Plant Biology* 9: 414-420

GRANTINI, A. (1962): Osservazioni su *Spilocaea oleagina* (Cast.) Hung. 1. sulla localizzazione del micelio nelle foglie di olivo (Abstract). – *Phytopathologia Mediterranea* 4: 157-165

GREENBERG, J.T., GUO, A., KIESSIG, D.F. AND AUSUBEL, F.M. (1994): Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. – *Cell* 77: 551-563

GREENBERG, J.T. (1997): Programmed cell death in plant-pathogen interactions. – *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 525-545

GUARENTE, L., YOCUM, R.R. AND GIFFORD, P. (1982): A GAL10-CYCI hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. - *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79: 7410-7414

GUDA, C., FAHY, E. AND SUBRAMANIAM, S. (2004): MITOPRED: A genome-scale method for prediction of nuclear-encoded mitochondrial proteins. - *Bioinformatics* 20: 1785-1794

GUDA, C., GUDA, P., FAHY, E. AND SUBRAMANIAM, S. (2004): MITOPRED: A web server for the prediction of mitochondrial proteins. - *Nucleic Acids Research* 32: 372-374

HAACK, M.B., OLSSON, L., HANSEN, K. AND LANTZ, A.E. (2006): Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation. – *Applied Microbiology and Biotechnology* 70: 482-487

HAAS, H., ZADRA, I., STÖFFLER, G. AND ANGERMAYR, K. (1999): The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. – *The Journal of Biological Chemistry* 274: 4613-4619

HABGOOD, R.M. AND HAYES, J.D. (1971): The inheritance of resistance to *Rhynchosporium secalis* in barley. – *Heredity* 27: 25-37

HAHN, M., JÜNGLING, S., AND KNOGGE, W. (1993): Cultivar-specific elicitation of barley defense reactions by the phytotoxic peptide NIP1 from *Rhynchosporium secalis*. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 6: 745-754

HAJDUKIEWICZ, P., SVAB, Z. AND MALIGA, P. (1994): The small, versatile *pPZP* family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. – *Plant Molecular Biology* 25: 989-994

HANSON, A.D., TRAYNOR, P.L., DITZ, K.M. AND REICOSKY, D.A. (1981): Gramine in barley forage-effects of genotype and environment. – *Journal of Crop Science* 21: 726-730

HANSON, A.D., DITZ, K.M., SINGLETARY, G.W. AND LELAND, T.J. (1983): Gramine accumulation in leaves of barley grown under high-temperature stress. – *Plant Physiology* 71: 896-904

HARRIS, S.D., HOFMANN, A.F., TEDFORT, H.W. AND LEE, M.P. (1999): Identification and characterization of genes required for hyphal morphogenesis in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. – *Genetics* 151: 1015-1025

HEATH, M.C. (2000): Hypersensitive response-related death. – *Plant Molecular Biology* 44: 321-334

HEITEFUSS R. (1997): General principles of host-parasite interactions. - *Resistance of Crop Plants against Fungi; Fischer, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm*: 19-32 (Hartleb H., Heitefuss R., Hoppe H.-H. (eds))

HELMER-CITTERICH, C., ANCESCHI, M., BANNER, M.M., D.W. AND CESARENI, G. (1988): Control of ColE1 replication: low affinity specific binding of Rop (Rom) to RNAI and RNAII. - *The EMBO Journal* 7: 557-66

HIDALGO, A. (1996): The roles of *engrailed*. – *Trends in Genetics* 12: 1-4

HILLIG, I. (2005): Funktionale Charakterisierung der Glucosylceramid-Synthase aus Pflanzen und dem phytopathogenen Pilz *Ustilago maydis*. – Dissertation des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg
(<http://www.biologie.uni-hamburg.de/bzf/fb5a006/Hillig-Diss-2005.pdf>)

HIRSCH, J.A. AND AGGARWAL, A.K. (1995): Structure of the Even-skipped homeodomain complexed to AT-rich DNA: new perspectives on homeodomain specificity. – *The EMBO Journal* 14: 6280-6291

HNISZ, D., MAJER, O., FROHNER, I.E., KOMNENOVIC, V. AND KUCHLER, K. (2010): The Set3/Hos2 histone deacetylase complex attenuates cAMP/PKA signaling to regulate morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. – *PloS Pathogens* 6: e1000889

HOOD, H.M., NEAFSEY, D.E., GALAGAN, J. AND SACHS, M.S. (2009): Evolutionary roles of upstream open reading frames in mediating gene regulation in fungi. – *Annual Reviews in Microbiology* 63: 385-409

HOOPYKAAS, P.J.J., ROOBOL, C. AND SCHIPEROORT, R.A. (1979): Regulation of the transfer of Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. – *Journal of General Microbiology* 110: 99-109

HORTON, P., PARK, K.J., ODAYASHI, T., FUJITA, N., HARADA, H., ADAMS-COLLIER, C.J., NAKAI, K. (2007): WoLF PSORT: protein localization predictor. - *Nucleic Acids Research* 35: 585-587

HOSEMANS, D. AND BRANCHARD, M. (1985): Étude *in vitro* de la rhynchosporiose de l'orge: cycle de reproduction du parasite – histopathologie de l'hôte (Abstract). – *Phytopathologische Zeitschrift* 112: 127-142

HÖGLUND, A., DÖNNES, P., BLUM, T., ADOLPH, H. W., KOHLBACHER, O. (2006): MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. - *Bioinformatics* 22:1158-1165.

IDNURM, A. AND HOWLETT, B.J. (2001): Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. – *Molecular Plant Pathology* 2: 241-255

INFORMATION.MEDIEN.AGAR. E.V. (I.M.A. E.V., 2004): Pflanzen in der Landwirtschaft. – www.ima-agrar.de

INGHAM, P.W., BAKER, N.E. AND MARTINEZ-ARIAS, A. (1988): Regulation of segment polarity genes in the *Drosophila* blastoderm by *fushi tarazu* and *even-skipped*. – *Nature (London)* 331: 73-75

INGLE, R.A., CARSTENS, M. AND DENBY, K.J. (2006): PAMP recognition and the plant–pathogen arms race. – *Bioessays* 28: 880-889

IOANNOU, N. AND GROGAN, R.G. (1985): Formation and germination of Chlamydospores of *Phytophthora parasitica* under various oxygen and carbon dioxide tensions. – *Plant Disease* 69: 400-403

JACOB, F., JÄGER, E.J. AND OHMANN, E. (1994): Botanik – *Gustav Fischer Verlag, Jena*

JAHN, B., BOUKHALLUK, F., LOTZ, J., LANGFELDER, K., WANNER, G. AND BRALHAGE, A.A. (2000): Interaction of human phagocytes with pigmentless *Aspergillus* conidia. – *Infection and Immunity* 68: 3736-3739

JAHNG, K.-Y., FERGUSON, J. AND REED, S.I. (1988): Mutations in a gene encoding a subunit of a *Saccharomyces cerevisiae* G protein indicate a role in mating pheromone signaling. – *Molecular and Cellular Biology* 8: 2484-2493

JAMES, W.C., JENKINS, J.E. AND JEMMET, J.L. (1968): The relationship between leaf blotch caused by *Rhynchosporium secalis* and losses in grain yield of spring barley. – *Annals of Applied Biology* 62: 273-288

JANSENS, V.K. AND NICKERSONS, W.J. (1970): Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydospore of *Candida albicans*. – *Journal of Bacteriology* 104: 910-921

JAYNES, .B. AND O'FARREL, P.H. (1988): Activation and repression of transcription by homoeodomain-containing proteins that bind a common site. – *Nature* 336: 744-749

JAYNES, J.B. AND FUJIOKA, M. (2004): Drawing lines in the sand: *even-skipped* et al. and parasegment boundaries. – *Developmental Biology* 269: 609-622

JOHNSTON, M. (1987A): Genetic evidence that zinc is an essential co-factor in the DNA binding domain of GAL4 protein. – *Nature* 328: 353-355

JOHNSTON, M. (1987B): A model fungal gene regulatory mechanism: the *GAL* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Microbiological Reviews* 51: 458-476

JONES, P AND AYRES, P.G. (1972): The nutrition of the subcuticular mycelium of *Rhynchosporium secalis* (barley leaf blotch): permeability changes induced in the host. – *Physiological Plant Pathology* 2: 383-392

JONES, P AND AYRES, P.G. (1974): *Rhynchosporium* leaf blotch of barley studied during the subcuticular phase by electron microscopy. – *Physiological Plant Pathology* 4: 229-233

JONES, J.D.G. AND DANGL, J.L. (2006): The plant immune system. – *Nature Reviews* 444: 323-329

JØRGENSEN, H.J.L., DE NEERGAARD, E. AND SMEDEGAARD-PETERSEN, V. (1993): Histological examination of the interaction between *Rhynchosporium secalis* and susceptible and resistant cultivars of barley. – *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 345-458

KAGEYAMA, R. AND PASTAN, I. (1989): Molecular cloning and characterization of a human DNA binding factor that represses transcription. – *Cell* 59: 815-825

KAHMANN, R. AND BASSE, C. (1999): REMI (restriction enzyme mediated integration) and its impact on the isolation of pathogenicity genes in fungi attacking plants. – *European Journal of Plant Pathology* 105: 221–229

KAHMANN, R. AND BASSE, C. (2001): Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. – *Current Opinion in Microbiology* 4: 374-380

KAELIN JR., W.G. (2004): The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene and kidney cancer. – *Clinical Cancer Research* 10: 6290s-6295s

KANAMORI, Y., HAYAKAWA, Y., MATSUMOTO, H., YASUKOCHI, Y., SHIMURA, S., NAKAHARA, Y., KIUCHI, M. AND KAMIMURA, M. (2010): A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. – *The Journal of Biological Chemistry* 285: 36933-36944

KELLER, N., BOK, J., CHUNG, D., PERRIN, R.M. AND SHWAB, E.K. (2006): LaeA, a global regulator of *Aspergillus* toxins. – *Medical Mycology* 44: 583-585

KHAN, R., TAN, R., MARISCAL, A.G. AND STRANEY, D. (2003): A binuclear zinc transcription factor binds the host isoflavonoid-responsive element in a fungal cytochrome p450 gene responsible for detoxification. – *Molecular Microbiology* 49 (1): 117-130

KIM, W. AND KAELIN JR., W.G. (2003): The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer. – *Current Opinion in Genetics & Development* 13: 55-60

KIRSTEN, S., SIERSLEBEN, S. AND KNOGGE, W. (2011): A GFP-based assay to quantify the impact of effectors on the *ex planta* development of the slowly growing barley pathogen *Rhynchosporium commune*. – *Mycologia*, zur Publikation eingereicht

KNOGGE, W. (1996): Fungal infection of plants. – *The Plant Cell* 8: 1711-1722

KNOGGE, W. (1998): Plant-fungal interactions and plant disease. – *Subcellular Biochemistry, Plant-Microbe Interactions* 29: 215-251

KO, Y.-J., YU, Y.M., KIM, G.-B., LEE, G.-W., MAENG, P.J., KIM, S., FLOYD, A., HEITMAN, J. AND BAHN, Y.-S. (2009): Remodeling of global transcription patterns of *Cryptococcus neoformans* genes mediated by the stress-activated HOG-signaling pathways. – *Eukaryotic Cell* 8: 1197-1217

KOLATTUKUDY, P.E. (1985): Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. - *Annual Reviews in Phytopathology* 23: 223-250

KONCZ, C., MARTINI, N., MAYERHOFER, R., KONCZ-KALMAN, Z, KÖRBER, H., REDEL, G.P. AND SCHELL, J. (1989): High-frequency T-DNA-mediated gene tagging in plants. – *Proceedings of the National Academy of Science* 86: 8467-8471

KONDO, J.K. AND MCKAY, L.L. (1984): Plasmid transformation of *Streptococcus lactis* protoplasts: optimization and use in molecular cloning. – *Applied and Environmental Microbiology* 48: 252-259

KOSTERLITZ, F.W. (1943): The fermentation of galactose and galactose-1-PO. - *Biochemical Journal* 37: 322.

KOSUGI ,S., HASEBE, M., ENTANI, T., TAKAYAMA, S., TOMITA, M., AND YANAGAWA, H. (2008): Design of peptide inhibitors for the importin α/β nuclear import pathway by activity-based profiling. – *Chemistry and Biology* 15: 940-949

KOSUGI ,S., HASEBE, M., MATSUMURA, N., TAKASHIMA, H., MIYAMOTO-SATO, E., TOMITA, M., AND YANAGAWA, H. (2009): Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . – *The Journal of Biological Chemistry* 284: 478-485

KOSUGI ,S., HASEBE, M., TOMITA, M., AND YANAGAWA, H. (2009): Systematic identification of yeast cell cycle-dependent nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 10171-10176

KULMBURG, P., MATHIEU, M., DOWZER, C., KELLY, J. AND FELEBROK, B. (1993): Specific binding sites in the *alcR* and *alcA* promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. – *Molecular Microbiology* 7: 847-857

KUMAR, S., TAMURA, K. AND NEI, M. (1994): MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers – *Computer Applications in the Biosciences* 10: 189-191

KUWAYAMA, H., OBARA, S., MORIO, T., KATOH, M., URUSHIHARA, H. AND TANAKA, Y. (2002): PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA-ligase and plasmid vectors. – *Nucleic Acids Research* 30: e2

LACHNER, M. AND JENUWEIN, T. (2002): The many faces of histone lysine methylation. – *Current Opinion in Cell Biology* 14: 286-298

LACROUTE, F., PIÉRARD, A., GRENSON, M. AND WIAME, J.M. (1965): The biosynthesis of Carbamoylphosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Journal of General Microbiology* 40: 127-142

LAGAERT, S., BELIËN, T. AND VOLCKAERT, G. (2009): Plant cell walls: protecting the barrier from degradation by microbial enzymes. - *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1064-1073

LAI, E.C. (2004): Notch signaling: control of cell communication and cell fate. – *Development* 131: 965-973

LAZO, G.R., STEIN, P.A. AND LUDWIG, R.A. (1991): A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. – *Bio/Technology* 9: 963-967

LEE, K.K. AND WORKMAN, J.L. (2007): Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. – *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 8: 284-295

LEHNACKERS, H. AND KNOGGE, W. (1990): Cytological studies on the infection of barley cultivars with known resistance genotypes by *Rhynchosporium secalis*. – *Canadian Journal of Botany* 68: 1953-1961

LELOIR, L.F. (1951): The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. – *Archives of Biochemistry* 33: 186-190

LENG, P., CARTER, P.E. AND BROWN, A.J.P. (1998): The TATA-binding protein (TBP) from the human fungal pathogen *Candida albicans* can complement defects in human and yeast TBPs. – *Journal of Bacteriology* 180: 1771-1776

LEWIS, D.H. (1973): Concepts in fungal nutrition and the origin of biotrophy. – *Biological Reviews* 48: 261-278

LIMPENS, E., FRANKEN, C., SMIT, P., WILLEMSE, J., BISSELING, T. AND GEURTS, R. (2003): LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. – *Science* 302: 630-633

LIN-CHAO, S., CHEN, W.T. AND WONG, T.T. (1992): High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. – *Molecular Microbiology* 6: 3385–93

LIN, X. AND HEITMAN, J. (2005): Chlamyospore formation during hyphal growth in *Cryptococcus neoformans*. – *Eukaryotic Cell* 4: 1746-1754

LINDE, C.C., ZALA, M., CECCARELLI, S. AND MCDONALD, B.A. (2003): Further evidence for sexual reproduction in *Rhynchosporium secalis* based on distribution and frequency of mating-type alleles. – *Fungal Genetics and Biology* 40: 115-125

LO, H.J., KOHLER, J.R., DIDOMENICO, B., LOEBENBERG, D., CACCIAPUOTI, A. AND FINK, G.R. (1997): Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. – *Cell* 90: 939-949

LOIDL, P. (1994): Histone acetylation: facts and questions. – *Chromosoma* 103: 441-449

LU, G. AND MORIYAMA, E.N. (2004): Vector NTI, a balanced all-in-one analysis suite. – *Briefings in Bioinformatics* 5: 378-388

LU, Y., SU, C., MAO, X., PALARANIGA, P., LIU, H. AND CHEN, J. (2008): Efg1-mediated recruitment of NuA4 to promoters is required for hypha-specific Swi/Snf binding and activation in *Candida albicans*. – *Molecular Biology of the Cell* 19: 4260-4272

MACKI, W.W. (1929): Inheritance of resistance to barley scald (Abstract). – *Phytopathology* 19: 1141

MADSEN, E.B., MADSEN, L.H., RADUTOIU, S., OLBRYT, M., RAKWALSKA, M., SZCZYGLOWSKI, K., SATO, S., KANEKO, T., TABATA, S., SANDAL, N. AND STOUGAARD, J. (2003): A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. – *Nature* 425: 637-640

MAIDA, S., FUJII, M., SKRZY尼亚, C., PUKKILA, P.J. AND KAMADA, T. (1997): A temperature-sensitive mutation of *Coprinus cinerea*, *hyt1-1*, that causes swelling of hyphal tips. – *Current Genetics* 32: 231-236

MAIER, F.J. AND SCHÄFER, W. (1999): Mutagenesis via insertional—or restriction enzyme-mediated—integration (REMI) as a tool to tag pathogenicity related genes in plant pathogenic fungi. - *Biological Chemistry* 380: 855–864

MANN, R.S. (1994): *Engrailed*-mediated repression of *Ultrabithorax* is necessary for the parasegment 6 identity in *Drosophila*. – *Development* 120: 3205-3212

MAO, X., CAO, F., NIE, X., LIU, H. AND CHEN, J. (2006): The Swi/Snf chromatin remodeling complex is essential for hyphal development in *Candida albicans*. – *FEBS Letters* 580: 2615-2622

MARTINEZ-ARIAS, A. AND WHITE, R.A.H. (1988): *Ultrabithorax* and *engrailed* expression in *Drosophila* embryos mutant for segmentation genes of the pair-rule class. – *Development* 102: 325-338

MARZLUF, G.A. (1981): Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. - *Microbiological Reviews* 45: 437-461

MARZLUF, G.A. (1997): Genetic regulation of the nitrogen metabolism in the fungi. – *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 17-32

MATHIEU, M. AND FELENBOK, B. (1994): The *Aspergillus nidulans* CREA protein mediates glucose repression of the ethanol regulon at various levels through competition with the ALCR-specific transactivator. – *The EMBO Journal* 13: 4022-4027

MATHIEU, M., FILLINGER, S. AND FELENBOK, B. (2000): *In vivo* studies of upstream regulatory *cis*-acting elements of the *alcR* gene encoding the transactivator of the ethanol regulon in *Aspergillus nidulans*. – *Molecular Microbiology* 36: 123-131

- MATSUMOTO, K., TOH-E, A. AND OSHIMA, Y. (1978):** Genetic control of galactokinase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for constitutive expression of the positive regulatory gene *gal4*. – *Journal of Bacteriology* 134: 446-457
- MATTERN, I.E., PUNT, P.J., VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. (1988):** A vector of *Aspergillus* transformation conferring phleomycin resistance. – *Fungal Genetics Newsletters* 35: 25
- MAZARS, C., AURIOL, P. AND RAFENOMANANJARA, D. (1983A):** Rhynchosporosides binding by barley proteins. – *Phytopathologische Zeitschrift* 107: 1-8
- MENDGEN, K., HAHN, M. AND DEISING H. (1996):** Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. – *Annual Reviews in Phytopathology* 34: 367-386
- MENDGEN, K. AND HAHN, M. (2002):** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. – *Trends in Plant Science* 7: 352-356
- MIHLAN, M., HOMANN, V., LIU, T.-W.D. AND TUDZYNSKI, B. (2003):** AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberelin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. – *Molecular Microbiology* 47: 975-991
- MILLER, M.J., ROZE, L.V., TRAIL, F. AND LINZ, J.E. (2005):** Role of *cis*-acting sites *NorL*, a TATA box, and *AflR1* in *nor-1* transcriptional activation in *Aspergillus parasiticus*. – *Applied and Environmental Microbiology* 71: 1539-1545
- MIOTTO, B. AND STRUHL, K. (2008):** HBO1 histone acetylase is a coactivator of the replication licensing factor Cdt1. – *Genes and Development* 22: 2633-2638
- MÖNCHMEIER, C. (2005):** Charakterisierung einer Histidinproteinkinase RsHPK aus *Rhynchosporium secalis*. – Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät im Fachbereich Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- MULLER, H.J., LEAGUE, B.B. AND OFFERMANN, C.A. (1931):** Effect of dosage changes of sex-linked genes, and the compensatory effect of other gene differences between male and female. – *Anatomical Record* 51: 110
- MULLER, H.J. (1932):** Further studies on the nature and causes of gene mutations. – *Proceedings of the Sixth International Congress of Genetics* 1: 213-255

MULLER, H.J. (1950): Evidence of the precision of genetic adaptation. – *The Harvey Society Lecture Series* 43: 165-229

MULLINS, E.D., CHEN, X., ROMAINE, P., RAINA, R., GEISER, D.M. AND KANG, S. (2001): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. – *Phytopathology* 91: 173-180

MUNIR, A., MURAD, A., LENG, P., STRAFFON, M., WISHART, J., MACASKILL, S., MACCALLUM, D., SCHNELL, N., TALIBI, D., MARECHAL, D., TEKAIA, F., D'ENFERT, C., GAILLARDIN, C., ODDS, F.C. AND BROWN, A.J.P. (2001): *NRG1* represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. – *The EMBO Journal* 20 (17): 4742-4752

MYSORE, K.S. AND RYU, C.-M. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? – *Trends in Plant Science* 9: 97-104

NAKAFUKU, M., HOH, H., NAKAMURA, S., AND KAZIRO, Y. (1987): Occurrence in *Saccharomyces cerevisiae* of a gene homologous to the cDNA coding for the α subunit of mammalian G proteins. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 2140-2144.

