
**Untersuchungen zur Bedeutung der
Chitindeacetylase 1 pathogener Hyphen von
Colletotrichum graminicola (CES.) WILS. während
der frühen Infektionsphasen**

Dissertation

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

vorgelegt der

**Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

von Frau Una Rauchhaus

geb. am 23. Juni 1971
in Halle (Saale)

Gutachterin bzw. Gutachter:

1. Prof. Dr. D. Scheel
2. Prof. Dr. H. B. Deising
3. Prof. Dr. B. M. Moerschbacher

Halle (Saale), den 29. Oktober 2002

urn:nbn:de:gbv:3-000004438

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004438>]

Als ich überlegte, wieviel verschiedene Ansichten über die gleiche Sache es geben kann, deren jede einzelne ihren Verteidiger unter den Gelehrten findet, da stand für mich fest: Alles, was lediglich wahrscheinlich ist, ist wahrscheinlich falsch.

Descartes

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H.B. Deising danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die mir dadurch gegebene Möglichkeit, mich in ein neues Themengebiet einzuarbeiten. Daneben möchte ich mich auch für seine zahlreichen Anregungen und für die Freiheiten, die er mir bei der Durchführung des Projektes eingeräumt hat, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. G. Hause und seiner Mitarbeiterin Frau Franke für die gute Zusammenarbeit bei den fluoreszenzmikroskopischen Arbeiten und für ihren unermüdlichen Eifer, den Geschehnisse der Penetration auch elektronenmikroskopisch nachzugehen.

Ein großes Dankeschön gilt all denen, die trotz der manchmal unbefriedigenden Situation zu einem angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben und die mir den Einstieg in den Laboralltag mit viel Freude, Humor und Kompetenz erleichtert haben, besonders Stefan, Marcus und Sven. Dazu zählt auch Frau Becker, die in guten und in schwierigen Stunden immer ein offenes Ohr, ein paar tröstende Worte oder einen guten Tip parat hatte. Vielen Dank!

Frau D. Jany danke ich für die technische Unterstützung, die sie immer zuverlässig durchgeführt hat.

Herrn Dr. Steffen Panzner möchte ich dafür danken, dass er mir neben meiner jetzigen Tätigkeit den nötigen Druck und die erforderlichen Freiräume gewährt hat, diese Arbeit zu schreiben. Ein Dankeschön auch an meine neuen Kollegen, die das Voranschreiten des Werkes stets interessiert und ratgebend verfolgten.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meinem Freund Burkhardt danken, die stets an mich glaubten, eine unendliche Ruhe und Hilfsbereitschaft in schwierigen Phasen besaßen und auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
1	Wirt-Parasit-System <i>Zea mays</i> L. – <i>Colletotrichum graminicola</i>	1
2	Pflanzliche Abwehrmechanismen	3
2.1	Überblick über pflanzliche Abwehrmechanismen	3
2.2	Abwehrreaktionen mit Bedeutung für das Pathosystem Mais- <i>Colletotrichum graminicola</i>	3
2.3	Chitin-Fragmente als Elicitoren	5
3	Schutzmechanismen des Pathogens	5
3.1	Zellwandbiogenese und -modifikationen	5
3.2	Elicitoraktivität von Chitosan und Vorkommen von Chitosanasen	8
4	Pilzliche Chitinacetylasen	10
4.1	Chitinacetylasen aus nicht-pathogenen Organismen	10
4.2	Chitinacetylasen aus phytopathogenen Pilzen	11
5	Chitinacetylase in <i>Colletotrichum graminicola</i> – Ziele der Arbeit	12
II	Material und Methoden	15
1	Biologisches Material	15
1.1	Pilzmaterial und <i>in vitro</i> -Infektionsstrukturen	15
1.1.1	Isolate und Kulturbedingungen	15
1.1.2	<i>in vitro</i> -Infektionsstrukturen	15
1.2	Pflanzenmaterial und Infektionsversuche	16
1.3	Anzucht und Kultur von Bakterien	17
2	Chemikalien	17
3	Molekularbiologische Methoden	17
3.1	Präparation von Nukleinsäuren	17
3.1.1	Präparation genomischer DNA	17
3.1.2	Schnelle Präparation genomischer DNA zum Einsatz in der PCR	18
3.1.3	Präparation von Plasmid- und Cosmid-DNA	18
3.1.4	Präparation von Gesamt-RNA	19
3.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	20
3.3	Hybridisierungen	20
3.3.1	Herstellung von Hybridisierungs-Sonden	20
3.3.2	Southernblots	21
3.3.3	Kolonie-Hybridisierung	23
3.4	PCR-Anwendungen	23