NAKAI, K. AND HORTON, P. (1999): PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. - *Trends Biochemical Science* 24: 34-35

NEER, E.J., AND CLAPHAM, D.E. (1988): Roles of G protein subunits in transmembrane signaling. - *Nature (London)* 333: 129-134

NEUWALD, A.F. AND LANDSMAN, D. (1997): GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein. - *Trends in Biochemical Sciences* 22: 154–155

NGUYEN, B. A., POGOUTSE, A., PROVART, N., MOSES, A.M. (2009): NLStradamus: a simple Hidden Markov Model for nuclear localization signal prediction. - *BMC Bioinformatics* 10: 202-213

NIMCHUK, Z., ROHMER, L., CHANG, J.H. AND DANGL, J.L. (2001): Knowing the dancer from the dance: *R*-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen. – *Current Opinion in Plant Biology* 4: 288-294

NOWAK, S.J. AND CORCES, V.G. (2004): Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. – *Trends in Genetics* 20: 214-220

NÜRNBERGER, T. AND LIPKA, V. (2005): Non-host resistance: in plants: new insights into an old phenomenon. – *Molecular Plant Pathology* 6: 335-245

OKHUMA, Y., HORIKOSHI, M., ROEDER, R.G. AND DESPLAN, C. (1990): Engrailed, a homeodomain protein, can repress in vitro transcription by competition with the TATA box-binding protein transcription factor IID. – *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 2289-2293

OLDROYD, G.E.D. AND DOWNIE, J.A. (2004): Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. – *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5: 566-576

OLIVER, R.P. AND IPCHO, S.V.S. (2004): *Arabidopsis* pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. – *Molecular Plant Pathology* 5: 347-352

OLIVER, R. AND OSBOURN, A. (1995): Molecular dissection of fungal phytopathogenicity. – *Microbiology* 141: 1-9

O'MEARA, T.R., HAY, C., PRICE, M.S., GILES, S. AND ALSPAUGH, J.A. (2010): *Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host. – *Eukaryotic Cell* 9: 1193-1202

OSBOURN, A.E. (1996): Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. – *The Plant Cell* 8: 1821-1831

OSBOURN, A.E. (1999): Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. – *Fungal Genetics and Biology* 26: 163–168

OVERLAND, L. (1966): The role of allelopathic substances in the “smother crop” barley. – *American Journal of Botany* 53: 423-432

PANCHENKO, M.V., ZHOU, M.I. AND COHEN, H.T. (2004): Von Hippel-Lindau partner Jade-1 is a transcriptional co-activator associated with histone acetyltransferase activity. – *The Journal of Biological Chemistry* 279: 56032-56041

PANOZZO, C., CORNILLOT, E. AND FELEBROK, B. (1998): The CreA repressor is the sole DNA-binding protein responsible for carbon catabolite repression of the *alcA* gene in *Aspergillus nidulans* via its binding to a couple of specific sites. – *The Journal of Biological Chemistry* 273: 6367-6372

PANSTRUGA, R. (2003): Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. – *Current Opinion in Plant Pathology* 6: 320-326

PAPP, B., PAL, C. AND HURST, L.D. (2003): Dosage sensitivity and the evolution of the gene families in yeast. – *Letters to Nature* 424: 194-197

PENSELIN, D. (2010): Untersuchungen zur Wirkungsweise von Virulenzfaktoren des Gerstenpathogens *Rhynchosporium secalis*. – Diplomarbeit der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät im Fachbereich Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

PERFECT, S.E. AND GREEN, J.R. (2001): Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. – *Molecular Plant Pathology* 2: 101-108

PEREZ-GARCIA, A., SNOELJERS, S.S., JOOSTEN, M.H.A., GOOSEN, T. AND DE WIR, P.J.G.M. (2001): Expression of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* is regulated by the global nitrogen response factor NRF1. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 316-325

PERRY, J. (2006): The Epc-N domain: a predicted protein-protein interaction domain found in select chromatin associated proteins. - *BMC Genomics* 7: 6-14
doi:10.1186/1471-2164-7-6

PFAFFL, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. – *Nucleic Acids Research* 29: 2002-2007

PHAN, Q.T., BELANGER, P.H. AND FILLER, S.G. (2000): Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. – *Infection and Immunity* 68: 3485-3490

PI, H., LEE, L.-W. AND LO, S.J. (2009): New insights into polycistronic transcripts in eukaryotes. – *Chang Gung Medical Journal* 32: 494-497

PIERLEONI, A., MARTELL, P.L., FARISELLI P. AND CASADIO, R. (2006): BaCelLo: a Balanced subCellular Localization predictor. - *Bioinformatics* 22: 408-416

- POSTEL, S. AND KEMMERLING, B. (2009):** Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. - *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1025-1031
- PRATHUMPAI, W., FLITTER, S.J., MCINTYRE, M. AND NIELSEN, J. (2004):** Lipase production by recombinant strains of *Aspergillus niger* expressing a lipase-encoding gene from *Thermomyces lanuginosus*. – *Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 714-719
- PUNT, P.J., OLIVER, R.P., DINGEMANSE, M.A., POWWELS, P.H. AND VAN DEN HONDEL, C.A.M.J.J. (1987):** Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. – *Gene* 56: 117-124
- RADUTOIU, S., MADSEN, L.H., MADSEN, E.B., FELLE, H.H., UMHARA, Y., GRÖNLUND, M., SATO, S., NAKAMURA, Y., TABATA, S., SANDAL, N. AND STOUGAARD, J. (2003):** Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. – *Nature* 425: 585-592
- RAMAN, S.B., NGUYEN, M.H., ZHANG, Z., CHENG, S., JIA, H.Y., WEISNER, N., ICZKOWSKI, K. AND CLANCY, C.J. (2006):** *Candida albicans* SET1 encodes a histone 3 lysine 4 methyltransferase that contributes to the pathogenesis of invasive candidiasis. – *Molecular Microbiology* 60: 697-709
- RAUCHHAUS, U. (2002):** Untersuchungen zur Bedeutung der Chitinacetylase 1 pathogener Hyphen von *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. während der frühen Infektionsphasen. – Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=967127939&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=967127939.pdf)
- RAY, R.P. AND SCHÜPBACH, T. (1996):** Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. – *Genes & Development* 10: 1711-1723
- RINALDI, M.G. (1993):** Biology and pathogenicity of *Candida* species. – “*Candidiasis*” *Pathogenesis, Diagnosis and Treatment*. Editor, Gerald P. Bodey 2nd ed. Raven Press NY 1-20
- RODRIGUES-POUSADA, C.A., NEVITT, T., MENEZES, R., AZEVEDO, D., PEREIRA, J. AND AMARAL, C. (2004):** Yeast activator proteins and stress response: an overview. – *FEBS Letters* 567: 80-85

ROHE, M., GIERLICH, A., HERMANN, H., HAHN, M., SCHMIDT, B., ROSAHL, S. AND KNOGGE, W. (1995): The race-specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the *Rrs1* resistance genotype. – *The EMBO Journal* 14: 4168-4177

ROTEM, J., CLARE, G.B. AND CARTE, M.V. (1976): Effects of temperature, leaf wetness, leaf bacterial diffusates on production and lysis of *Rhynchosporium secalis* spores. – *Physiological Plant Pathology* 8: 297-305

RUIJTERA, G.J.G. AND VISSERA, J. (1997): Carbon repression in aspergilli. – *FEMS Microbiology Letters* 151:103-114

RUTLEDGE, B.J., ZHANG, K., BIER, E., JAN, Y.N. AND PERRIMON, N. (1992): The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. – *Genes & Development* 6: 1503-1517

SACHS, A.B., SARNOW, P. AND HENTZE, M.W. (1997): Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. – *Cell* 89: 831-838

SAITOU, N. AND NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. – *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425

SANABRIA, N., GORING, D., NÜRNBERGER T., AND DUBERY, I. (2008): Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. – *New Phytologist* 178: 503-514

SCHÄFER, W. (1994): Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. – *Annual Reviews of Phytopathology* 32: 461-477

SCHEDL, A., ROSS, A., LEE, M., ENGELKAMP, D., RASHBASS, P., VAN HEYNINGEN, V. AND HASTIE, N.D. (1996): Influence of *PAX6* gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. – *Cell* 86: 71-82

SCHERER, M. (2001): Molekulare Analyse der sexuellen Entwicklung von *Aspergillus nidulans*. – Dissertation im Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg/Lahn. (http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=971982872&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=971982872.pdf)

SCHINDLER, U., BECKMANN, H. AND CASHMORE, A.R. (1993): HAT3.1, a novel *Arabidopsis* homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. - *The Plant Journal* 4: 137-150

SCHIESTL, R.H., DOMINSKA, M. AND PETES, T.D. (1993): Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* with nonhomologous DNA: illegitimate integration of transforming DNA into yeast chromosomes and in vivo ligation of transforming DNA to mitochondrial DNA sequences. – *Molecular and Cellular Biology* 13: 2697-2705

SCHLEE, D. (1986): Ökologische Biochemie – *Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo*

SCHLÖSSER, E. (1997): Inkompatible Wirt-Pathogen-Beziehungen. - *Allgemeine Phytopathologie, Georg Thieme, Stuttgart, New York*: 260-315

SCHMITT, E.K., KEMPEN, R., KÜCK, U. (2001): Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. – *Molecular Genetics and Genomics* 265: 508-518

SCHNEPP, B., GRUMBLING, G., DONALDSON, T. AND SIMCOX, A. (1996): Vein a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulin. – *Genes & Development* 10: 2302-2313

SCHÜLE, R., UMESONO, K., MANGELSDORF, D.J., BOLADO, J., PIKE, J.W. AND EVANS, R.M. (1990): Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene. – *Cell* 61: 497-504

SCHUMACHER, J., DE LARRINOVA, I.F. AND TUDZYNSKI, B. (2008): Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development and full virulence on bean plants. – *Eukaryotic Cell* 7: 584-601

SCOTT, K.J. (1972): Obligate parasitism by phytopathogenic fungi. – *Biological Reviews* 47: 537-572

SHARON, A., YAMAGUCHI, K., CHRISTIANSEN, S., HORWITZ, B.A., YODER, O.C. AND TURGEON, B.G. (1996): An asexual fungus has the potential for sexual development. – *Molecular Genetics and Genomics* 251: 60-68

SHATKAY, H., HÖGLUND, A., BRADY, S., BLUM, T., DÖNNES, P., KOHLBACHER, O. (2007): SherLoc: high-accuracy prediction of protein subcellular localization by integrating text and protein sequence data. - *Bioinformatics* 23:1410-1417.

SHIPTON, W.A., BOYD, J.R. AND ALI, S.M. (1974): Scald of barley. – *Reviews in Plant Pathology* 53: 839-861

SINCLAIR, D.A.R., CLEGG, N.J., ANTONCHUK, J., MILNE, T.A., STANKUNAS, K., RUSE, C., GRIGLIATTI T.A., KASSIS, J.A. AND BROCK, H.W. (1998): *Enhancer of Polycomb* is a suppressor of Position-Effect Variegation in *Drosophila melanogaster*. – *Genetics* 148: 211-220.

SITTE, P. UND STRASBURGER, E. (1999): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. - *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg; Berlin*

SMALL, S., BLAIR, A. AND LEVINE, M. (1992): Regulation of *even-skipped* stripe 2 in the *Drosophila* embryo. – *The EMBO Journal* 11: 4047-4057

SMALL, I., PEETERS, N., LEGEAI, F., LURIN, C. (2004): Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. - *Proteomics* 4:1581-90

SMIT, P., RAEDTS, J., PORTYANKO, V., DEBELLE, F., GOUGH, C., BISSELING, T. AND GEURTS, R. (2005): NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. – *Science* 308: 1789-1791

SMITH, C.J. (1996): Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. – *New Phytologist* 132: 1-45

SMITH, E.R., EISEN, A., GU, W., SATTAH, M., PANNUTI, A., ZHOU, J., COOK, R.G., LUCCHESI, J.C. AND ALLIS, C.D. (1998): ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast. – *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95: 3561-3565

SNOEIJERS, S.S., PEREZ-GARCIA, A., GOOSEN, T., DE WIT, P.J.G. (2003): Promotor analysis of the avirulence gene *Avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* in the model filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. – *Current Genetics* 43: 96-102

SOANES, D.M., KERSHAW, M.J., COOLEY, R.N. AND TALBOT, N. (2002): Regulation of the *MPG1* hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 1253-1267

SOGER, S.J. AND GILES, N.H. (1965): Genetic control of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. - *Genetics* 52: 777-788

SOHN, K.T. AND YOON, K.S. (2002): Ultrastructural study on the cleistothecium development in *Aspergillus nidulans*. – *Mycobiology* 30: 117-127

SONNEBORN, A., BROCKMÜHL, D.P. AND ERNST, J.F. (1999): Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator. – *Infection and Immunity* 67: 5514-5517

SONNEBORN, A., BOCKMÜHL, D.P., GERADS, M., KURPANEK, K., SANGLARD, D. AND ERNST, J.F. (2000): Protein kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. – *Molecular Microbiology* 35: 386-396

SONNHAMMER E.L., EDDY S.R., DURBIN R. (1997): Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. - *Proteins* 28:405-420

SRIKANTHA, T., TSAI, L.K., DANIELS, K. AND SOLL, D.R. (2000): EFG1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. – *The Journal of Bacteriology* 182: 1580-1591

STAIB, P. AND MORSCHHÄUSER, J. (2005): Differential expression of the *NRG1* repressor controls species-specific regulation of chlamyospore development in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. – *Molecular Microbiology* 55: 637-652

STAIB, P. AND MORSCHHÄUSER, J. (2006): Chlamyospore formation in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* – an enigmatic developmental programme. – *Mycoses* 50: 1-12

ŠTANOJEVIĆ, D., HOEY, T. AND LEVINE, M. (1989): Sequence-specific DNA-binding activities of the gap proteins encoded by *hunchback* and *Krüppel* in *Drosophila*. – *Nature* 341: 331-335

STANUNKAS, K., BERGER, J., RUSE, C., SINCLAIR, D.A.R., RANDAZZO, F. AND BROCK, H.W. (1998): The *Enhancer of Polycomb* gene of *Drosophila* encodes a chromatin protein conserved in yeast and mammals. - *Development* 125: 4055-4066

STEELE, L., SUKHANOVA, M.J., XU, J., GORDON, G.M., HUANG, Y., YU, L. AND DU, W. (2009): *Retinoblastoma family* protein promotes normal R8-photoreceptor differentiation in the absence of *rhinoceros* by inhibiting *dE2F1* activity. – *Developmental Biology* 335: 228-236

STEINER-LANGE, S., FISCHER, A., BÖTTCHER, A., ROUHARA, I., LIEDGENS, H., SCHMELZER, E. AND KNOGGE, W. (2003): Differential defense reactions in leaf tissues of barley in response to infection by *Rhynchosporium secalis* and to treatment with a fungal avirulence gene product. – *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16: 893-902

STERGIOPOULOS, I. AND DE WIT, P.J.G.M. (2009): Fungal effector proteins. – *Annual Reviews in Phytopathology* 47: 233-263

STERN, C. (1929): Über die additive Wirkung multipler Gene. – *Biologisches Zentralblatt* 49: 261-290

STERN, C. (1960): Dosage compensation – Development of a concept and new facts. – *Canadian Journal of Genetic Cytology* 2: 105-118

STERNER, D.E. AND BERGER, S.L. (2000): Acetylation of histones and transcription-related factors. – *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 435-459

STOLDT, V.R., SONNEBORN, A., LEUKER, C.E. AND ERNST, J.F. (1997): Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. – *The EMBO Journal* 16: 1982-1991

TARR, S.A.J. (1972): The principles of plant pathology. – *Macmillan, London.*

TAVERNA, S.D., ILIN, S., ROGERS, R.S., TANNY, J.C., LAVENDER, H., LI, H., BAKER, L., BOYLE, J., BLAIR, L.P., CHAIT, B.T., PATEL, D.J., AITCHISON, J.D., TACKETT, A.J. AND ALLIS, D. (2006): Yng1 PHD finger binding to H3 trimethylated at K4 promotes NuA3 HAT activity at K14 of H3 and transcription at a subset of targeted ORFs. – *Molecular Cell* 24: 785-796

TEBARTH, B., DOEDT, T., KRISHNAMURTHY, S., WEIDE, M., MONTEROLA, F., DOMINGUEZ, A. AND ERNST, J.F. (2003): Adaption of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the *EFG1* Gene. – *Journal of Molecular Biology* 329: 949-962

TENHARMSSEL, A., AUSTIN, R.J., SAVENELLI, N. AND BIGGIN, M.D. (1993): Cooperative binding at a distance by *even-skipped* protein correlates with repression and suggests a mechanism of silencing. – *Molecular and Cellular Biology* 13: 2742-2752

THASTRUP, O., TULLIN, S., POULSEN, L.K., PETERSEN, S., (1995): Fluorescent proteins. – *United States Patent* US 006.172.199 22.09.1995

THE UNIPROT CONSORTIUM (2007): The universal protein resource (UniProt). - *Nucleic Acids Research* 35: D193-D197

THURIAUX, P., RAMOS, F., PIÉRARD, A., GRENSON, M. AND WIAME, J.M. (1972): Regulation of the carbamoylphosphate synthetase belonging to the arginine biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. – *Journal of Molecular Biology* 67: 277-287

TILBURN, J., SARKAR, S., WIDDICK, D.A., ESPESO, E.A., OREJAS, M., MUNGROO, J., PENALVA, M.A. AND ARST JR., H.N. (1995): The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. – *The EMBO Journal* 14: 779-790

TREISMAN, J. AND DESPLAN, C. (1989): The products of the *Drosophila* gap genes *hunchback* and *Krüppel* bind to the *hunchback* promoters. – *Nature* 341: 335-337

TRIBUS, M., BAUER, I., GALEHR, J., RIESER, G., TROJER, P., BROSCHE, G., LOIDL, P., HAAS, H. AND GRAESSLE, S. (2010): A novel motif in fungal class 1 histone deacetylase is essential for growth and development of *Aspergillus*. – *Molecular Biology of the Cell* 21: 345-353

TSUDA, L., NAGARAJ, R., ZIPURSKY, S. AND BANERJEE, U. (2002): An EGFR/Ebi/Sno pathway promotes delta expression by inactivating Su(H)/SMRTER repression during inductive Notch signaling. – *Cell* 110: 625

TURNER, B.M. (2007): Defining an epigenetic code. – *Nature Cell Biology* 9: 2-6

VANETTEN, H.D., MANSFIELD, J.W., BAILEY, J.A. AND FARMER, E.E. (1994): Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus “phytoanticipins”. – *The Plant Cell* 6: 1191-1192

VAN DEN HEUWEL, S. AND DYSON, N.J. (2008): Conserved functions of the pRB and E2F families. – *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* 9: 713-724

VAN KAN, J.A.L. (2006): Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. – *Trends in Plant Science* 11: 247-253

VEITIA, R.A. (2002): Exploring the etiology of haploinsufficiency. – *Bioessays* 24: 175-184

VEITIA, R.A. (2003): Nonlinear effects in macromolecular assembly and dosage sensitivity. – *Journal of Theoretical Biology* 220: 19-25

VEITIA, R.A., BOTTANI, S. AND BIRCHLER, J.A. (2008): Cellular reactions to gene dosage imbalance: genomic, transcriptomic and proteomic effects. – *Trends in Genetics* 24: 390-397

VIENKEN, K., SCHERER, M. AND FISCHER, R. (2005): The Zn(II)₂Cys₆ putative *Aspergillus nidulans* transcription factor repressor of sexual development inhibits sexual development under low-carbon conditions and in submerged culture. – *Genetics* 169: 619-630

VIGNALI, M., HASSAN, A.H., NEELY, K.E. AND WORKMAN, J.L. (2000): ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. – *Molecular and Cellular Biology* 20: 1899-1910

VILELA, C., LINZ, B., RODRIGUES-POUSADA, C. AND MCCARTHY, J.E.G. (1998): The yeast transcription factor genes *YAP1* and *YAP2* are subject to differential control at the levels of both translation and mRNA stability. – *Nucleic Acids Research* 26: 1150-1159

VILELA, C., VELASCO RAMIREZ, C., LINZ, B., RODRIGUES-POUSADA, C. AND MCCARTHY, J.E.G. (1999): Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. – *The EMBO Journal* 18: 3139-3152

VILELA, C. AND MCCARTHY, J.E.G. (2003): Regulation of fungal gene expression via short open reading frames in the mRNA 5' untranslated region. – *Molecular Microbiology* 49: 859-867

VOAS, M.G. AND REBAY, I. (2003): The novel plant homeodomain protein Rhinoceros antagonizes Ras signaling in the *Drosophila* eye. – *Genetics* 165: 1993-2006

VOISARD, C., WANG, J., MCEVOY, J.L., XU, P. AND LEONG, S.A. (1993): *urbs1*, a gene regulating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*, encodes a protein similar to the erythroid transcription factor GATA-1. – *Molecular and Cellular Biology* 13: 7091-7100

VÖLZ, R. (2006): Funktionelle Analyse des MAP-Kinase-Gens *RsPMK1* aus *Rhynchosporium secalis*. – Diplomarbeit Fachbereich Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

WALTON, J.D. (1996): Host-selective toxins: agents of compatibility. - *Plant Cell* 8: 1723-1733

WANG, Z., GABA, A. AND SACHS, M.S. (1999): A highly conserved mechanism of regulated ribosome stalling mediated by fungal arginine attenuator peptides that appears independent of the charging status of arginyl-tRNAs. – *Journal of Biological Chemistry* 274: 37565-37574

WASSERMAN, J.D. AND FREEMAN, M. (1997): Control of EGF receptor activation in *Drosophila*. – *Trends in Cell Biology* 7: 431-435

WATSON, N. (1988): A new revision of the sequence of plasmid pBR322. – *Gene* 70: 399-403

WEINBERG, R.A. (1995): The retinoblastoma protein and cell cycle control. – *Cell* 81: 323-330

WEITNAUER, G. (2002): Methyltransfer in *Streptomyces viridochromogenes* Tü57 - kleine Veränderung, bedeutender Effekt. - Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
(<http://tobias-lib.uni-tuebingen.de/volltexte/2002/597/pdf/DissGW.pdf>)

WELTY, R.E. AND METZGER, R.J. (1996): First report of scald of triticale caused by *Rhynchosporium secalis* in North America. – *Plant Disease* 80: 1220-1223

WERNER, M., FELLER, A. AND PIÉRARD, A. (1985): Nucleotide sequence of yeast gene *CPA1* encoding the small subunit of arginine-pathway carbamoyl-phosphate synthetase. – Homology of the deduced amino acid sequence to other glutamine amidotransferases. - *European Journal of Biochemistry* 146: 371-381

WERNER, M., FELLER, A., MESSENGUY, F. AND PIERARD, A. (1987): The leader peptide of yeast gene *CPA1* is essential for the translational repression of its expression. – *Cell* 49: 805-813

WEVELSIEP, L., KOGEL, K.-H. AND KNOGGE, W. (1991): Purification and characterization of peptides from *Rhynchosporium secalis* inducing necrosis in barley. – *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 471-482

WEVELSIEP, L., RÜPPING, E. AND KNOGGE, W. (1993): Stimulation of barley plasmalemma H⁺-ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. – *Plant Physiology* 101: 297-301

WHITEWAY, M., HOUGAN, L., DIGNARD, D., THOMAS, D.Y., BELL, L., SAARI, G.C., GRANT, F.J., O'HARA, P., AND MACKAY, V.L. (1989): The STE4 and STE18 genes of yeast encode potential β and γ subunits of the mating factor receptor-coupled G protein. - *Cell* 56: 467-477

WHITEWAY, M. AND BACHEWICH, C. (2007): Morphogenesis in *Candida albicans*. – *Annual Reviews in Microbiology* 61: 529-553

WIPPICH, C. AND WINK, M. (1985): Biological properties of alkaloids influence of quinolizine and gramine on the germination and development of powdery mildew, *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. – *Experientia* 41: 1477-1479

WOJTASZEK, P. (1997): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. – *Biochemistry Journal* 322: 681-692

XI, K., BURNET, P.A., TEWARI, J.P., CHEN, M.H., TURKINGTON, T.K. AND HELM, J.H. (2000): Histopathological study of barley cultivars resistant and susceptible to *Rhynchosporium secalis*. – *Phytopathology* 90: 94-102

YANISCH-PERRON, C. VIEIRA, J. AND MESSING, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. - *Gene* 33: 103-119.

YU, C.S., LIN, C.J., HWANG, J.K. (2004): Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions. - *Protein Science* 13:1402-1406

YU, C.S., CHEN, Y.C., LU, C.H., HWANG, J.K. (2006): Prediction of protein subcellular localization. - *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 64:643-651

- YUAN, G.-F., FU, Y.-H. AND MARZLUF, G.A. (1991):** *nit-4*, a pathway-specific regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative binuclear zinc DNA-binding domain. – *Molecular and Cellular Biology* 11: 5735-5745
- YUILL, S.B. (2008):** Tagging pathogenicity genes in the interaction of the barley and fungal pathogen, *Rhynchosporium secalis*. – *School of Agriculture, Food and Wine, Discipline of Plant and Food Science, vol. PhD. University of Adelaide, Adelaide*, p. 192
- YUN, S.H., ARIE, T., KANEKO, I., YODER, O.C. AND TURGEON, B.G. (2000):** Molecular organization of mating type loci in heterothallic, homothallic and asexual *Gibberella/Fusarium* species. – *Fungal Genetics and Biology* 31: 7-20
- ZACCHI, L.F., SCHULZ, W.L. AND DAVIS, D.A. (2010):** *HOS2* and *HDA1* encode histone deacetylases with opposing roles in *Candida albicans* morphogenesis. – *PloS ONE* 5 (8): e12171
- ZAFFARANO, P.L., McDONALD, B. AND LINDE, C.C. (2010):** Two new species of *Rhynchosporium*. – *Mycologia*, im Druck (first published on August 31, 2010 as doi: 10.3852/10-119)
- ZHAN, J., FITT, B.D.L., PINNSCHMIDT, H.O., OXLEY, S.J.P. AND NEWTON, A.C. (2007):** Resistance, epidemiology and sustainable management of *Rhynchosporium secalis* populations on barley. – *Plant Pathology* 57: 1-14
- ZHANG, Y. AND RHEINBERG, D. (2001):** Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. – *Genes and Development* 15: 2343-2360
- ZHOU, M.I., WANG, H., ROSS, J.J., KUZMIN, I., XU, C. AND COHEN, H.T. (2002):** The von Hippel-Lindau tumor suppressor stabilizes novel plant homeodomain protein Jade-1. – *The Journal of Biological Chemistry* 277: 39887-39898
- ZHOU, M.I., WANG, H., FOY, R.L., ROS, J.J. AND COHEN, H.T. (2004):** Tumor suppressor von Hippel-Lindau (VHL) stabilization of Jade-1 protein occurs through plant homeodomains and is VHL mutation dependent. – *Cancer Research* 64: 1278-1286
- ZHOU, M.I., FOY, R.L., CHITALIA, V.C., ZHAO, J., PANCHENKO, M.V., WANG, H. AND COHEN, H.T. (2005):** Jade-1, a candidate renal tumor suppressor that promotes apoptosis. – *Proceedings of the National Academy of Science USA* 102: 11035-11040

ZHU, J. AND SCHIESTL, R.H. (1996): Topoisomerase I involvement in illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. – *Molecular and Cellular Biology* 16: 1805-1812

ZIEROLD, U., SCHOLZ, U. AND SCHWEIZER, P. (2005): Transcriptome analysis of *mlo*-mediated resistance in the epidermis of barley. – *Molecular Plant Pathology* 6: 139-151

ZITOMER, R.S., CARRICO, P. AND DECKERT, J. (1997): Regulation of hypoxic gene expression in yeast. – *Kidney International* 51: 507-513

ZORDAN, R.E., MILLER, M.G., GALGOCZY, D.J., TUCH, B.B. AND JOHNSON, A.D. (2007): Interlocking transcriptional feedback loops control white-opaque switching in *Candida albicans*. – *PloS Biology* 5: e256

ZUNIGA, G.E., SALGADO, M.S. AND CORCUERA, L.J. (1985): Role of an indole alkaloid in the resistance of barley seedlings to aphids. – *Phytochemistry* 24: 945-947

7. Anhang

7.1 Verwendete Oligonukleotide

Nummer	Bezeichnung	Sequenz
1	3'-Int1s	5'-CAT TGG ACC TCG CAA CCC TAG-3'
2	3'-Int3s	5'-CAC GAA CTT CCG GGA CGC CTC-3'
3	3'-Int4as	5'-CCT CCG CCC TTT CTT CTT CGC-3'
4	5'-Int1s	5'-ATG TCG CAC TAT TAG AAG GG-3'
5	5'-Int3s	5'-ATA ATC TTG ATG GCA GTT CG-3'
6	5'-Int2as	5'-CCG GTC CCG GAT TAA TAA TC-3'
7	atu2as	5'-TAG TAC TCG GCT TCA GCT CC-3'
8	atu3s	5'-TTG GAC AAG GTT CGA CAC GT-3'
9	ble antisense	5'-AGT GCC AAG CTC TAG AAA GA-3'
10	ble-down-s	5'-CGC TCG GGT TCT CCC GGG AC-3'
11	ble sense	5'-GTG AGC TCG GAT CCG TTA TAA CTA GTC GTA CAG TGA CCG GTG ACT CT-3'
12	ble-up-as	5'-TTG GAC TGA CGC AAC GAC CT-3'
13	Fusion-nested-s	5'-GCA CCA TAA GAG ACG CTG CG-3'
14	Fusion-nested-as	5'-TCA TTG CTC GTA TCG CCG TT-3'
15	Fusion-Primer1s	5'-CAA CAG CAG TCA ACA GAT CA-3'
16	Fusion-Primer2as	5'-GCA TGC CAG AAA GAG TCA CCA TCG TCT TCT GCA ATC GGT A-3'
17	Fusion-Primer3s	5'-TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAT AAC GCG AGA GGT AGA AAA G-3'
18	Fusion-Primer4as	5'-CGC TGA CAA CTT CCG TGG TA-3'
19	Fusion-Primer5s	5'-TAC CGA TTG CAG AAG ACG ATG GTG ACT CTT TCT GGC ATG C-3'
20	Fusion-Primer6as	5'-CTT TTC TAC CTC TCG CGT TAT CTC GTC TCC CGA AAA TGA A-3'
21	Fusion-Primer6as-2	5'-CCT CTA AGT TCT TCA TCA TCT CTC GTC TCC CGA AAA TGA A-3'

ANHANG

22	Fusion-Primer7s	5'-TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAG ATG AAG AAC TTA GAG G-3'
23	Fusion-Primer8as	5'-GAT TTC AAA TGT TGC AGA-3'
24	GFP-Fus-GFP1-2s	5'-TCC CCG GGG TAG GTC TCT TGA CGA CCG T-3'
25	GFP-Fus-GFP2-2as	5'-TCA TCG ATA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A-3'
26	GFP-Fus-gpd1s	5'-CCT CTA GAT CTT TCT GGC ATG CGG AGA G-3'
27	GFP-Fus-gpd2as	5'-CTA CCG GTG GGA AAA GAA AGA GAA AAG A-3'
28	GFP-Fus-HPH1-2s	5'-GAC CCG GGT ACA GTG ACC GGT GAC TCT TTC-3'
29	GFP-Fus-HPH2as	5'-GCT CTA GAT CTC TTC GCC GGA GCC TG-3'
30	GFP-Fus-PFP1s	5'-AGA CCG GTA TGG CCA CTC TGC CTT CCA CA-3'
31	GFP-Fus-PFP2-2as2	5'-TTA TCG ATA CCC ATA GCG GCG TTT TCT C-3'
32	GFP antisense	5'-GTG AAG CTT CAC GGT ACC TC-3'
33	GFP sense	5'-GAA GCT TTT GGG GCC CCG CGG CTT AAT TAA TGG CAT GCT GGG TAA ACG ACT CA-3'
34	Gpd-RTs	5'-TCA AGG GCA CGA TCG AGG CT-3'
35	Gpd-RTas	5'-TCG CTC CAT GGG ATC TCG GA-3'
36	HO05J24F	5'-GTG CGC TGT GGT CAA GAT GTT- 3'
37	HO05J24R	5'-TAG TGA TAT CGC TCA TGC CGG- 3'
38	HPH1s	5'-AAA GTT CGA CAG CGT CTC CG-3'
39	HPH2as	5'-CTC GTC TGG CTA AGA TCG GC-3'
40	NIP1-RTs	5'-CCT GCT TGG TTC CTG GGG AT-3'
41	NIP1-RTas	5'-GTA TCC CGT CGG GCA TTG GA-3'
42	NLS-Fus1s	5'-GAA CTG TAC AGT CTT GGA GCA GAT TTC AAG-3'
43	NLS-Fus2as	5'-ATT CTG TAC ATC AGC GCC TCC GCC CTT TCT-3'

44	Oligo-dT-spec	5'-TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG AGA ATT CAA CGT TTT TTT TTT TTT TTT TT-3'
45	Oligo-dT-out	5'-TGT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCG-3'
46	Oligo-dT-in	5'-TCA CTA TAG GGC GAG AAT TCA ACG-3'
47	PFP1-RT1s	5'-GAT CCC CAG GTG AAG CCC GA-3'
48	PFP1-RT1as	5'-GAT TCG CTT CCC CAG AC-3'
49	PFP1-RT2s	5'-GTA TCC CGG TAC GCT GCC CC-3'
50	PFP1-RT2as	5'-GAT GAG CCC ACT TCG ACG CA-3'
51	PFP2as	5'-ATA CCG CGT CCA ATT AAC TG-3'
52	PFP3s	5'-TGA TAT GGA CGA GCA GGA TG-3'
53	PFP6as	5'-ATA GCG TTC GTG TTC TCG CA-3'
54	PFP7s	5'-CAA ATC GTC AAC TTG GGA GC-3'
55	PFP13s	5'-GTT CTA GAG AAG TAT AGT TTC GAC ATC GTG GAG-3'
56	PFP14as	5'-TCT GGG CCC TTC ATC ATC CAT CTC ACT AA-3'
57	PFP15s	5'-TAG AAT TCC AAC AGC AGT CAA CAG ATC A-3'
58	PFP18as	5'-GAA CTA GTA TCG TCT TCT GCA ATC GGT A-3'
59	PFP19s	5'-CTA GCG GTT CTT GAC GGT AC-3'
60	PFP20s	5'-TTG CTG GAA TGG GTC CTG CC-3'
61	PFP21as	5'-CCT TGT CTT CGA ATC GAG CCA G-3'
62	PFP22as	5'-CTC CAT TTC GCA GGG CGT TC-3'
63	PFP23as	5'-AGC AGG CTC GCT TCT TTT AC-3'
64	PFP27s	5'-ACT GCT GGC CAA GAT TCA ATT G-3'
65	PFP29s	5'-CTC CTG ATG CCG ACG GCT AT-3'
66	PFP43s	5'-CAC TCG AGC GTA TCT TGG CTT CCC AAG C-3'
67	PFP44as	5'-GTC TCG AGC GTC TTC TGC AAT CGG TAT G-3'
68	PFP46s	5'-CTA CCA AGC ATT CCA TGT TAC TTG-3'
69	PFP47as	5'-CAG GAC CCA TTC CAG CAA AA-3'

70	PFP48s	5'-TCG GGC CCC GTA TCT TGG CTT CCC AA-3'
71	PFP49as	5'-GAG GGC CCA AAG ATT TCA AAT GTT GC-3'
72	PFP50s	5'-TAG GGC CCG AGT AAG TCT GCA ACA GCA-3'
73	PFP51as	5'-CTG GGC CCT GGC TGG CCC AAT TGA AA-3'
74	Prom-Fus1s	5'-TCT CTA GAA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A-3'
75	Prom-Fus2as	5'-TTT CTA GAT TAT TGA AGC ATT TAT CAG G-3'
76	pSS2-ble3s	5'-GCC AAG TTG ACC AGT GCC GT-3'
77	pSS2-ble4as	5'-CAG TCC TGC TCC TCG GCC AC-3'
78	pSS2-GFP3s	5'-CGA CAC CAA AGA TCT GAG TCC G-3'
79	pSS2-GFP4as	5'-AAG GGC GAG GAG CTG TTC AC-3'
80	pSS2-MCS2-1s	5'-CCT GGG TTC GCA AAG ATA ATT G-3'

Tabelle 7.1: Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide sowie deren Nukleinsäuresequenz

7.2 Sequenzen und Sequenzvergleiche

7.2.1 Nukleinsäuresequenzvergleiche

Abbildung 7.2.1.1: Nukleinsäuresequenzvergleich des durch 5'-RACE-PCR amplifizierten cDNA-Fragments mit der genomischen *PFPI*-Gensequenz.

Die Sequenz I zeigt die Basen 1232-1691 der genomischen Sequenz des *PFPI*-Gens. In Sequenz II ist ein Teil des durch 5'-RACE-PCR amplifizierten cDNA-Fragments gezeigt, das die Basen 58-512 umfasst und homolog zu Sequenz I ist. Die homologe Sequenz wird begrenzt durch die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide im 5'-Bereich (SMART-IITM-A-Oligonukleotid (III), *UPM* (V) und *NUP* (VI)) sowie des 3'-Bereiches (PFP23as (IV)). Identische Basen sind blau unterlegt. Das Translationsstartcodon ist in der genomischen sowie in der cDNA-Sequenz rot markiert. Nicht-homologe Sequenzen des cDNA-Fragments in 5'- bzw. 3'-Richtung (ausgehend von den jeweiligen Sequenzen der Oligonukleotide) stammen vom für die Sequenzierung genutzten Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO[®].

Der Sequenzvergleich wurde mit VectorNTI AdvanceTM 11 erstellt (Lu & Moriyama, 2004).

Abbildung 7.2.1.2: Nukleinsäuresequenzvergleich des durch 3'-RACE-PCR amplifizierten cDNA-Fragments mit der genomischen *PFPI*-Gensequenz.

Die Abbildungen 7.2.1.2a-e zeigen den Sequenzvergleich des 1691 bp langen cDNA-Fragments mit der genomischen *PFPI*-Gensequenz. Sequenz I umfasst die Basen 3578-5537 der genomischen *PFPI*-Gensequenz. Sequenz II zeigt die Basen 1-1020 des aus 3'-Richtung sequenzierten cDNA-Fragments (3'-RACE). In III-V sind die auf 3'-Seite verwendeten Oligonukleotide (Oligo-dT-spec (III), Oligo-dT-out (IV) und Oligo-dT-in (V)) gezeigt. Sequenz VI umfasst die Basen 1-1100 des von 5'-Seite sequenzierten cDNA-Fragments (3'-RACE). Das auf 5'-Seite verwendete genspezifische Oligonukleotid (PFP13s) ist in Sequenz VII dargestellt. Identische Basen sind blau markiert. Das identifizierte Intron ist in der genomischen sowie in der cDNA-Sequenz (VI) rot gekennzeichnet. Nicht-homologe Sequenzen des cDNA-Fragments in 5'- bzw. 3'-Richtung (ausgehend von den jeweiligen Sequenzen der Oligonukleotide) stammen vom für die Sequenzierung genutzten Klonierungsvektor pCR[®]2.1-TOPO[®].

Der Sequenzvergleich wurde mit VectorNTI Advance[™] 11 erstellt (Lu & Moriyama, 2004).

7.2.2 Aminosäuresequenzvergleiche

Abbildung 7.2.2.1: Aminosäuresequenzvergleich von Pfp1 mit homologen Proteinen anderer pilzlicher Vertreter.

Die Abbildungen 7.2.2.1a-d zeigen einen Sequenzvergleich von homologen pilzlichen Vertretern der EPL-Proteinfamilie mit der Pfp1-Proteinsequenz. Konservierte Aminosäuren sind rot markiert und mit gelben Balken unterlegt. Identische Aminosäuren erscheinen blau unterlegt, während funktionell sehr ähnliche grün markiert sind. Leicht ähnliche Aminosäuren sind zusätzlich grün auf weißem Hintergrund gekennzeichnet. Die Ziffern am Beginn sowie am Ende der Sequenzen geben die jeweilige Anzahl der Aminosäuren der Proteine an. Mit römischen Ziffern sind die miteinander verglichenen Proteine gekennzeichnet:

I – *Rhynchosporium commune* Pfp1

II – *Ajellomyces dermatitidis* PHD-Finger-Protein [EEQ86498]

III – *Ajellomyces capsulatus* PHD-Finger-Protein mit Bromodomäne [EEH11126]

IV – *Aspergillus fumigatus* PHD-Finger-Protein [EDP48367]

V – *Neosartorya fischeri* putatives PHD-Finger-Protein [EAW19571]

VI – *Arthroderma otae* jade-1 [EEQ33024]

VII – *Penicillium marneffeii* putatives PHD-Finger-Protein [EEA21424]

VIII – *Aspergillus oryzae* PHD-Finger-Protein BR140/LIN-49 [Q2USW2]

IX – *Saccharomyces cerevisiae* Nto1p [NP_015356]

Der Sequenzvergleich wurde mit VectorNTI Advance[™] 11 erstellt (Lu & Moriyama, 2004).

Abbildung 7.2.2.2: Aminosäuresequenzvergleich von Pfp1 und Pfp2.

Die Abbildungen 7.2.2.2a und b zeigen den Sequenzvergleich von Pfp1 (I) mit der aus der EST-Datenbank von *R. commune* abgeleiteten Proteinsequenz von Pfp2 (II). Konservierte Aminosäuren sind rot markiert und gelb unterlegt. Funktionell sehr ähnliche Aminosäuren sind grün gekennzeichnet. Die Ziffern am Beginn sowie am Ende der Sequenzen geben die jeweilige Anzahl der Aminosäuren der Proteine an.

Der Sequenzvergleich wurde mit VectorNTI Advance[™] 11 erstellt (Lu & Moriyama, 2004).

Abbildung 7.2.2.3: Aminosäuresequenzvergleich der putativen PHD-Zink-Finger-Domäne von Pfp2 (I) mit der Epc-N-Domäne von Pfp1 (II).

Konservierte Aminosäuren sind rot markiert und mit gelben Balken unterlegt. Funktionell sehr ähnliche Aminosäuren sind grün hervorgehoben. Die Ziffern am Beginn sowie am Ende der Sequenzen kennzeichnen die jeweils miteinander verglichenen Aminosäuren der beiden Proteine. Die Signaturen der PHD-Zink-Finger-Motive sind durch schwarze Klammern in den Sequenzen gekennzeichnet (durchgängige Linien – PHD, unterbrochene Linien – putativer *Zn-knuckle* sowie PHD-Derivat).

Der Sequenzvergleich wurde mit VectorNTI Advance™ 11 erstellt (Lu & Moriyama, 2004).

7.2.3 Sequenzen

Abbildung 7.2.3.: Positionen stromaufwärts der proteinkodierenden *PFPI*-Sequenz gelegener kurzer offener Leserahmen (uORFs).

Die Abbildung zeigt die Basenpaare 901-1700 der *PFPI*-Gensequenz. Der Beginn der proteinkodierenden Sequenz (1529-1700 bp) ist rot hervorgehoben. Stromaufwärts dieser Sequenz sind die uORFs1 (1068-1259 bp, blau), 2 (1249-1335 bp, grün) und 3 (1409-1453 bp, orange) sowie die *Bam*HI-Restriktionsstelle der REMI-Integration (1254-1259 bp, gelb) markiert. Oberhalb der Leserahmen sind die davon abgeleiteten Aminosäuresequenzen im Dreibuchstabencode gekennzeichnet. Drei Sterne markieren die Stoppcodons. Links im Bild sind die Positionen der jeweiligen Leserahmen angegeben (uORF1 [+3], uORF2 [+1], uORF3 [+2]). Nur uORF3 verläuft in einem Leserahmen mit dem proteinkodierenden *PFPI*-ORF.

Die Auswertung der Sequenz erfolgte mit VectorNTI Advance™ 11 (Lu & Moriyama, 2004).

I	3578	GCTGCAACGCATCGACACGCCGGTCACTGAGCATCAACCAGATGAATCACAACCTGACACAGGTCCTAAGGTCGCATCGACTCTGGCAAGCACTAAGAAAGAAA
II	1	-----
III	1	-----
IV	1	-----
V	1	-----
VI	1	-----CTATGAAAAATGAAATTACGCCAAGCTTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTAA-----
VII	1	-----
I		GGGAACCAACCAGAAAGCCAGTCTGGAAGCTCCCTTCTGGTGCSCCTGTTATCCGAAGTATAGTTTCGACATCGTGGAGAAGTCACCTCCAACGGCTTCA
II		-----
III		-----
IV		-----
V		-----
VI		-----CGGCC-----GCCAGTGTG-----CGGAATTCGGCTTGTTCAGAGAAGTATAGTTTCGACATCGTGGAGAAGTCACCTCCAACGGCTTCA
VII		-----GTTCTAGAGAAGTATAGTTTCGACATCGTGGAGAAGTCACCTCCAACGGCTTCA-----
I		ACATCCCCAAGCGGAAAGATATACTCGGGACGCTTGTCCGGTACTGGACCCCTCAAACCGAGAGGCCCGGAGAGGAGCAGCTTGTCTCAAGCGGACTACAAT
II		-----
III		-----
IV		-----
V		-----
VI		ACATCCCCAAGCGGAAAGATATACTCGGGACGCTTGTCCGGTACTGGACCCCTCAAACCGAGAGGCCCGGAGAGGAGCAGCTTGTCTCAAGCGGACTACAAT
VII		-----
I		GCAGATGGAAACATTCCTTCAATGGAGATCCCGCCGAAATTTTGGTGGAAATGGGTCTCGCCGGGAGAACAAAGACTCAATCCGCCGTATTCGAATTCGG
II		-----
III		-----
IV		-----
V		-----
VI		GCAGATGGAAACATTCCTTCAATGGAGATCCCGCCGAAATTTTGGTGGAAATGGGTCTCGCCGGGAGAACAAAGACTCAATCCGCCGTATTCGAATTCGG
VII		-----

Abbildung 7.2.1.2a

I	CAGACACTGATACAGGATCTGGAAAAGCTAAAAGTCTCTCGGAGACATAGTAACCGCAGAGGTAGAAAAGTATCAGCCAGTGACCGCTAGAGGAAGATT
II	-----
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	CAGACACTGATACAGGATCTGGAAAAGCTAAAAGTCTCTCGGAGACATAGTAACCGCAGAGGTAGAAAAGTATCAGCCAGTGACCGCTAGAGGAAGATT
VII	-----
I	EGGTGGATTACAGTTTACTTTCCAAATCGCCAGAAATGTTACCCCAAATCATACAAAAGTCCGCTCGC
II	-----
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	EGGTGGATTACAGTTTACTTTCCAAATCGCCAGAAATGTTACCCCAAATCATACAAAAGTCCGCTCGC
VII	-----
I	CGTAAATAG
II	GGCTTGATATCAGGGCTATTTTCACTGATGGGCTGCTGAAGATACAGAAAAAGTGGAGAAATCGAATTCITCACCACCGCGGATGICTTTTGCC
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	GCCTTGATATCAGGGCTATTTTCACTGATGGGCTGCTGAAGATACAGAAAAAGTGGAGAAATCGAATTCITCACCACCGCGGATGICTTTTGCC
VII	-----
I	CAGCAATTTTAGACATATTTCGAAACGGAAATCATCTCGGATCCCGAGGAGCCGAGACAGCGGCTCGAAGGAACTTGAGAAAAGGATCCACAGTCA
II	-----
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	CAGCAATTTTAGACATATTTCGAAACGGAAATCATCTCGGATCCCGAGGAGCCGAGACAGCGGCTCGAAGGAACTTGAGAAAAGGATCCACAGTCA
VII	-----

Abbildung 7.2.1.2b

I	AGAA GAC ACCAC TTGAC ATCAA AGAGCGGA GGGCTCTGGGGA AGCGAATCATCAA AGCCGTTCA ACCCAATTAGAA GCGGCTATCAA ATCAGA AGCTIGT
II	-----
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	AGAA GAC ACCAC TTGAC ATCAA AGAGCGGA GGGCTCTGGGGA AGCGAATCATCAA AGCCGTTCA ACCCAATTAGAA GCGGCTATCAA ATCAGA AGCTIGT
VII	-----
I	GATCAG TGGCAAGTCTA TTGAAAGACACCTGAAGGAC -- CTCGTTGAACTTCTTGATTCTACTTATACTGCTGGCCAAGATTCAATTCGGTCTCTCTTGG
II	-----GGGTTTCC CAG CCC-GAC GTTGTAA CGACGGCCAGTGAATTT--TTATTCGAC-----CTCCTCTATAGGGCGAATIG-GGCCCTTCTAGA
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	GATCAG TGGCAAGTCTA TTGAAAGACACCTGAAGGAC -- CTCGTTGAACTTCTTGATTCTACTTATACTGCTGGCCAAGATTCAATTCGGTCTCTCTTGG
VII	-----
I	CGATACAGGATCTTTGGGAGATTTTGATGCTGATCAAGATACCAAAGAATAGGTGCAGACGAAAGCACGTGATGGGTCTGCCAAAGGAAA--GCAGACTTCT
II	---ATGCA TCTTC---GACCGCCGCAAGTGIGATGGATATCTGCGAATTT---CGCTTAAGCACTGATGGGTCTGCCAAAAGAAAACGAGACTTCT
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	CGATACAGGATCTTTGGGAGATTTTGATGCTGATCAAGATACCAAAGAATAGGTGCAGACGAAAGCACGTGATGGGTCTGCCAA--GGAAA--GCAGACTTCT
VII	-----
I	AATAT--CGCCGAAAACGTGGAGATGTCGGACGTAGACGC--GTCGACGACGTGGTGGATAATGCCAAATACGATCATCCT--ACCCAACGGAG--ACGAGACAA
II	AATATTCGCCGAAAACGTTSAGATGTCGGACGTAGACGC--GTCCGACGACGTGGTGGATAATGG--AATACGATCATCCT--ACCCAACGGAG--ACGAGACAA
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	AATATTCGCCGAAAACGT--GAGACGTCCGACGTAGACGCCTTTCGACGACGTGGTGGATAATGCCAAATACGATCATCCTTACCCA CCGGAG GACGAAACAA
VII	-----

Abbildung 7.2.1.2c

I	ACAGCACAGACACGAGGTTTCAGAGGCGAGAGCAAAATCGCTTCGAA
II	AAATGCGAGCGGGAACAATAATGGCAATTAAGGACTCAAGCACAACCTCCTGATGCCCA
III	AAATGCGCTTCGAA
IV	GAATGCGAGCGGGAACAATAATGGCAATTAAGGACTCAAGCACAACCTCCTGATGCCCA
V	-----
VI	ACAGC - CAGAC TCGA A
VII	-----
I	CGGCTAATGTTTCGACTCAGGATGTTGTTCAACCTACACCACCAAGCCACCTACITCGAAGCGGATACGAGCAATGATCAAGCGGATATTCTGGCCAAAT
II	CGGCTAATGTTTCGACTCAGGATGTTGTTCAACCTACACCACCAAGCCACCTACITCGAAGCGGATACGAGCAATGATCAAGCGGATATTCTGGCCCAAT
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	-----
VII	-----
I	GGAGGCCATTCGGTATTACTAAAGGACTTTCAGCCGGAAGGCACITAGCCTCATCCAAGGAGCGGATGCTAIGTCAACTTTAGCCAAAGAGCTTAGTCAGA
II	GGAGGCCATTCGGTATTACTAAAGGACTTTCAGCCGGAAGGCACITAGCCTCATCCAAGGAGCGGATGCTAIGTCAACTTTAGCCAAAGAGCTTAGTCAGA
III	-----
IV	-----
V	-----
VI	-----
VII	-----
I	TGGATGATGAAGAACCTTAGAGGTCTTTGGAGCAGATTTCAAGAGCGCTACCA
II	TGGATGATGAAGAACCTTAGAGGTCTTTGGAGCAGATTTCAAGAGCGCTACCA
III	CGGAAGTTGTCAGCGGATGTCATTTGTCGCCAGTCCATCGAAGGCTAAGAA
IV	CGGAAGTTGTCAGCGGATGTCATTTGTCGCCAGTCCATCGAAGGCTAAGAA
V	-----
VI	-----
VII	-----

Abbildung 7.2.1.2d

I	AGGCAAAGCCGAAGAAGAAAGGGGGAGGGGGCTGAATCGAATAATCTGTGCAATCTTGTGATCATAGACAATTTACTGGTTTCGTTTTACAGGGCGTTTAG
II	AGGCAAAGCCGAAGAAGAAAGGGGGAGGGGGCTGAATCGAATAATCTGTGCAATCTTGTGATCATAGACAATTTACTGGTTTCGTTTTACAGGGCGTTTAG
III	
IV	
V	
VI	
VII	
I	TGTGGGAGTTTCAAATGGGCCAGCCATCGACAGGCTGCCCAAGGAGGCCAACAI CGGGACAAGGTTTCATAGTTTTAGCACGCATATCTTTCGATTTTATC
II	TGTGGGAGTTTCAAATGGGCCAGCCATCGACAGGCTGCCCAAGGAGGCCAACAI CGGGACAAGGTTTCATAGTTTTAGCACGCATATCTTTCGATTTTATC
III	
IV	
V	
VI	
VII	
I	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTCCCTT--AAATTTACCGAGATTCACCAAGATGTAGCA
II	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTTATAGTACATCG--TATATACA
III	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTTATAGTACATCG--TATATACA
IV	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTTATAGTACATCG--TATATACA
V	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTTATAGTACATCG--TATATACA
VI	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTTATAGTACATCG--TATATACA
VII	TTAATGCTCGCTCGAATTCATCTGTGTGACGCCAAA--GAA TGCATAGCTTGC AAGACTTCTTCCCTTATAGTACATCG--TATATACA
I	TTCTTTGGTTCGATTTAGTAA TGCTCCGCTTTGATTACCTCATCAAAATCTGCCACATAAATTAA TCAAC 5537
II	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 1020
III	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 1020
IV	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 53
V	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 24
VI	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 24
VII	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 1100
	CTCCA---CGATGTCGAAA---CTA---TACTTCTTGAACAAAGCCGAT---TCAG 33

Abbildung 7.2.1.2e

I	KSDAEGVAVT-GTGSVGRVEYDMDEQDDKWLAEAYNADRRASSWEPITREFEIITIKIKEWHALEKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEPQ-A
II	PVDGEANTII-GNIGVGRVEYDMDEQDAKWLLEIYNARREGEFEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEHAGP
III	PVDGJANAII-GNIGVGRVEYDMDEQDAKWLLEIYNARREGEFEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEHTGP
IV	TSEGEVNA-----SVGRVEYDMDEQDEKWLLEIYNARREGELEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEITAP
V	TSEGEVNA-----SVGRVEYDMDEQDEKWLLEIYNARREGELEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEITAP
VI	PAEGITGPPI-PNADVGRVEYDMDEQDAKWLLEIYNARREGEFEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGENPFS
VII	TDGDTNAA-I-GSLVGRVEYDMDEQDEKWLLEIYNARREGELEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEPTVD
VIII	GTEEPNTI-----SVGRVEYDMDEQDEKWLLEIYNARREGELEPIKPAVFEITMTIKIEKWAHALKRIKPNPKPPQTHRRPRSSSSAAAVNGEITGP
IX	KSAIQKFAISPNLVNFKPQYDMDEQDELHLHYLNKRYFKDQ---MSHEITFEIILMTLEIWFHLEKHHIPSTNLSLIARHNILRDKKNYELYGSDDDGT
I	GEEDSKCAICDDGDCENINAVIFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRGIFVRCPSLNVKLTNNMQTCIFCPNTDGAFKQTNASKWA
II	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
III	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
IV	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
V	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
VI	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
VII	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
VIII	GEEDSKCAICDDGDCENANAIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
IX	GLSMDQACAVCLGTDSDNLTIVFCDGCDLAVHQECYGVPIPEGQWLCRKCQLIGRSP---SCIFCPNTEGAFKQNTSKWS
I	HLLCAWIPEVSGNHIFMEPVMVEVEKVPKTRWKLTCYICNORMGTCIQGNKSCQAHFVTCARRARLEKAMNNHGLLAVLGD---ITVLLKAFCD
II	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
III	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
IV	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
V	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
VI	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
VII	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
VIII	HLLCAWIPEVSGNPSLMEPVMVEVEKVPNRWKLTCYICRQKMGACIQCSNKNCFVAFHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
IX	HNLICALLWPELIFYSNLHYMEPIEGVQNVSVSRWKLNCYICRQKMGACIQCFORNCFTAVHVTCAARRARLILKMKLIPGAPVME---SSSLKAFCD
I	KHCPDYAKONDVARATRDARSEYKRTMRGRLLWADSQAALAMAAATHRHAVTEHQPDESQLTGAKVALTADSKKKGNOQPKPWWKLPSPGAPVIPKY
II	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
III	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
IV	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
V	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
VI	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
VII	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
VIII	KHVPDWRREHNTDAATAEALEYRNTMQRRWGDSSQAALALGIDSQDGIIPAGEDNRAITPRITLIVGNNRKL--RILPKTIWKLPSGAPVIPQV
IX	KHAFPRGQ-----IS-----IEGINKARKYFLLSLLQETETFOHNE-----A-----NDRINS---KFNKTIWKLTPNQTPVAPHV

Abbildung 7.2.2.1b

I	VQPTPTPPTSMGDTISNDQA	---	DILANGGIPYLIKDFQPEGTS	LIQ	---	GADAMSTFSEELS	EMDDEEIRGLGADFKS	ATTEVVSDVIVASPSKA	KKG
II	QMVSPASPASNLAGKEL	---	PLSQGGIQWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GREVLRGM	SEELS	IEGEDELRNIVGDE	EAPYVSDFPPIAG	PEVCPSCDVA
III	RDGRMASPTSPVSPAD	SLGSKDPLPLSLGGI	QWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GREVLRGM	SEELS	IEGEDELRNIVGDE	PPDYAPDLLS	VPSTNRVVDIP
IV	LAQPTESQKGLTTPPS	FQGDPLHPLSQGGI	LWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GRDVMRGM	SEELS	ELDEDEIKDLVD	DEMEGNS	APDTAAASASDAPTS
V	LAQPAESQKGLTTPPS	FQGDPLHPLSQGGI	LWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GRDVMRGM	SEELS	ELDEDEIKDLVD	DEMEGNS	APDTAAASASDAPTS
VI	LQIPGDEITPTTPPAS	FSGGQQLPLA	GGIQWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GREVLRGM	SEELS	DIJEEELRLAC	NDGVFGLATH	QODIASTAMGE
VII	GHAIRAAARGPLTP	PLSSQGDQQLPLA	GGIQWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GRDVMRGM	SEELS	ELDEDEIKDLVD	ESKDEIKGEPDKVN	EAPFPANV
VIII	ADQFTEPQKEFLTP	PLSFKGDQQLPLA	GGIQWYMQPFDPI	GTIVHEERWT	GRDVMRGM	SEELS	ELDEDEIKDLVD	LESEMGTAIE	CSIDRPAAPE
IX									
I	KAKK	KGRR	---						1210
II	KDTAAAGAL	KPKTHK	TRRRWK	GFKR	---				1153
III	ADA	VADAL	KPKTHK	TRRRWK	GFKR	---			1153
IV	ETAVK	VHRT	RRRWRG	FK	---				1205
V	AVK	VHRT	RRRWRG	FK	---				1202
VI	EAP	PKTHK	TRRWE	GFR	---				1164
VII	RR	RRR	R	GFR	---				1141
VIII	QAV	VYR	RRR	WRG	FK	---			1184
IX									748

Abbildung 7.2.2.1d

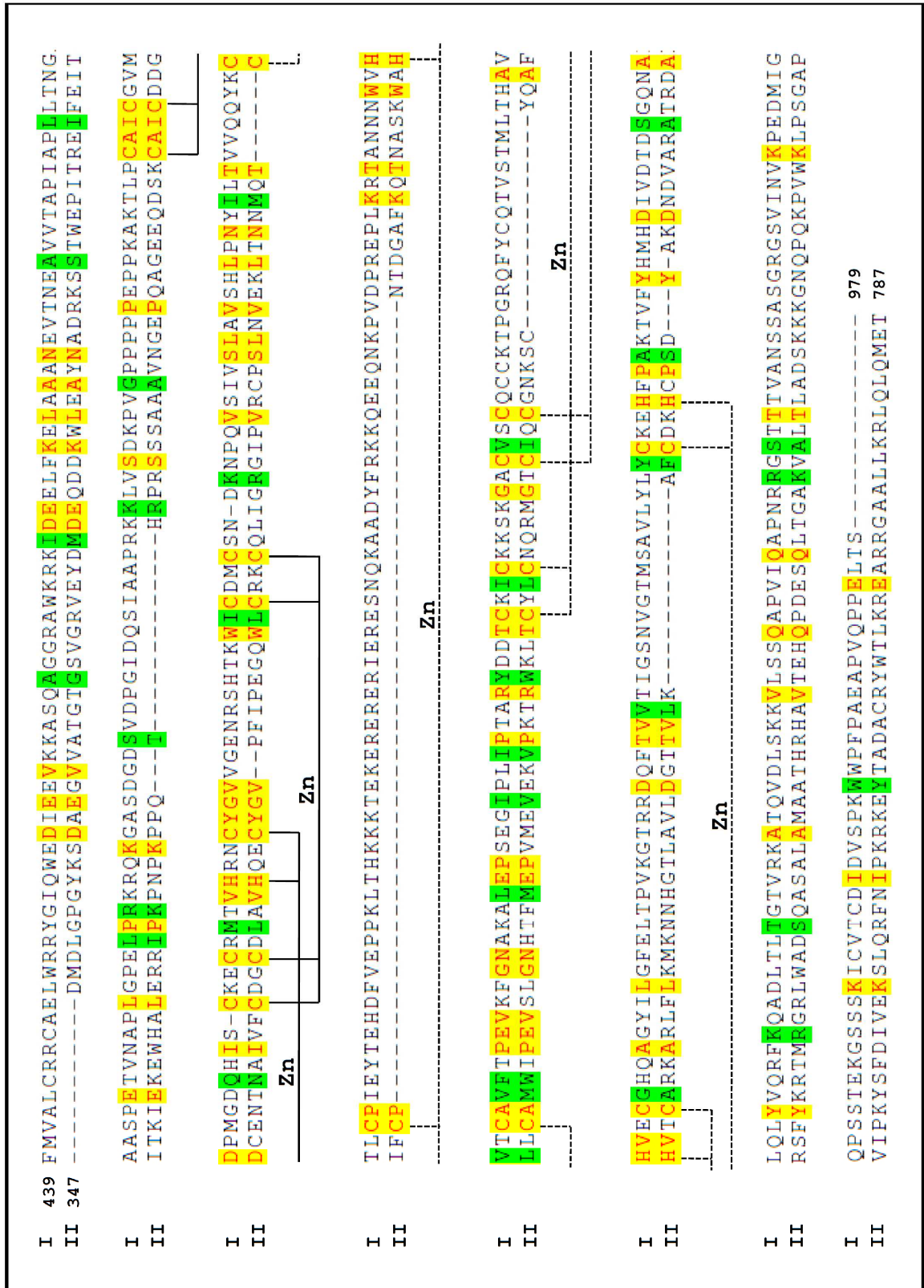


Abbildung 7.2.2.3

901	TCGTCAGTGA TCTCATATAG ATAAAGCGGA ACTACTATAA TTGCAACAATG AGAAGTCGAA ATACCTCTCA CAAACAACAA GATACTATGC CTCGAAGAGT AGCAGTCACT AGAGTATATC TAITTCGCT TGAIGATAIT AACGTTGTAC TCTCAGCTT TAIGGAGATT GTTTGTGT TAIGATACG GAGCTTCTCA	Met Asp Tyr Ser Arg Asn Thr Arg Leu Gln Arg
+3		
1001	GCCTCGAAGA GGCTCGAAGA GGATGTAACG CTAGTCGIGA TTCGGGAAT AGAAGCCAGA AGTTTATG GATTACICCC GTAATACTAG ATTGCACAGA CGGAGCTTCT CCGAGCTTCT CCTACATTGC GATCAGCACI AAGCCCTTTA TCTTCGGTCT TCAAACTAC CTAATGAGGS CATTATGAIC TAACGTCTCT	Glu Arg Tyr Lys Phe Gln Val Ser Ile Glu Arg Asp Thr Cys Thr Glu Tyr Lys Arg Ala Arg Leu Arg Glu Tyr Ile Ser Ala Lys Leu Leu Le
+3		
1101	CAGCGATGGA AATTCAAGT GTCAATTGAA AGAGACACCT GCACAGAGTA TAAGCGGGCT CCGTTCCGTG AGCGATACCT CATATCTGCC AAGCTTTTGC GTCGCTACCT TTAAGTTCA CAGTTAACTT TCTCTGTGGA CGTGTCTCAT ATTGCCCCGA CGGAACGCAC TCGCTAIGGA GTATAGACGG TTCGAAAACG	BamHI Met Leu Asp Pro Glu Arg Leu Ala Thr Asp Tyr Arg Thr Phe Ala His Gln Trp
+3		
+1		
1201	TATCATGIGA TCTGCTTAGC AAGTTACATA CCCCTGTCCT GGCTGTACAT GTTGGATCCG GAACGTCCTCG CGACTGACTA CAGAACGTTT GCTCATCAGT ATAGTACACT AGACGAATCG TTCAATGTAT GGGACACAGG CCGACATCTA CAACCTAGGA CTTCGACAGC GCTGACTGAT GTCTTGCAAA CGAGTAGTCA	Met Leu Asp Pro Glu Arg Leu Ala Thr Asp Tyr Arg Thr Phe Ala His Gln Trp
+1		
1301	GGTACTGCGA GCTCATGTTT AGCACGTTGT TCGAGTAGAC GGCTCAGATC AACTCGTCTT CAACCTGGGG TCACGGGTCA AGCGGACAA CTTCATCGGC CCATGACGCT CGAGTACAAG TCGTGAACA AGCTCATCIG CCGAGTCTAG TTGAGCAGGA GTTGGACGCC AGTGGCGAGT TCGCGCTGTT GAAGTAGCCC	Met Arg Leu Thr Gln Tyr Pro Gly Ser Asp Leu Ala Pro His Pro
+2		
1401	TCCTTCCAT GCGCTTAACT CAATACCCTG GCAGCGACCT TGCACCTCAC CCCTAGGCTT CCACGGCCCG AACCCACTA GAATCCGTTT AACTTTCGAC AGGAAGGCTA CGCGAATTGA GTTATGGGCC CGTCGCTGGA ACGTGGAGTG GGGATCCAGA GGTGGCCGGC TTGGGGTGT CTTAGGCAAG TTGAAAGCTG	Met Ala Thr Leu Pro Ser Thr Pro Arg Arg Pro Ala Ser Ser Arg Ile Arg Thr Thr Leu Pro Arg Ser Val
+2		
1501	AGATTGCCA TACCGATTGC AGAAGACGAT GGCCACICIG CTTTCCACAC CCCGCCGACC TCGTCCAGC AGAATACGTA CAACCCCTACC ACGATCAGTC TCTAACGGGT ATGGTAACG TCTTCTGCTA CCGGTGAGAC GGAAGGTGTG GGGCGGCTGG ACGCAGGTCTG TCTTAIGCAT GTTGGGATGG TGCTAGTCTAG	Gly Ser Val Gln Ser Asp Lys Pro Thr Leu Ala Ile Thr Ala Ser Glu Pro Pro Arg Lys Arg Ser Glu Pro Ala Arg Lys Arg Arg Lys Tyr Ile Pro Gln
+2		
1601	GGTTCAGTCC AATCTGACAA ACCTACCCCTT GCAATTTACTG CTTCCGAACC ACCCGGTAAA AGAAGCGAGC CTGCTCGAAA GAGAAGAAAA TACATCCCAG CCAGTCAAG TTAGACTGTT TGGATGGGAA CGTTAATGAC GAAGGCTTGG TGCGGCATTT TCTTCGCTCG GACGAGCITT CTCTTCTTTT ATGTAGGGTC	

Abbildung 7.2.3

7.3 Verwendete Vektoren

7.3.1 Klonierungsvektoren

Abbildung 7.3.1.1: Schematische Darstellung des TA-Klonierungsvektors pCR[®]2.1-TOPO[®] (Invitrogen).

Der Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] (3931 bp) wird für die TA-Klonierung von PCR-Fragmenten mit anschließender *E. coli*-Blau-Weiß-Selektion verwendet. Die PCR-Fragmente werden über ihre Adenin-Überhänge am 5'- bzw. 3'-Ende in die kodierende Sequenz des *LACZ- α* -Gens (*L*) kloniert und können mittels *EcoRI*-Restriktion (*ERI*) für nächste Klonierungsschritte weiterverwendet werden. Die Unterbrechung der kodierenden Sequenz des *LACZ α* -Gens verhindert eine Umsetzung von X-GAL in den Agarplatten und damit eine Blaufärbung der Kolonien. Weiße Kolonien enthalten ein DNA-Fragment. Der Vektor enthält zusätzlich eine Ampicillin- (*A*) sowie eine Kanamycin-Resistenzkassette (*K*) zur Selektion der positiven Transformanden.

pUC ori – Replikationsursprung eines bakteriellen pUC-Plasmids

F1 ori – Replikationsursprung des Bakteriophagen F1

Abbildung 7.3.1.2: Schematische Darstellung des Klonierungsvektors pJET1.2/blunt (MBI Fermentas).

Der Vektor pJET1.2/blunt (2974 bp) wird für die Klonierung von PCR-Fragmenten ohne geeignete Adenin-Überhänge (*blunt-end*) verwendet. PCR-Fragmente werden in die kodierende Sequenz des *eco47IR*-Gens kloniert, dessen Genprodukt für *E. coli* letal ist. Überlebende Kolonien enthalten folglich ein DNA-Fragment. Das *eco47IR*-Gen wird unter der Kontrolle eines P_{lac}-Promotors exprimiert (P_{lacUV5}). Die *in-vitro*-Transkription des klonierten DNA-Fragments erfolgt über einen T7-Promotor (P_{T7}). Positive Transformanden werden durch Ampicillin-Resistenz selektiert (*A*).

Rep – Replicon des pMBI-Plasmids für die Replikation des pJET1.2-Plasmids

7.3.2 Binäre Vektoren

Abbildung 7.3.2.1: Schematische Darstellung des binären Vektors pPZP200 (Hajdukiewicz, 1994).

Das Plasmid (6741 bp) dient als Ausgangsvektor für die Klonierung von Konstrukten, die für die Agrobakterien-vermittelte Transfektion verwendet werden. Neben rechter und linker Bordersequenz (RB bzw. LB) enthält es Sequenzen der Vektoren pBR322 (Bolivar *et al.*, 1977; Watson, 1988) und pVS1 (Bissonnette & Roy, 1992) sowie eine Spectinomycin-Resistenzkassette (*S*).

Abbildung 7.3.2.2: Schematische Darstellung des binären Vektorkonstrukts pRcEGFP1.

Als Ausgangsvektor für pRcEGFP1 (12859 bp) diente pPZP200. Zwischen rechter und linker Bordersequenz (RB bzw. LB) wurden die kodierenden Sequenzen für *EGFP* (*EG*) und Hygromycin-B-Phosphotransferase (*H*; jeweils unter der Kontrolle der Promotor- (P) und Terminator-Sequenzen (T) des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens bzw. *TRPC*-Gens aus *A. nidulans* (P_{gpd} , T_{trpC})) sowie eine Ampicillin-Resistenzkassette (*A*) kloniert.

S – Spectinomycin-Resistenzkassette

Abbildung 7.3.2.3: Schematische Darstellung des binären Vektors pZPtk8.10 (Gardiner & Howlett, 2004).

Der binäre Vektor pZPtk8.10 (11497 bp) wurde konstruiert, um beim Screening nach Deletionsmutanten die Zahl an Transformanten ohne homologe Rekombination zu reduzieren. Dazu wurde zwischen rechter und linker Border (RB bzw. LB) die kodierenden Sequenzen des Thymidinkinase-Gens (*TK*) in *sense* und *antisense*-Richtung jeweils unter der Kontrolle des *TRPC*-Promotors (P) sowie –Terminators (T) aus *A. nidulans* kloniert. Die Thymidinkinase setzt Thymidin-Analoga in für den jeweiligen Pilz toxische Verbindungen um. Das gewünschte Deletionskonstrukt wird in die *multiple cloning site* (MCS) des Vektors kloniert. Bei einer homologen Rekombination werden die Thymidinkinase-Kassetten nicht mit übertragen und die Transformanten überleben im Gegensatz zu heterologen Transformanten.

K – Kanamycin-Resistenzkassette

5'- bzw. 3'-*L* – 5'- bzw. 3'-*LACZ*-Gensequenz

7.3.3 Expressionsvektoren

Abbildung 7.3.3.1: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAN7-1 (Punt, 1987).

Der Vektor pAN7-1 (6756 bp) enthält Sequenzen des pUC18-Plasmids (pUC18; Lin-Chao *et al.*, 1992; Helmer-Citterich *et al.*, 1988; Yanisch-Perron *et al.*, 1985) sowie die kodierende Sequenz des Hygromycin-B-Phosphotransferasegens (*H*) unter der Kontrolle der Promotor- (P) sowie Terminatorsequenzen (T) des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens bzw. *TRPC*-Gens aus *A. nidulans* (P_{gpd} , T_{trpC}).

Abbildung 7.3.3.2: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAN8-1 (Mattern, 1988).

Der Vektor pAN8-1 (6089 bp) enthält eine Ampicillin-Resistenzkassette (*A*) sowie die kodierende Sequenz des Phleomycingens (*b*) unter der Kontrolle der Promotor- (P) sowie Terminatorsequenzen (T) des Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenasegens bzw. *TRPC*-Gens aus *A. nidulans* (P_{gpd} , T_{trpC}).

ori – Replikationsursprung

ERI – *EcoRI*

BII – *BglII*

PI – *PstI*

Abbildung 7.3.3.3: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pAB8-1.

Der Vektor pAB8-1 wurde aus dem Vektor pAN8-1 (Mattern, 1988) durch Einführung einer *multiple cloning site* generiert (Böttcher & Knogge, unveröffentlichte Daten).

ERI – *EcoRI*

BHI – *BamHI*

MI – *NotI*

SII – *SacII*

HIII – *HindIII*

SI – *SpeI*

AI – *ApaI*

BII – *BglII*

PI – *PstI*

Abbildung 7.3.3.4: Schematische Darstellung des REMI-Komplementationsvektors pAN8-1-WT16bis-WT17 (Albert & Knogge, unveröffentlichte Daten).

Der REMI-Komplementationsvektor (10985 bp) wurde durch Klonierung der 4,9 kb langen *PFPI*-Gensequenz (bez. als WT16bis/WT17) in die *EcoRI*-Restriktionsstelle des pAN8-1-Vektors generiert.

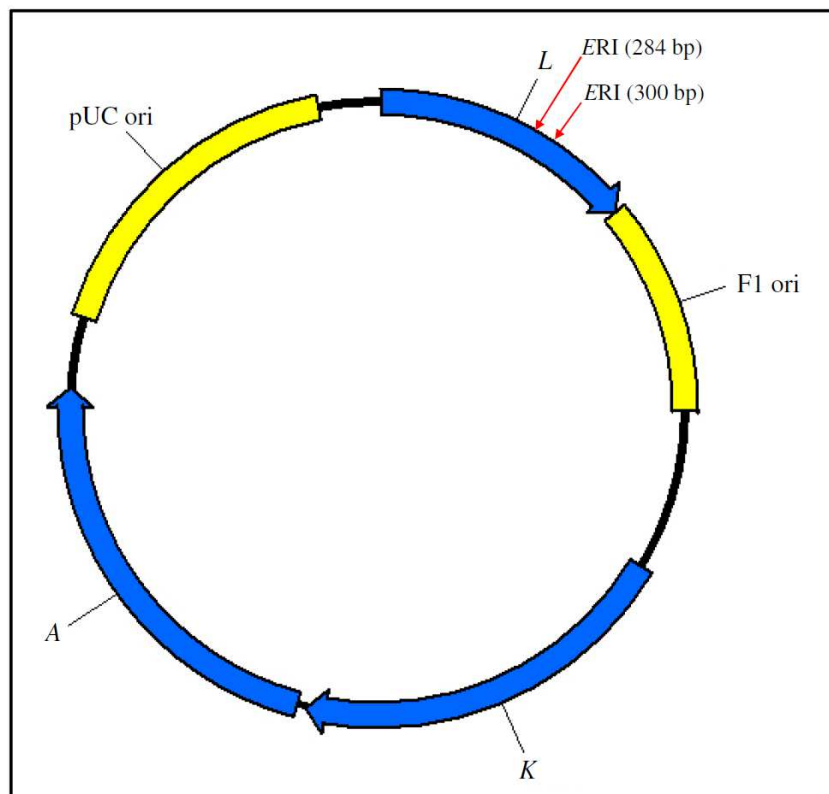


Abbildung 7.3.1.1

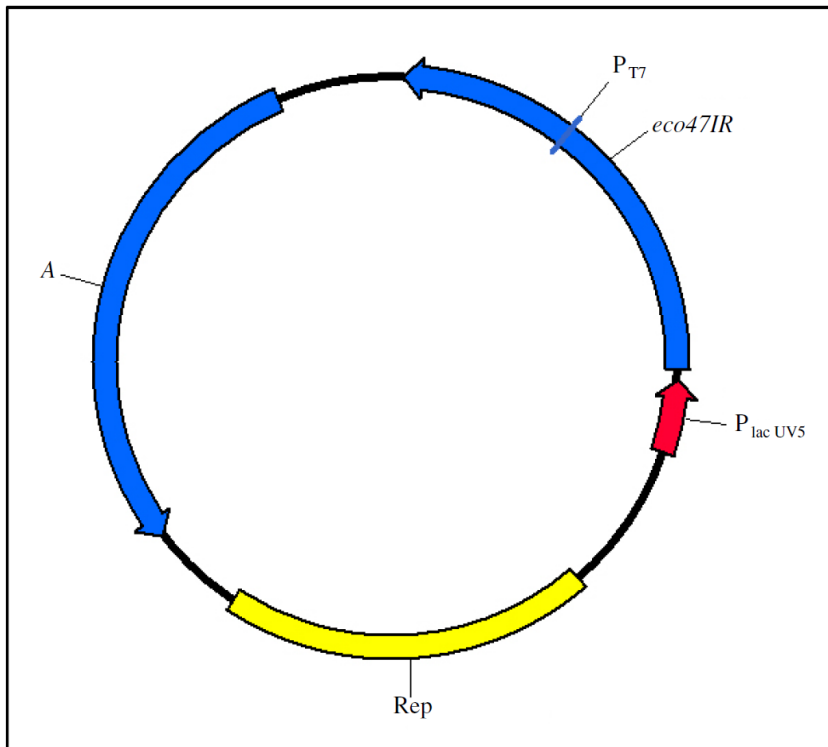


Abbildung 7.3.1.2

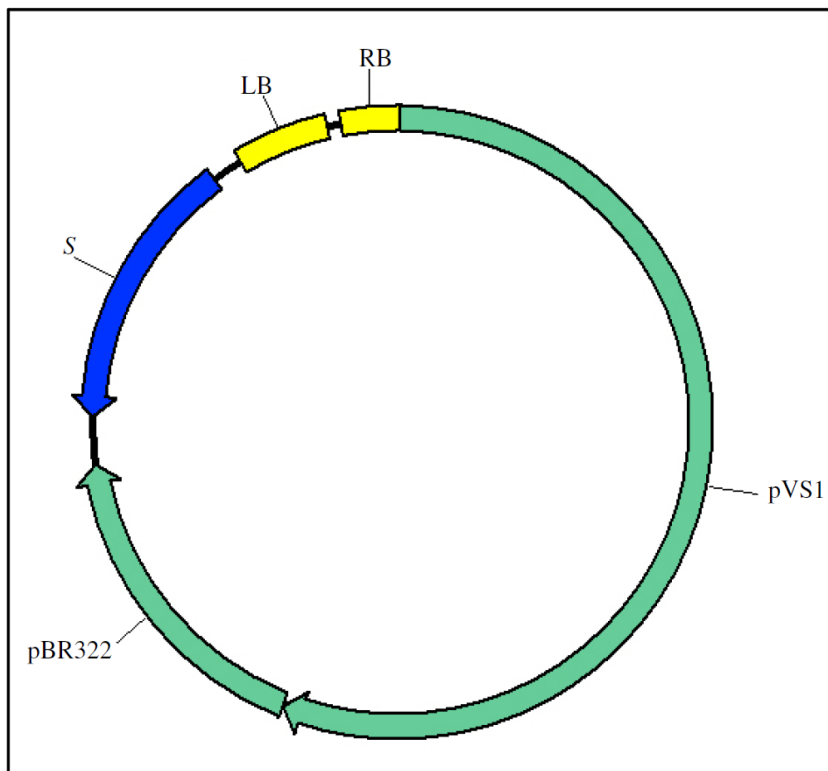


Abbildung 7.3.2.1

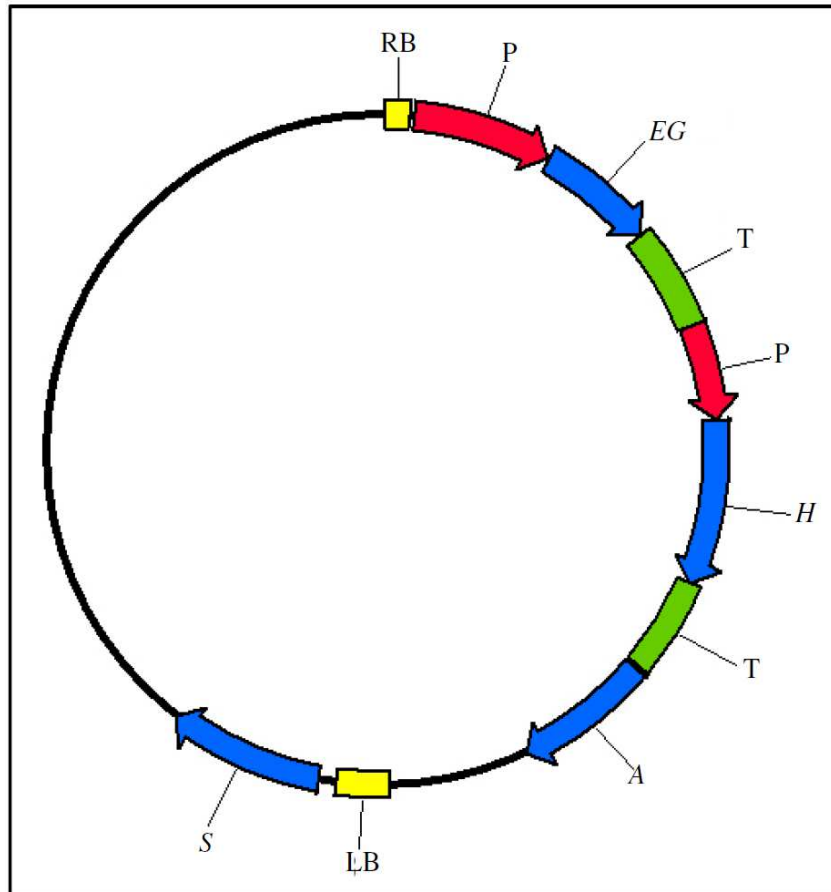


Abbildung 7.3.2.2

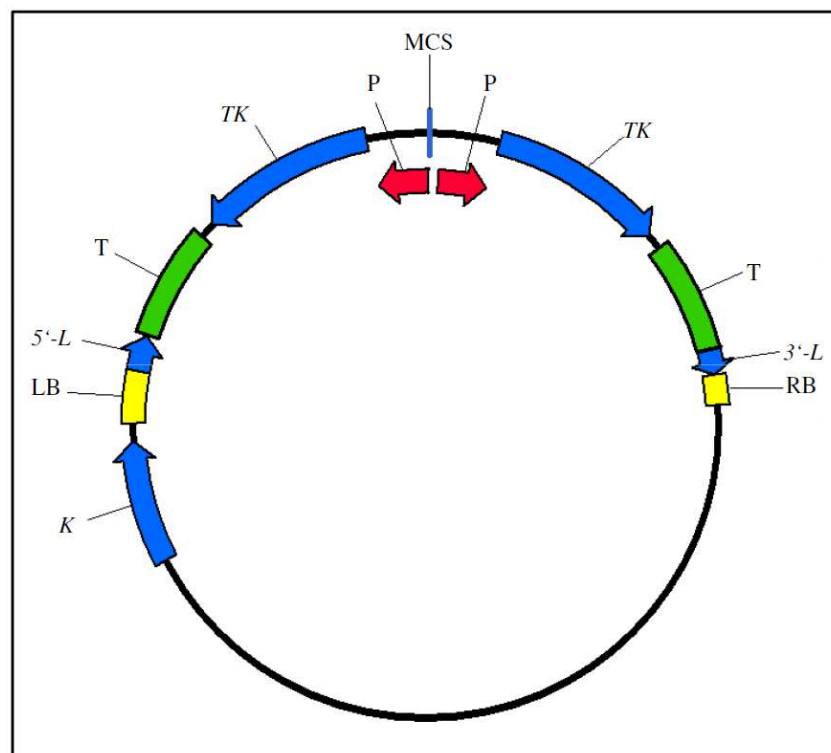


Abbildung 7.3.2.3

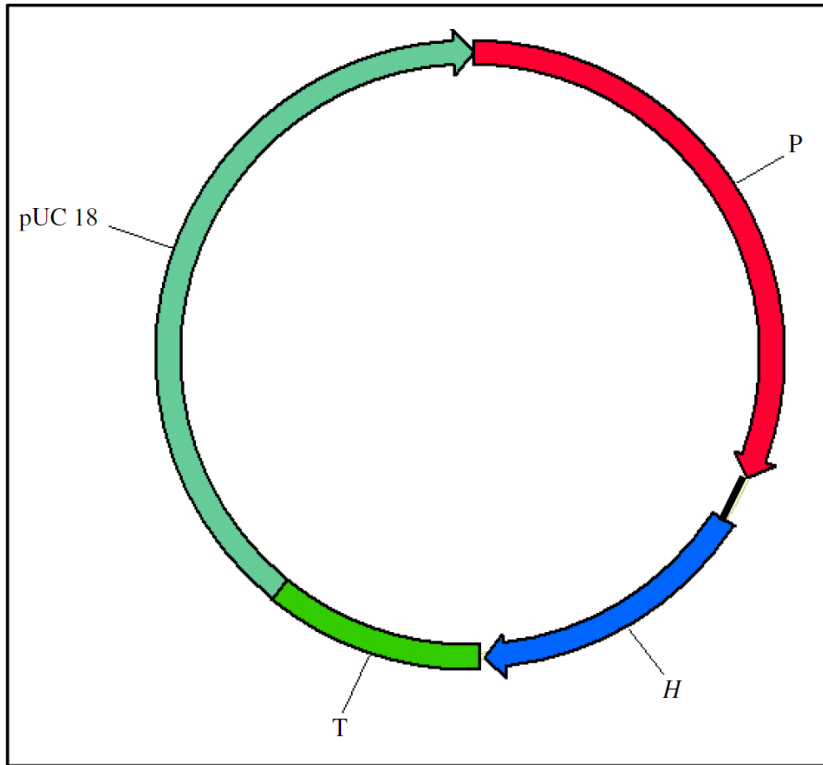


Abbildung 7.3.3.1

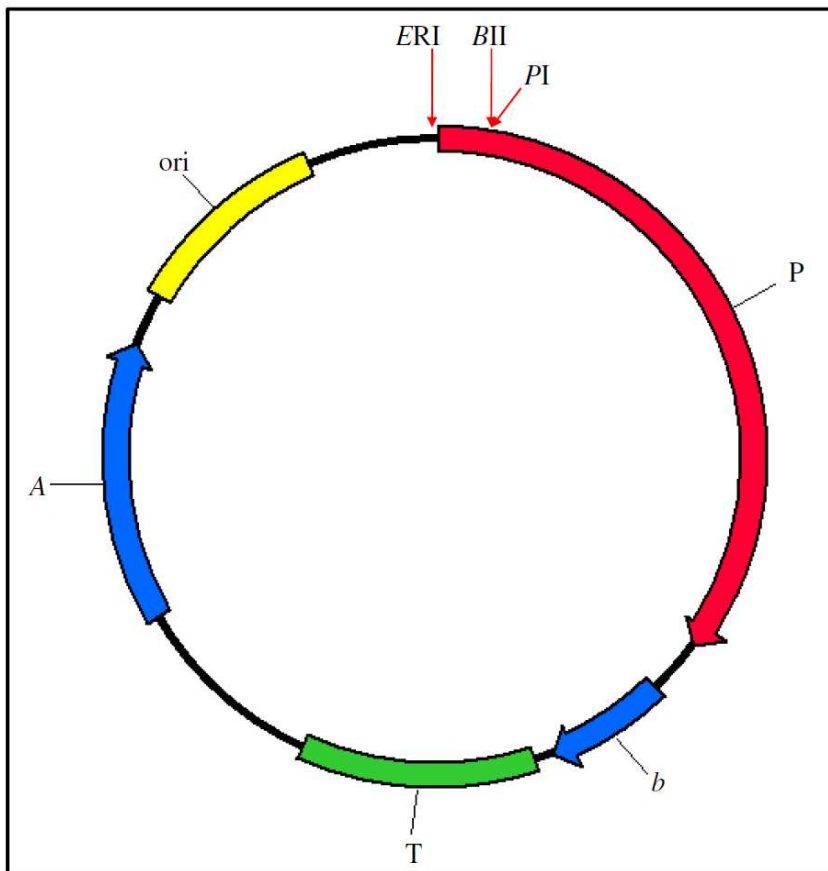


Abbildung 7.3.3.2

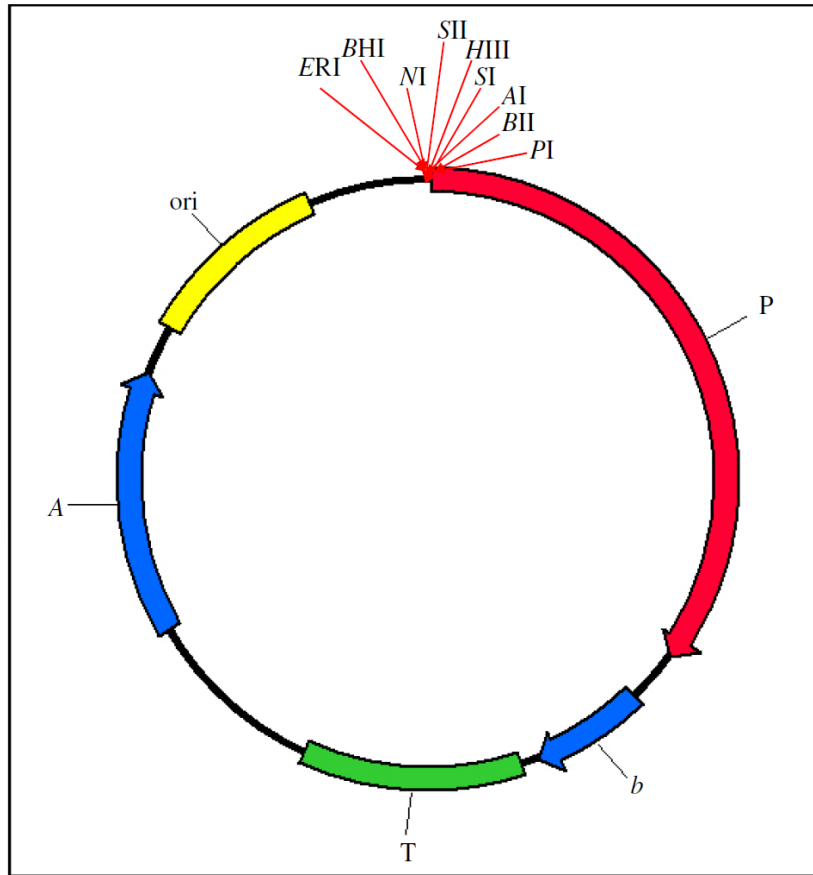


Abbildung 7.3.3.3

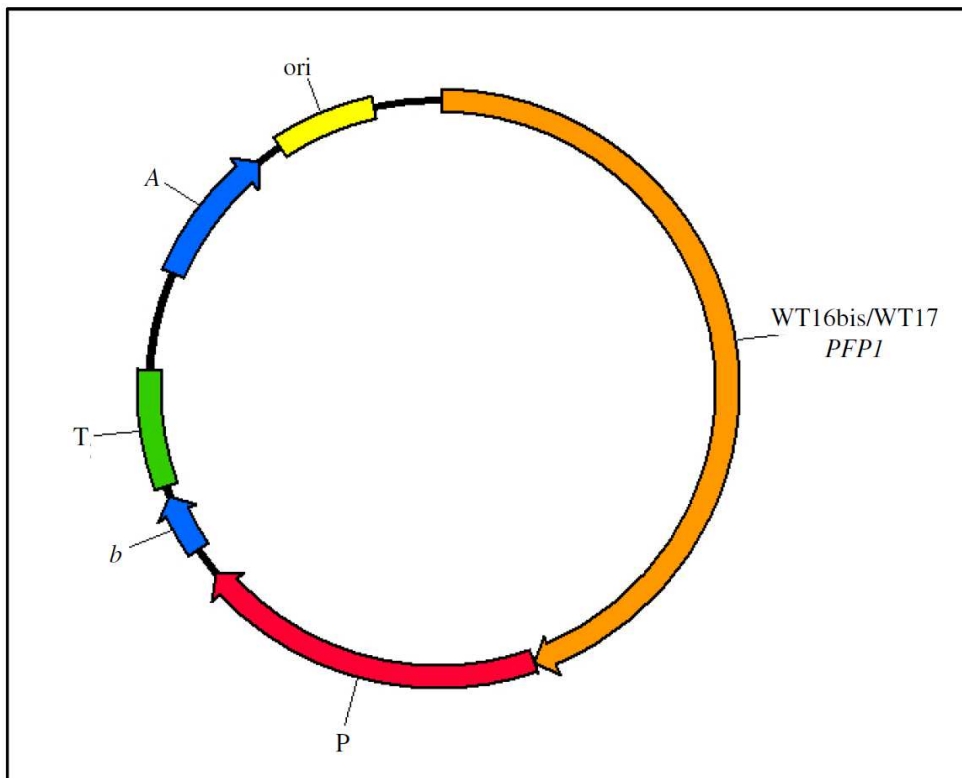


Abbildung 7.3.3.4

7.4 Klonierungen und Restriktionen

7.4.1 Lokalisierungsstudien

Abbildung 7.4.1.1: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pPZPtk8.10-Pfp1_N::eGfp sowie dessen Restriktion.

Die Teilabbildung 7.4.1.1A zeigt die Klonierungsstrategie zur Generierung des Vektor-Konstrukts pPZPtk8.10-Pfp1_N::eGfp. Die für die Klonierung erforderlichen Einzelfragmente (P_{gpd} , *PFPI-5'*₁₋₃₀₃, *EGFP* und *HPH*) wurden durch PCR aus den Ausgangsvektoren pAN7-1 und pRcEGFP1 sowie aus genomischer DNA des *R.-commune*-Wildtyp-Isolats UK7 mit den Oligonukleotiden O1s bis O8as amplifiziert. Alle PCR-Fragmente wurden in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert und anschließend durch Verwendung der angegebenen Restriktionsstellen zusammengefügt (*SmaI* (*Sml*); *XhoI* (*XI*); *ClaI* (*CI*); *AgeI* (*AI*)). Das so entstandene Vektor-Konstrukt pCR2.1-Pfp_N::eGfp diente als Ausgangsvektor für den finalen Klonierungsschritt, über den das gesamte Fusionskonstrukt in den binären Vektor pPZPtk8.10 kloniert wurde (*HindIII* (*HIII*)/*XhoI* (*XI*)).

Die Teilabbildung 7.4.1.1B zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Restriktion des Zwischenprodukts pCR2.1-Pfp_N::eGfp (V1) mit dem Enzym *AgeI* (*AI*). Die Restriktionsfragmente entsprechen den erwarteten Größen (6828 bp, 1368 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

In Teilabbildung 7.4.1.1C ist die elektrophoretische Auftrennung der Restriktion des Vektor-Konstrukts pPZPtk8.10-Pfp1_N::eGfp (V2) mit den Enzymen *XhoI* (*XI*) und *HindIII* (*HIII*) gezeigt. Die Restriktionsfragmente entsprechen den erwarteten Größen (11641 bp, 4365 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

O1s und O2as – GFP-Fus-gpd1s und GFP-Fus-gpd2as (#26/#27); O3s und O4as – GFP-Fus-PFP1s und GFP-Fus-PFP2-2as2 (#30/#31); O5s und O6as – GFP-Fus-GFP1-2 und GFP-Fus-GFP2-2 (#24/#25); O7s und O8as – GFP-Fus-HPH1-2 und GFP-Fus-HPH2 (#28/#29)

Abbildung 7.4.1.2: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pRcEGFP1-eGfp::Pfp1_C sowie dessen Restriktion.

In Teilabbildung 7.4.1.2A ist die Klonierungsstrategie zur Generierung des Vektor-Konstrukts pRcEGFP1-eGfp::Pfp1_C dargestellt. Das für das carboxy-terminale Fusionskonstrukt erforderliche *PFPI-3'*-Fragment (3517-3630 bp) wurde mit den Oligonukleotiden O1s und O2as aus genomischer DNA von UK7 amplifiziert und in den Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert. Durch Verwendung der angegebenen Restriktionsschnittstellen (*BsrGI*, *BGI*) wurde das *PFPI-3'*-Fragment anschließend in den Vektor pRcEGFP1 kloniert.

Teilabbildung 7.4.1.2B zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Restriktion des Vektor-Konstrukts pRcEGFP1-eGfp::Pfp1_C mit dem Enzym *AfeI* (*Afi*). Die Restriktionsfragmente entsprechen den erwarteten Größen (12224 bp, 754 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

O1s und O2as – NLS-Fus1s und NLS-Fus2as (#42/#43)

7.4.2 Promotorfusionsstudien

Abbildung 7.4.2: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pJET2.1/blunt-P_{PFPI}::eGfp sowie dessen Restriktion.

In Teilabbildung 7.4.2A ist die Klonierung des Vektor-Konstrukts pJET2.1/blunt-P_{PFPI}::eGfp dargestellt. Der gesamte 5'-untranslatierte Bereich der *PFPI*-Gensequenz (P_{PFPI}, 1-1528 bp) sowie die *EGFP*- und *HPH*-Kassette wurden mit den Oligonukleotiden O1s und O2as bzw. O3s und O4as amplifiziert und jeweils im Vektor pJET1.2/blunt zwischenkloniert. Durch Restriktion mit dem Enzym *XhoI* (XI) wurde das *PFPI*-Promotor-Fragment schließlich zusammen mit der *EGFP*-Gensequenz sowie der *HPH*-Resistenzkassette in den Vektor pJET2.1/blunt kloniert.

Teilabbildung 7.4.2B zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionen des Vektor-Konstrukts pJET1.2/blunt-P_{PFPI}::eGfp mit den Enzymen *ScaI* (SI, Spur 1) und *HindIII* (HIII, Spur 2). Die Restriktionsfragmente entsprechen den erwarteten Größen (*ScaI* – 4249 bp, 2767 bp, 1083 bp; *HindIII* – 4201 bp, 3441 bp, 457 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

O2s und O2as – PFP43s und PFP44as (#66/#67); O3s und O4as – Prom-Fus1s und Prom-Fus2as (#74/#75).

7.4.3 Agrobakterium-vermittelte Transfektion (ATMT)

Abbildung 7.4.3: Schematische Darstellung der Klonierung des binären Vektor-Konstrukts pSS2(ble) sowie dessen Restriktion.

Teilabbildung 7.4.3A zeigt die Klonierungsstrategie zur Generierung des binären Vektorkonstrukts pSS2(ble). Sowohl die Phleomycin-Resistenzkassette als auch die *EGFP*-Kassette wurde aus den Ausgangsvektoren pAB8-1 und RcEGFP1 mit den Oligonukleotiden O1s und O2as bzw. O3s und O4as amplifiziert und jeweils im Vektor pCR[®]2.1-TOPO[®] zwischenkloniert. Durch Restriktion mit den angegebenen Enzymen (*SacI/XbaI* (*Sal/XbI*); *HindIII* (*HIII*)) wurden schließlich beide Fragmente in den binären Vektor pPZP200 kloniert. Das so entstandene Konstrukt wurde als pSS2(ble) bezeichnet.

Teilabbildung 7.4.3B zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionen des Vektor-Konstrukts pSS2(ble) mit den Enzymen *SpeI* und *XbaI* (*SpI, XbI*; Spur 1), *SpeI* und *PstI* (*SpI, PI*; Spur 2), *SpeI* und *HindIII* (*SpI, HIII*; Spur 3) sowie *SpeI* und *ApaI* (*SpI, ApI*; Spur 4). Die Restriktionsfragmente entsprechen den erwarteten Größen (*SpeI* und *XbaI* – 2035 bp, 9011 bp; *SpeI* und *PstI* – 2051 bp, 8995 bp; *SpeI* und *HindIII* – 2059 bp, 2273 bp, 6714 bp; *SpeI* und *ApaI* – 2072 bp, 8974 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

O1s und O2as – ble sense und ble antisense (#11/#9); O3s und O4as – GFP sense und GFP antisense (#32/#33).

7.4.4 Komplementation der $\Delta PFP1$ -Mutanten

Abbildung 7.4.4: Schematische Darstellung der Klonierung des Vektor-Konstrukts pCR2.1-HPH-PFP1 sowie dessen Restriktion.

Die Teilabbildung 7.4.4A zeigt die Klonierungsstrategie zur Generierung des Komplementationsvektors pCR2.1-HPH-PFP1. Die gesamte *PFP1*-Gensequenz wurde mit den Oligonukleotiden O1s und O2as amplifiziert und im Vektor pJET2.1/blunt zwischenkloniert. Durch Verwendung des Restriktionsenzym *ApaI* (*ApI*) wurde das gesamte Fragment anschließend in das Vektor-Konstrukt pCR2.1-HPH, welches die *HPH*-Resistenzkassette enthielt, kloniert.

Teilabbildung 7.4.4B zeigt die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionen des Vektor-Konstrukts pCR2.1-HPH-PFP1 mit den Enzymen *ScaI* (*SI*, Spur 1) und *XhoI* (*XI*, Spur 2). Die Restriktionsfragmente entsprechen den erwarteten Größen (*ScaI* – 8490 bp, 2555 bp, 1083 bp; *XhoI* – 8912 bp, 3216 bp). Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

O1s und O2as – PFP48s und PFP49as (#70/#71).

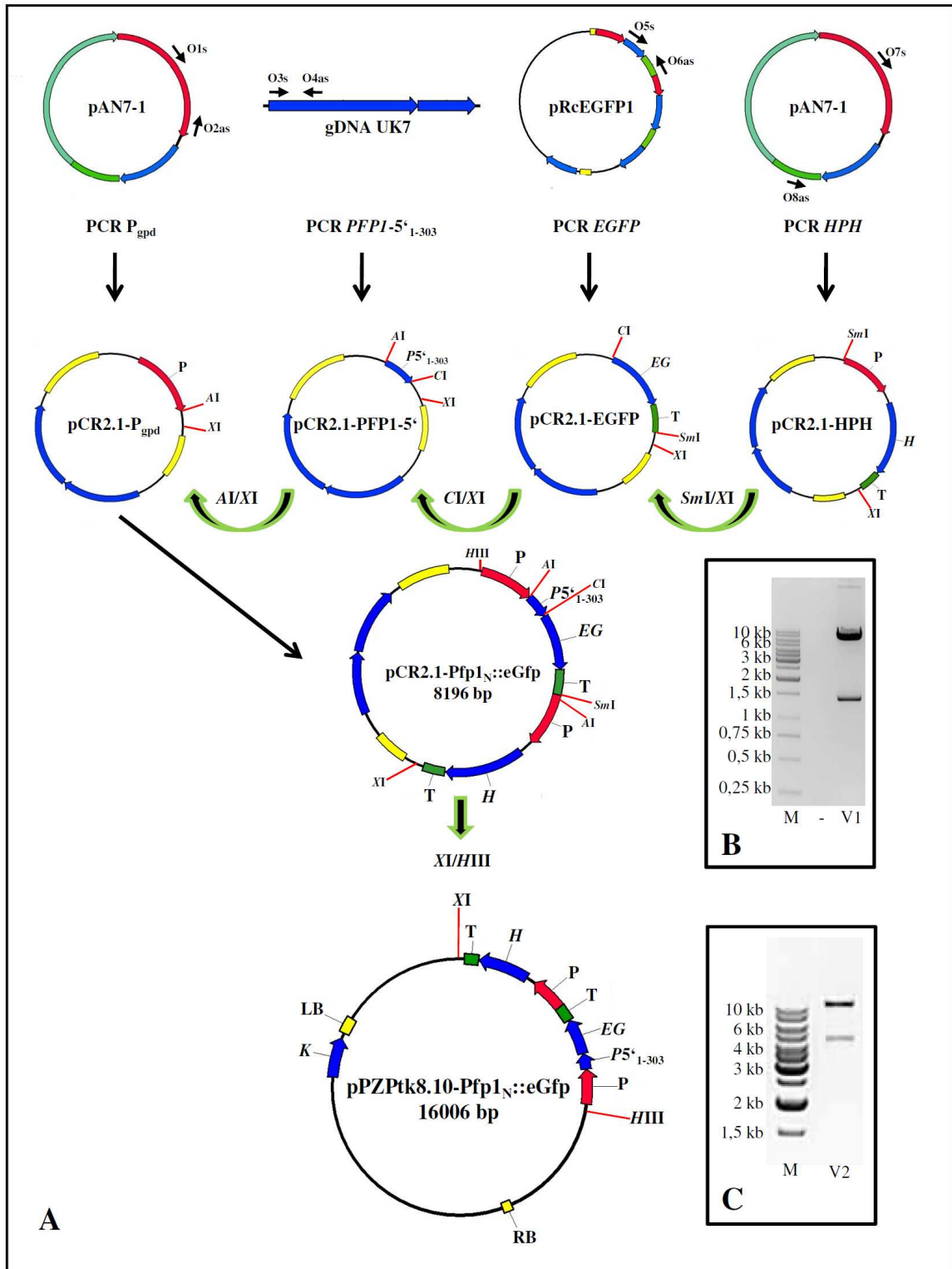


Abbildung 7.4.1.1

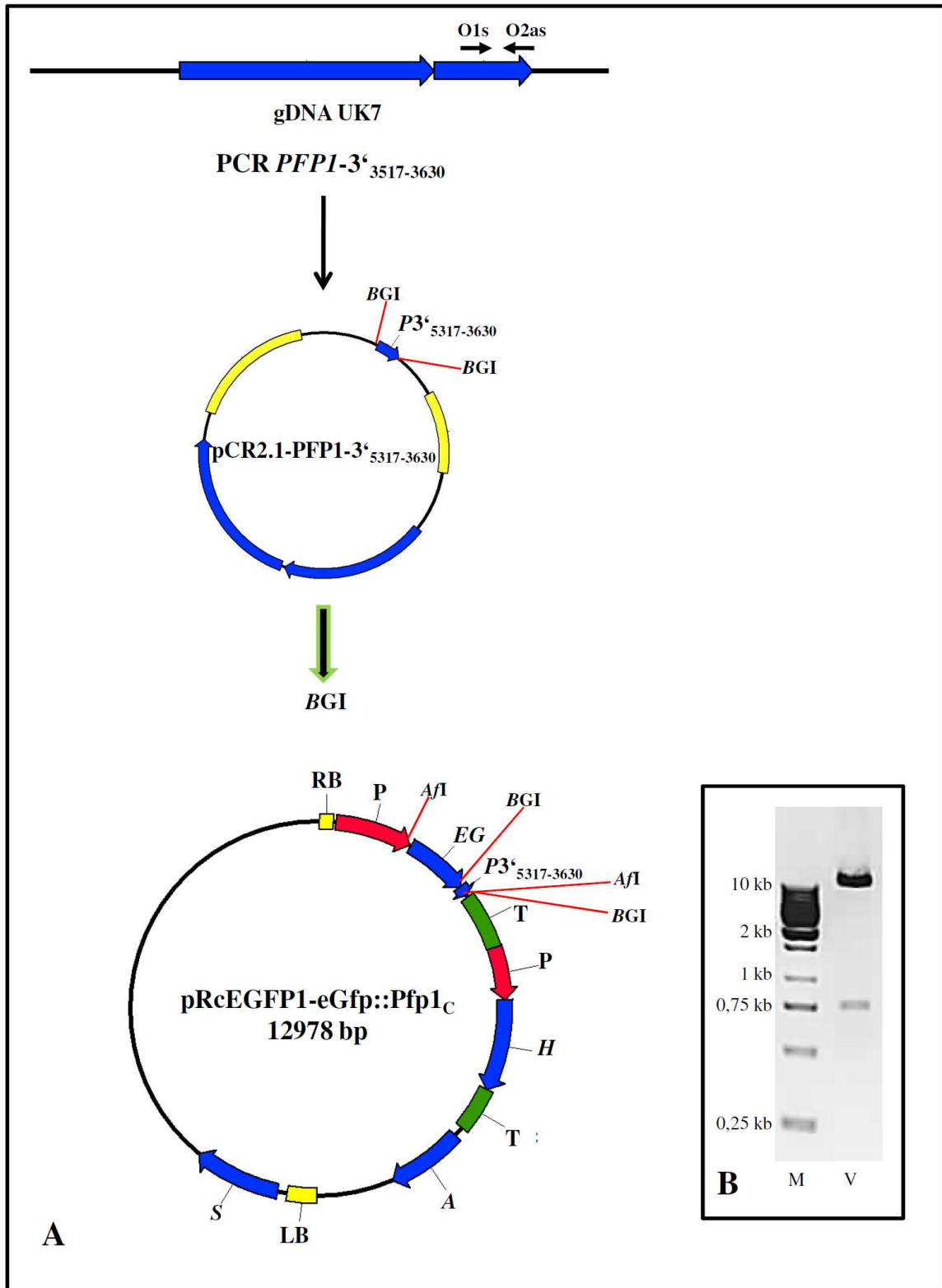


Abbildung 7.4.1.2

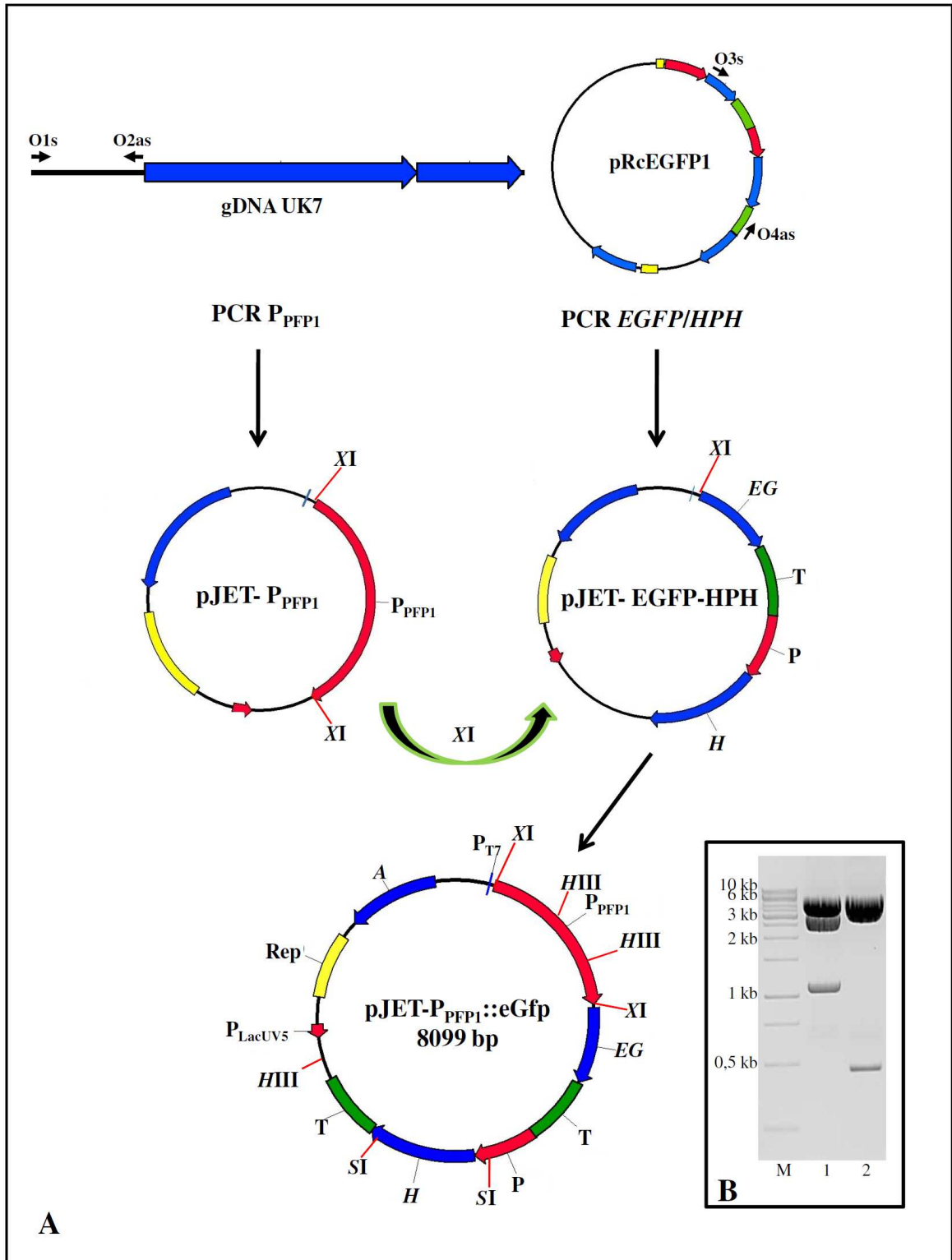


Abbildung 7.4.2

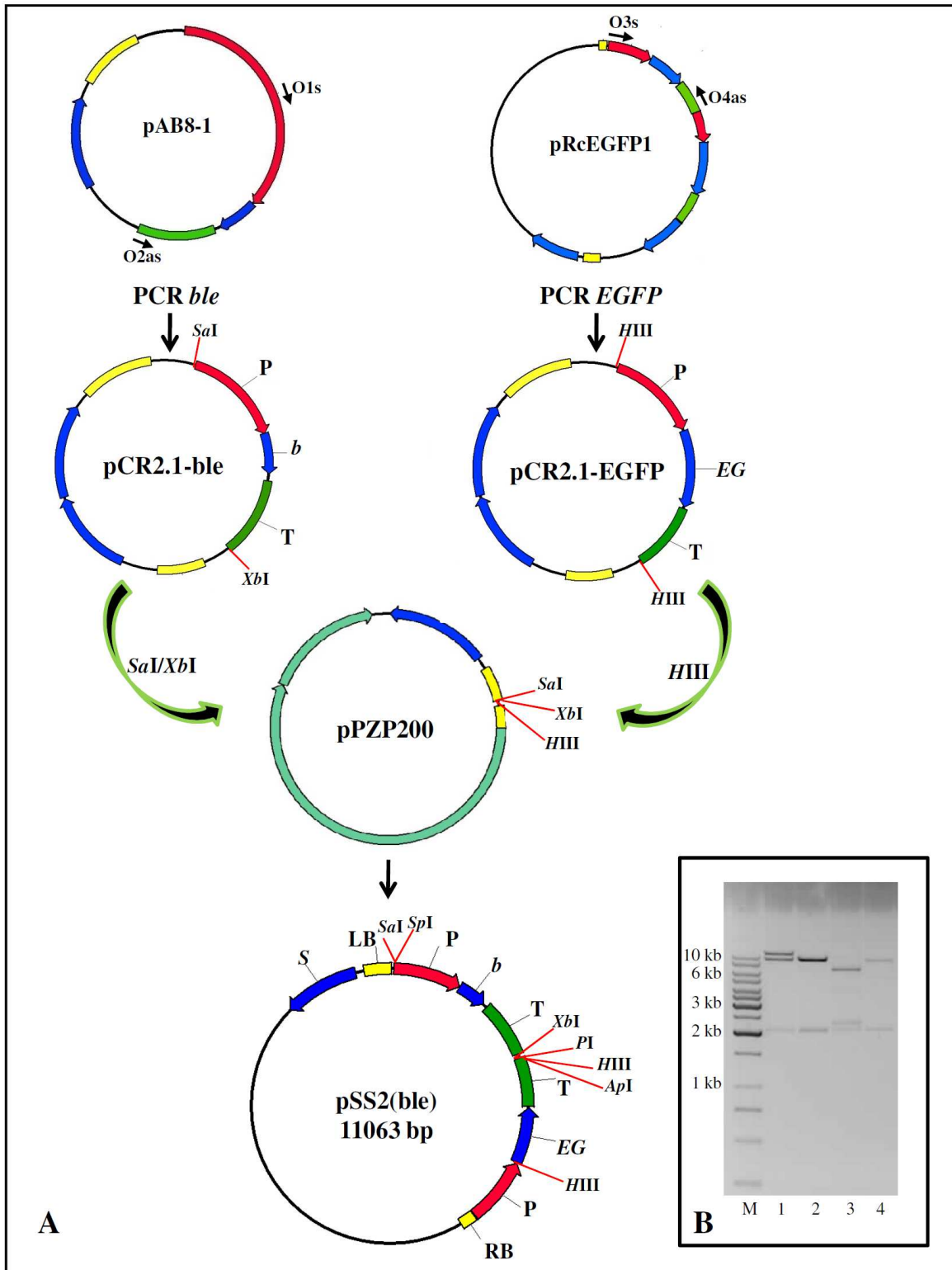


Abbildung 7.4.3

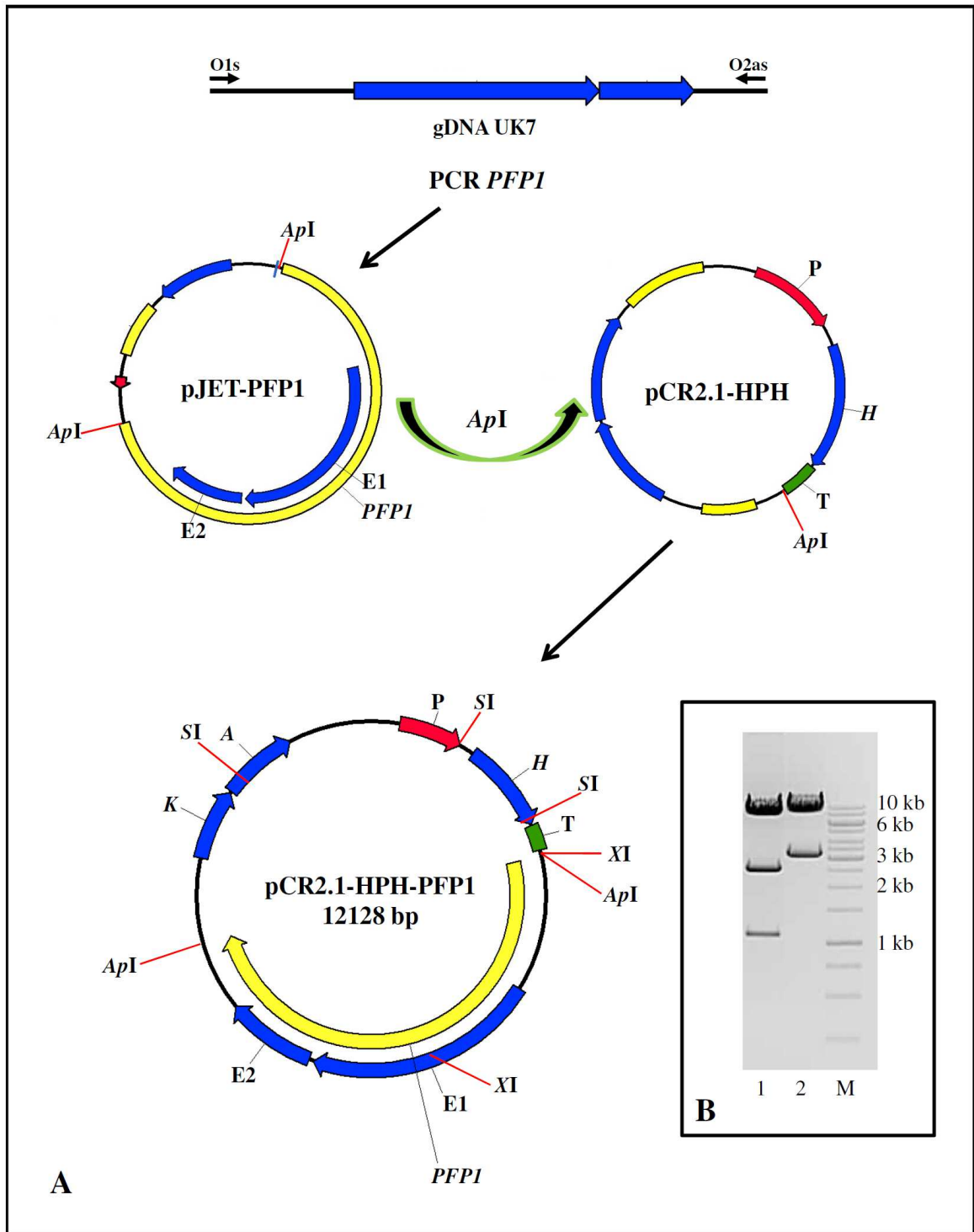


Abbildung 7.4.4

7.5 Zusätzliche Abbildungen zum Ergebnisteil

7.5.1 Charakterisierung des REMI-Ereignisses durch DNA-Hybridisierung

Abbildung 7.5.1: Gelelektrophoretische Auftrennungen der restrigierten genomischen DNA sowie der Vektor-Kontrollen (s. 3.1.1).

Die Abbildungen 7.5.1a und b zeigen die gelelektrophoretischen Auftrennungen der restrigierten genomischen DNA der REMI-Mutante LB20₅₇ (R), der REMI-Komplementationsmutante (K) und des Wildtyps UK7 (U) sowie der Vektor-Kontrollen (V1 bzw. V2) für die DNA-Hybridisierungen 1 und 2. Die genomische DNA sowie der Vektor pAN7-1 (V1) wurden mit den Restriktionsenzymen *SalI* (SI), *NheI* (NI) und *BstEII* (BEII) behandelt. Das Vektorkonstrukt pCR2.1-*PFPI*-5'-UTR (V2) wurde mit *EcoRI* (ERI) restrigiert. Beide Vektoren wurden in einer 1:1000-Verdünnung auf den Agarosegelen aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

7.5.2 Generierung der *PFPI*-Deletionsmutanten unter Verwendung der Fusions-PCR-Methode

Abbildung 7.5.2.1: Gelelektrophoretische Auftrennungen der Einzelfragmente und des Deletionsfusionskonstruktes I sowie dessen Verifizierung durch PCR (s. 3.4.4).

In Abbildung 7.5.2.1a sind die durch drei Einzel-PCR-Reaktionen amplifizierte Fragmente des 5'-untranslatierten Bereiches (5'; 1 kb) und des 3'-Bereiches von *PFPI* (3'-I; 1,1 kb) sowie die Phleomycin-Resistenzkassette (*b*; 1,6 kb) gezeigt.

Abbildung 7.5.2.1b zeigt das 3,7 kb lange Deletionsfusionskonstrukt I (D-I).

In Abbildung 7.5.2.1c sind die PCR-Reaktionen zur Verifizierung des Fusionskonstruktes aus Abb. 7.5.2.1b dargestellt. Die Bindungsstellen der dafür genutzten Oligonukleotide sind in Abbildung 7.5.2.1d gezeigt (O1s-O5as).

Spur 1 - Amplifikationsprodukt der Oligonukleotidkombination O1s und O3as (1655 bp)

Spur 2 - Amplifikationsprodukt der Oligonukleotidkombination O1s und O4s

Spur 3 - Amplifikationsprodukt der Oligonukleotidkombination O3as und O6as

Spur 4 - Amplifikationsprodukt der Oligonukleotidkombination O4s und O6as (1795 bp)

Spur 5 - Amplifikationsprodukt der Oligonukleotidkombination O2s und O5as (3534 bp)

Spur 6 – Eluat des Deletionsfusionskonstruktes I aus Abb. 7.5.2.1b

Für die PCR-Reaktionen in Spur 2 und 3 wurde kein Amplifikationsprodukt erwartet.

O1s – Fusion-Primer1s (#15); O2s – Fusion-nested-s (#13); O3as – ble-down-s (#10); O4s – ble-up-as (#12); O5as – Fusion-nested-as (#14); O6as – Fusion-Primer4as (#18)

Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

Abbildung 7.5.2.2: Gelelektrophoretische Auftrennungen der Einzelfragmente und des Deletionsfusionskonstruktes II sowie dessen Verifizierung durch Restriktion (s. 3.4.4).

Abbildung 7.5.2.2a zeigt die durch drei Einzel-PCR-Reaktionen amplifizierte Fragmente des 5'-und 3'-untranslatierten Bereiches von *PFPI* (5', 1 kb; 3'-II, 0,9 kb) sowie die Phleomycin-Resistenzkassette (*b*; 1,6 kb), die zur Amplifikation des Deletionsfusionskonstruktes II (D-II) verwendet wurden (3,5 kb; Abb. 7.5.2.2b).

Abbildung 7.5.2.2c zeigt die Verifizierung des Deletionskonstruktes II durch dessen Restriktion mit den Enzymen *Sma*I (*Sm*I; Spur 1) und *Sac*I (*SI*; Spur 2). Die Restriktionsstellen der Enzyme sowie die Größen der Restriktionsfragmente sind in Abbildung 7.5.2.2d markiert.

Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

7.5.3 Verifizierung der Deletionsereignisse durch DNA-Hybridisierung

Abbildung 7.5.3: Gelelektrophoretische Auftrennungen der restrigierten genomischen DNA sowie der Sonden-DNA und Vektor-Kontrollen (s. 3.4.5.2).

Die Abbildungen 7.5.3a und b zeigen die gelelektrophoretischen Auftrennungen der mit *Bst*BI (*BBI*) restrigierte genomische DNA der Deletionsmutanten $\Delta PFPI$ -1 bis 4 ($\Delta 1$, $\Delta 2$, $\Delta 3$, $\Delta 4$) und des Wildtyps UK7 (U) sowie der Transformanten mit ektopischen Integrationen des Deletionskonstruktes, die keine homologe Rekombination aufwiesen (T1-3). Zusätzlich wurden jeweils eine 1:100-Verdünnung des Restriktionsansatzes der verwendeten Sonde 1 (*PFPI*-5'-UTR; S1) bzw. eine 1:500-Verdünnung des PCR-Ansatzes der Sonde 2 (*PFPI*-E1; S2) sowie 1:1000-Verdünnungen der Restriktionsansätze der Vektoren pCR2.1- $\Delta PFPI$ -I-II, die die Deletionskonstrukte I und II enthielten (V1, V2), aufgetrennt. Als Größenstandard diente eine 1 kb-DNA-Leiter (M).

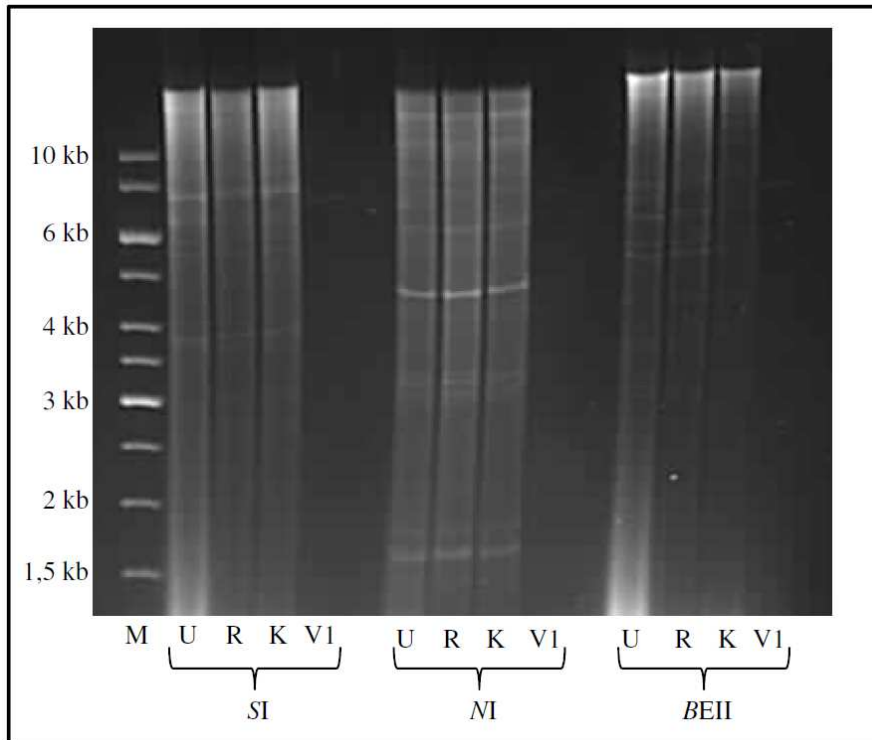


Abbildung 7.5.1a

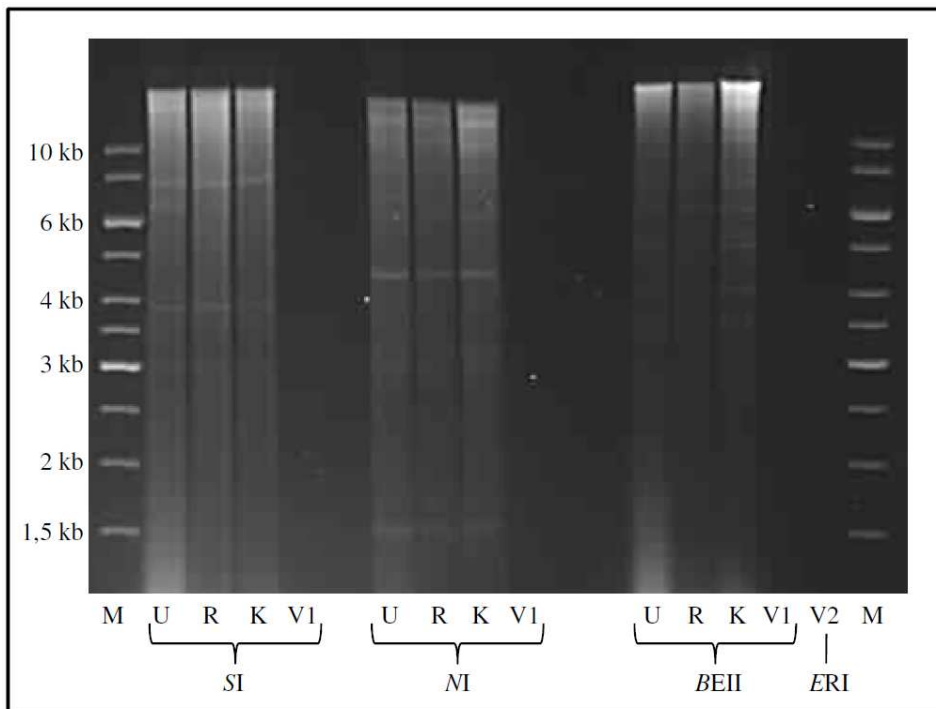


Abbildung 7.5.1b

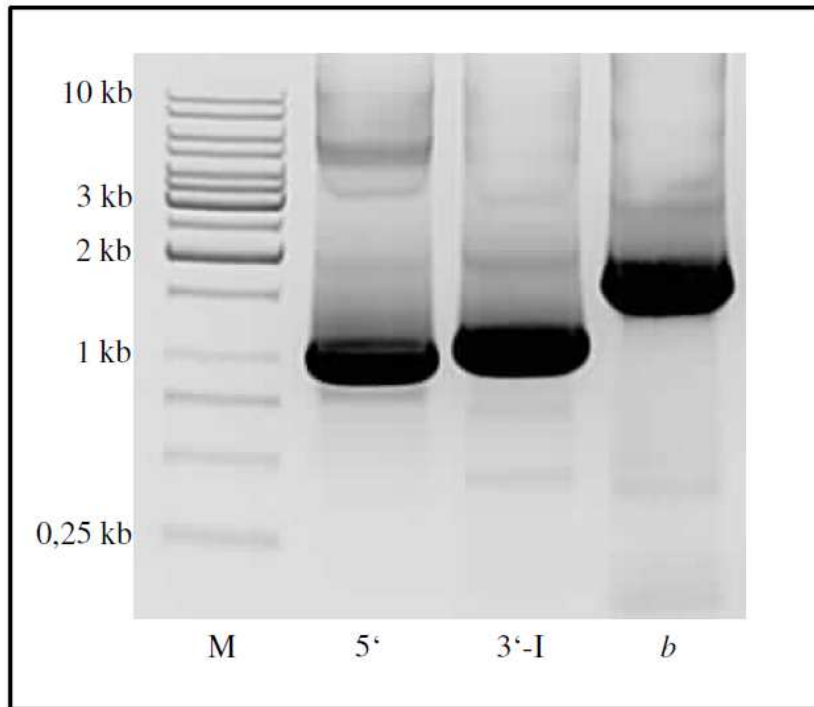


Abbildung 7.5.2.1a

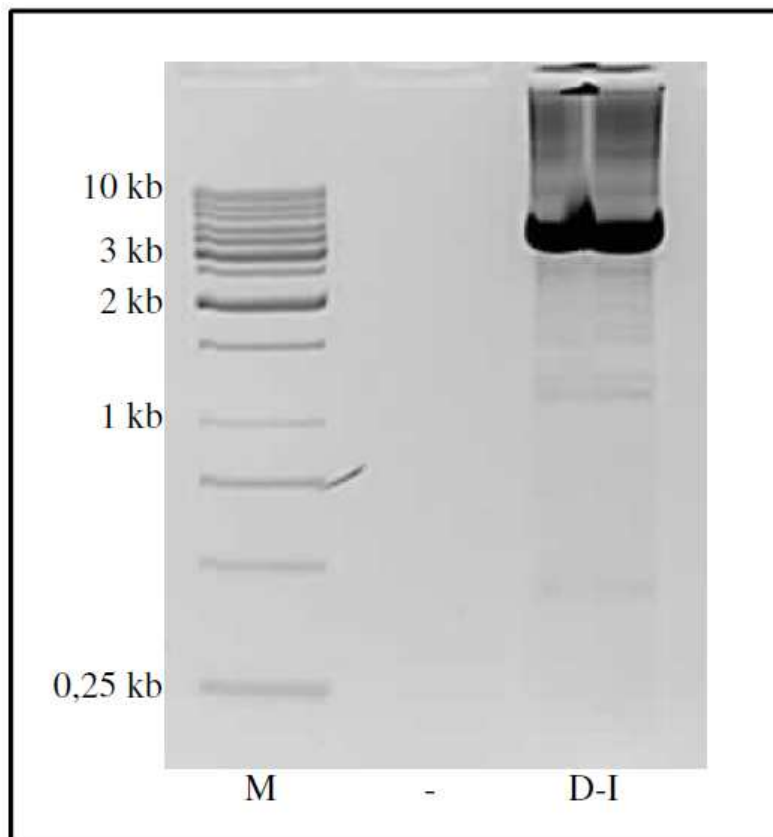


Abbildung 7.5.2.1b

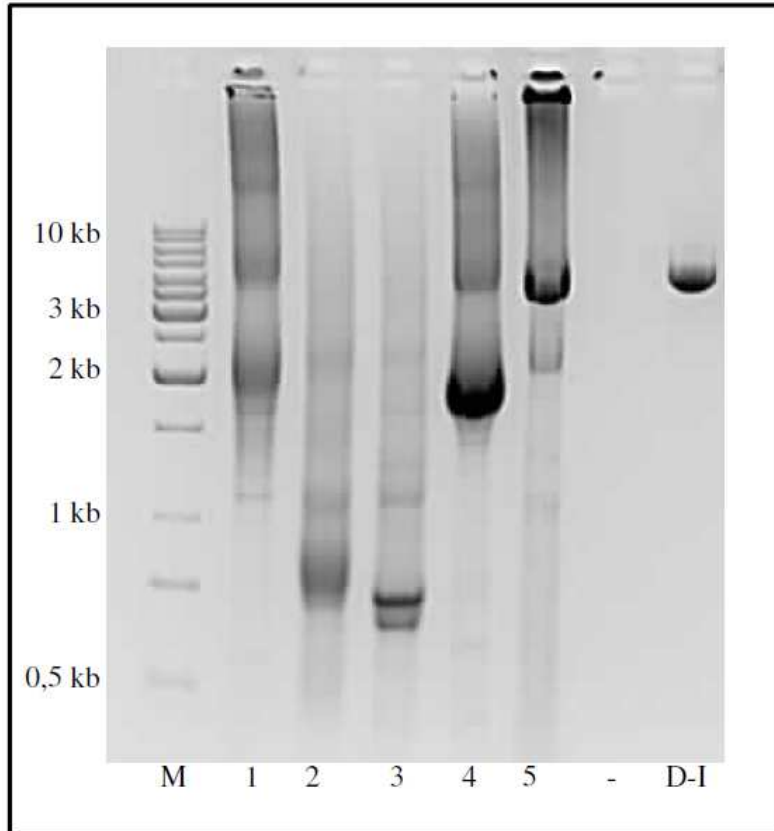


Abbildung 7.5.2.1c

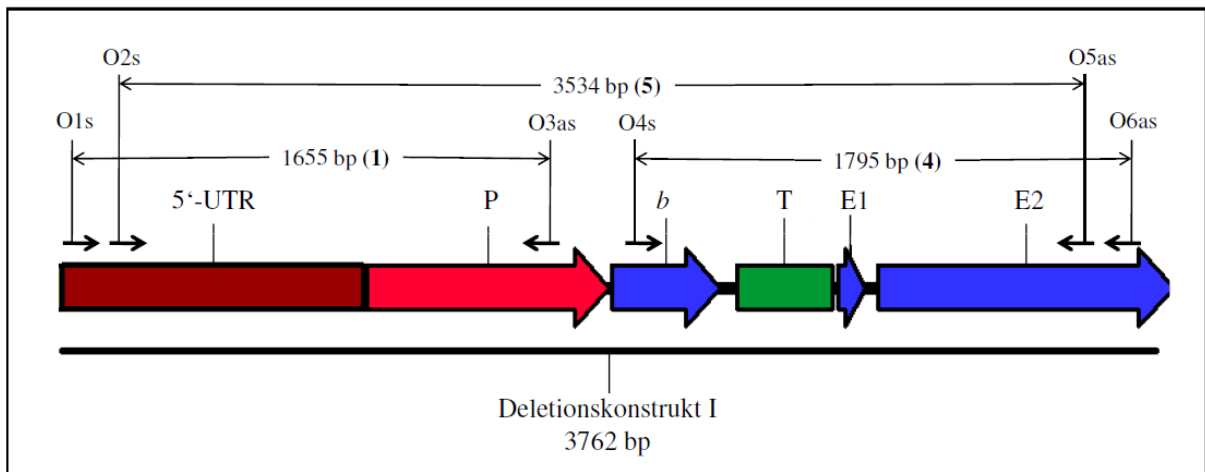


Abbildung 7.5.2.1d

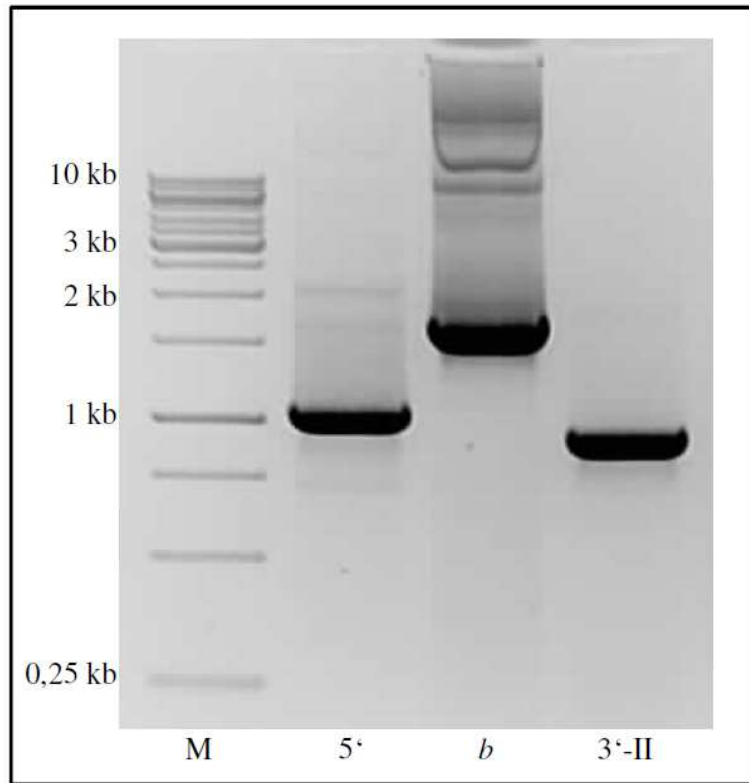


Abbildung 7.5.2.2a

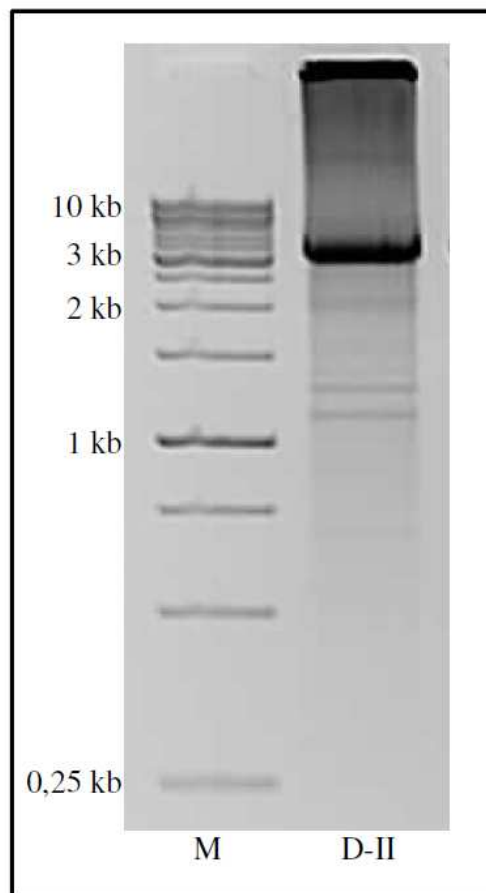


Abbildung 7.5.2.2b

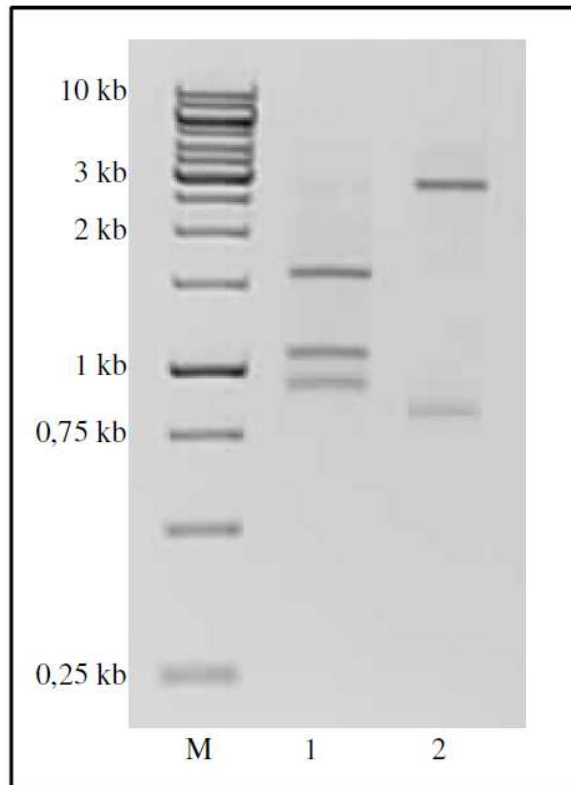


Abbildung 7.5.2.2c

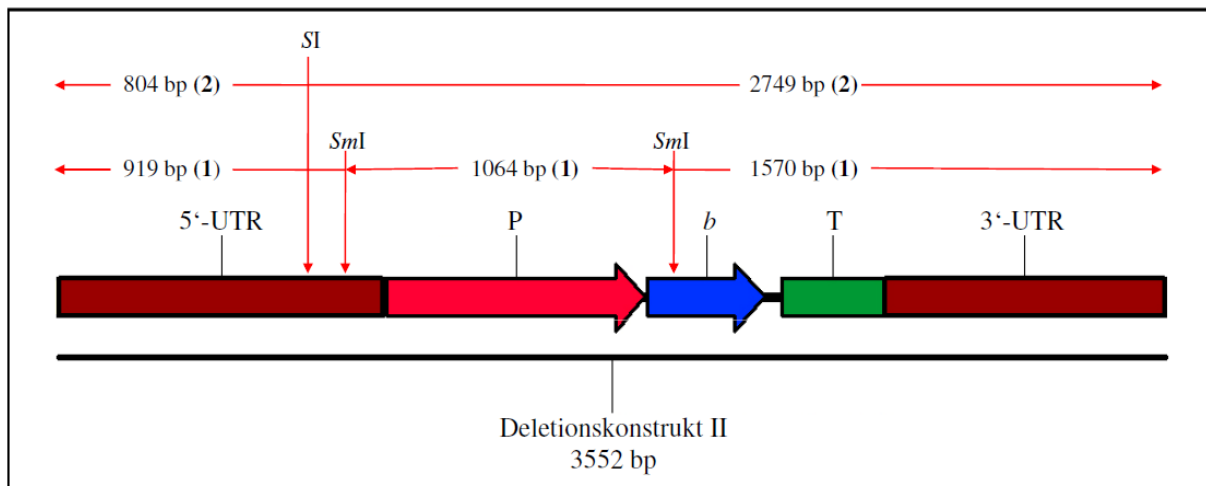


Abbildung 7.5.2.2d

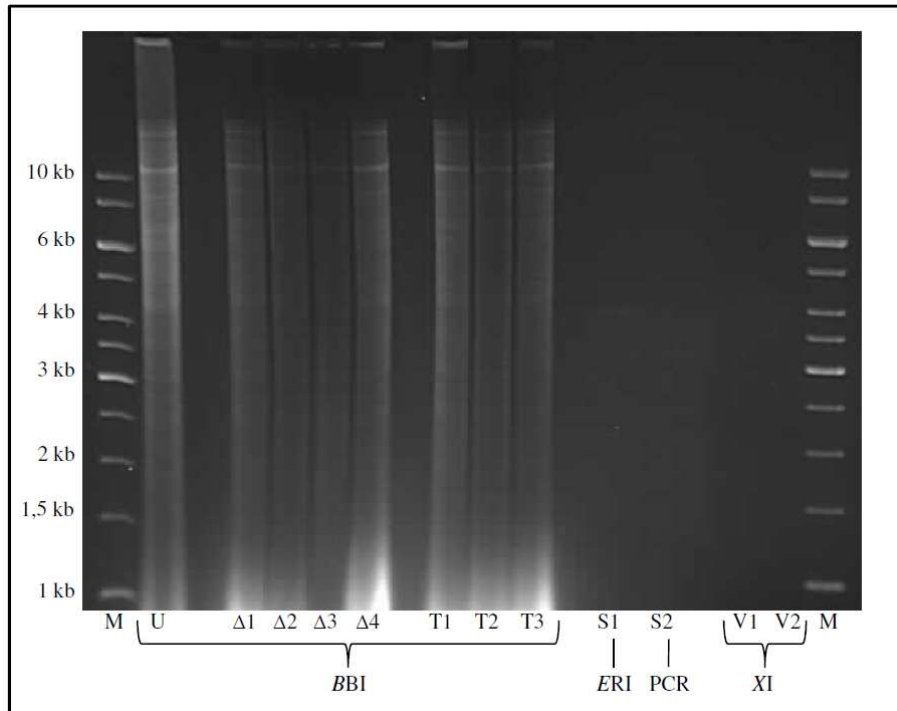


Abbildung 7.5.3a

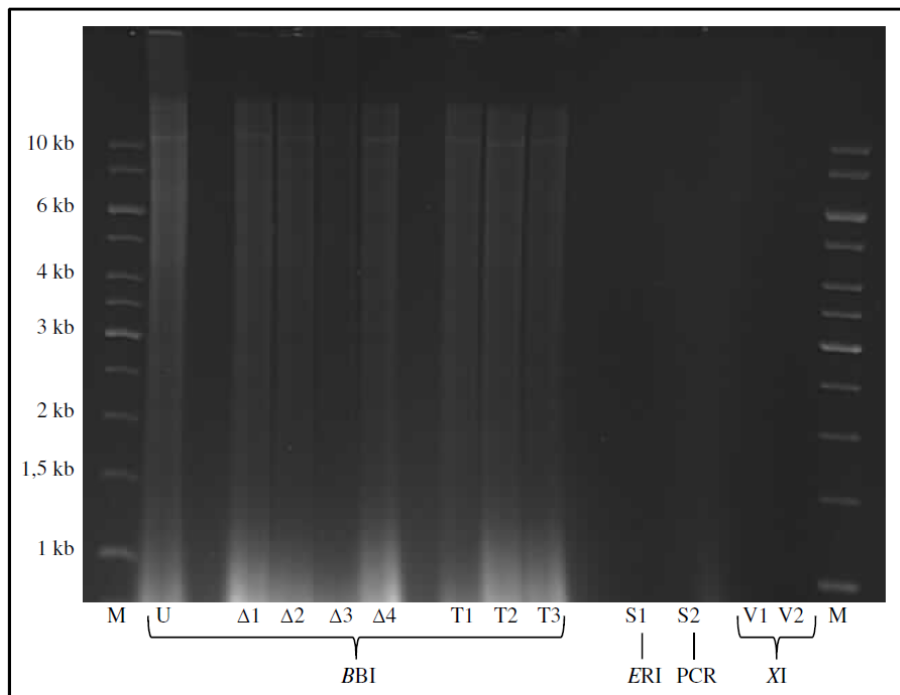


Abbildung 7.5.3b

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle (Saale), den 07.02.2011

Sylvia Siersleben

Lebenslauf

Name: Sylvia Siersleben
Akademischer Grad: Dipl.-Biol.
Geschlecht: weiblich
Geburtsdatum: 29.03.1980
Geburtsort: Halle (Saale)
Anschrift: Beyschlagstr. 26
06110 Halle
Nationalität: deutsch

Werdegang

09/1986 – 07/1998 Schulausbildung in Halle und Hettstedt
Abschluss: Abitur (Hettstedt, 03.07.1998)

10/1998 – 11/2003 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-
Wittenberg
Abschluss: Diplom (Halle, 25.11.2003)
Thema der Diplomarbeit: „Analyse der Expression von *Coll1*, einem
cor-Gen aus Gerste (*Hordeum vulgare* L.) auf RNA- und Protein-
Ebene.“
angefertigt im Fachbereich für Biologie, Abteilung Pflanzenphysiologie
bei Prof. Dr. K. Humbeck

04/2004 – 03/2005 Arbeiten zur Charakterisierung des Effektorproteins Nip1 des
Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune*
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Abteilung Stress- und
Entwicklungsbiologie, Prof. Dr. D. Scheel; AG Molekulare
Kommunikation in Pflanze-Pathogen-Interaktionen, Dr. W. Knogge)

Seit 03/2005 Promotion zum Thema: „Funktionelle Charakterisierung von *PFPI*,
einem mutmaßlichen Pathogenitätsgen des Gerstenpathogens
Rhynchosporium commune.“
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Abteilung Stress- und
Entwicklungsbiologie, Prof. Dr. D. Scheel; AG Molekulare
Kommunikation in Pflanze-Pathogen-Interaktionen, Dr. W. Knogge)

Halle, den 07.02.2011

Sylvia Siersleben

Publikationen

BARTH, O., ZSCHIESCHE, W., SIERSLEBEN, S., HUMBECK, K. (2004): Isolation of a novel barley cDNA encoding a nuclear protein involved in stress response and leaf senescence. – *Physiologia Plantarum* 121: 282-293

SIERSLEBEN, S. AND W. KNOGGE, W. (2008): “An Epc-N domain-containing protein is a putative pathogenicity factor of the barley pathogen *Rhynchosporium secalis*” – Poster Gordon Research Conference Cellular & Molecular Fungal Biology, Holderness, New Hampshire, USA, 29.06.-04.07.2008

KIRSTEN, S., SIERSLEBEN, S. AND KNOGGE, W. (2011): A GFP-based assay to quantify the impact of effectors on the *ex planta* development of the slowly growing barley pathogen *Rhynchosporium commune*. – *Mycologia*, zur Publikation eingereicht

Danksagung

Diese letzte Seite möchte ich dazu nutzen, all denjenigen zu danken, die mich auf diesem langen Weg begleitet haben und es mir durch jedwede Unterstützung ermöglicht haben, bis zu eben dieser Seite zu gelangen.

Zuallererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dierk Scheel dafür bedanken, dass ich in der Abteilung für Stress- und Entwicklungsbiologie des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie meine Promotionsarbeit anfertigen konnte sowie für die Übernahme des Erstgutachtens meiner Dissertation.

Bei Dr. Wolfgang Knogge möchte ich mich für die jahrelange freundliche und kompetente Betreuung und Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Prof. Dr. Klaus Humbeck und Prof. Dr. Paul Tudzynski danke ich für die Übernahme der Zweit- und Drittgutachten.

Ich danke meiner gesamten Arbeitsgruppe sowie allen „Wunschgruppenmitgliedern“ für ein stets wunderbares Arbeitsklima. Danke, dass ihr euch mit mir über positive Daten gefreut und so manches negative Ergebnis mit kiloweise Gummitieren gemildert und in literweise Kaffee ertränkt habt.

Ein besonderer Dank geht an meine langjährige Kollegin und Mitstreiterin Claudia Mönchmeier. Was soll ich sagen? Du bist und bleibst mein Fels in der Brandung. Ohne deine ständige Hilfe, deine nie enden wollende seelische und moralische Unterstützung in jeglicher Hinsicht sowie deinen unerschütterlichen Optimismus wäre der Laboralltag für mich sehr viel grauer gewesen.

Susanne Kirsten danke ich für ihre stetig gute Laune, ihre große Hilfsbereitschaft und die ständige Bereitstellung von Puffern, Lösungen und Medien.

Ich danke Julia Grimmer, Daniel Penselin und Anna Thamm für ihre einsatzfreudige und geduldige Mitarbeit an meinem Thema.

Bei all meinen Freunden möchte ich mich für das beständige Daumendrücken und Mut zusprechen in allen Situationen bedanken sowie für viele schöne Ablenkungen vom stressigen Laboralltag.

Zum Schluss, jedoch nicht zuletzt gebührt ein großer Dank meiner Familie, insbesondere meinen Eltern. Ohne ihre beständige Unterstützung in jeglicher Hinsicht, ihr Vertrauen und ihren festen Glauben an mich und meine Fähigkeiten hätte ich diese Arbeit nicht zu einem erfolgreichen Abschluss bringen können. Danke.