3.4.1	Standard-PCR	23
3.4.2	Touchdown-PCR	24
3.4.3	Expand-PCR	25
3.4.4	RT-PCR	26
3.5	Klonierungstechniken	27
3.5.1	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
3.5.2	Eluierung spezifischer Fragmente aus Agarose-Gelen	27
3.5.3	Modifikation der Enden verdauter DNA	27
3.5.4	Dephosphorylierung	28
3.5.5	Ligationen	28
3.5.6	Klonierung von PCR-Produkten	29
3.6	Sequenzierung und Sequenzanalyse	29
3.7	Transformationstechniken	30
3.7.1	Transformation von <i>C. graminicola</i>	30
3.7.2	Transformation von <i>E. coli</i>	32
4	Proteinbiochemie	33
4.1	Gewinnung von extrazellulärer Waschflüssigkeit (WF)	33
4.2	Proteinextraktion	33
4.2.1	Gewinnung von Blatthomogenaten	33
4.2.2	Gewinnung pilzlicher Proteine	34
4.2.3	Proteinbestimmung	34
4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
4.3.1	Standarddurchführung	34
4.3.2	Substrat-SDS-PAGE	35
4.4	Western Blot	36
5	Mikroskopie	37
5.1	Differentieller Interferenz-Phasenkontrast	37
5.2	Fluoreszenz-Mikroskopie	38
5.2.1	Calcofluor-Färbung	38
5.2.2	GFP-Markierung	38
5.2.3	Spezifische Immunmarkierung	38
5.3	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie	40
6	Weitere Methoden	41
III	Ergebnisse	42
1	Methodische Ansätze	42
1.1	Isolierung des Chitinacetylase-Gens	42
1.2	Expression des Gens des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) unter Kontrolle des <i>CgCda1</i> -Promotors	43
1.3	Knock-out Mutagenese	44

2	Chitinacetylase aus <i>Colletotrichum graminicola</i>	45
2.1	Sequenzanalyse	45
2.2	Regulation der Genexpression	51
2.2.1	RT-PCR	51
2.2.2	Western Blot	52
2.2.3	Expression mit GFP-Fusion	53
2.3	Inaktivierung der Chitinacetylase CgCda1	54
2.4	Evaluierung der Pathogenität und Charakterisierung des Phänotyps der Mutanten	57
2.4.1	Wachstumsuntersuchungen	57
2.4.2	Virulenztests	59
2.4.3	Induktion antifungaler Proteine	61
2.4.4	Untersuchungen zur Beschaffenheit der pilzlichen Zellwände	61
2.4.5	Analyse der Zusammensetzung der Pilzzellwand	69
IV	Diskussion	71
1.	<i>Colletotrichum graminicola</i> als Modell zur Untersuchung der Zellwandmodifikation bei phytopathogenen Pilzen	71
2.	Wirkungsweise und Vorkommen der Chitinacetylases	72
2.1	Wirkprinzip und biochemische Einteilung der Chitinacetylases	72
2.1.1	Chitinacetylases mit Bedeutung bei der Zellwandbiogenese	73
2.1.2	Chitinacetylases mit Bedeutung in Wirt-Parasit-Interaktionen	73
2.2	Chitinacetylasegene verschiedener Mikroorganismen	75
3.	Regulation der Chitinacetylase1 von <i>C. graminicola</i>	78
3.1	Aktivitätsuntersuchungen	78
3.2	Regulation der Genexpression von CgCda1	79
3.2.1.	Regulatorische Promotorelemente	79
3.2.2	Regulation auf Transkript- und Proteinebene	82
4.	Biologische Funktionen der Chitinacetylase	84
5.	Modifikation der Zellwandzusammensetzung bei der <i>Colletotrichum</i>-Infektion	88
5.1	Differenzierung von <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -gebildeten Infektionsstrukturen	88
5.2	Markierung von <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -differenzierten Infektionsstrukturen	90
5.2.1	Spezifität der Markierung	90
5.2.2	Markierungsmuster der Infektionsstrukturen	90
5.3	Bedeutung von Chitosan für die <i>Colletotrichum</i> -Infektion am Mais	93
V	Zusammenfassung - Summary	95
1.	Zusammenfassung	95
2.	Summary	96

VI Literatur	99
VII Anhang	116
1. Zusammensetzung von <i>Colletotrichum</i>-Nährmedien	116
Haferflockenagar	116
Komplettmedium	116
Regenerations- und Selektionsmedium für Transformation	116
2. Primer	117
3. Anmerkungen zur Schreibweise	118
4. Abkürzungsverzeichnis	119
5. Abbildungsverzeichnis	122
6. Tabellenverzeichnis	123

I Einleitung

1 Wirt-Parasit-System *Zea mays* L. – *Colletotrichum graminicola*

Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson (Telomorph: *Glomerella graminicola* Politis) gehört zur Klasse der Ascomyceten (Pyrenomycetes, Phyllachorales) und ist der Erreger der Anthraknose, einer Blattfleckenkrankheit an verschiedenen Gräsern und Getreiden (Wilson, 1914), beispielsweise an Mais (*Zea mays* L.). In den frühen 70er Jahren des 20. Jahrhunderts führten zahlreiche schwere Epidemien dieser Krankheit zu drastischen Ertragseinbußen in nördlich-zentralen und östlichen Teilen der USA, wobei vor allem der Zuckermaisanbau betroffen war (Bergstrom & Nicholson, 1999). Das Pathogen kann während der gesamten Vegetationsperiode alle Teile der Pflanze befallen. Dabei wird vor allem der Befall von Halm (*anthracnose stalk rot*) und Blättern (*anthracnose leaf blight*) (Bergstrom & Nicholson, 2000) und die daraus resultierende Verringerung der Assimilationsfläche für die Ernteverluste verantwortlich gemacht.

Colletotrichum graminicola ist sehr gut an seinen Lebensraum, das Getreide-Ökosystem, angepasst, da er neben einer parasitischen Lebensweise auch saprophytisch auf den Rückständen der Getreideflächen überdauern kann (Bergstrom & Nicholson, 1999). Die Vermehrung des Pathogens findet normalerweise asexuell über die Bildung von Sporen, die sogenannten Konidien, statt. Diese werden in speziellen Sporenlagern, den Acervuli, auf der Blattoberfläche infizierter Pflanzen gebildet. Unter sehr günstigen Voraussetzungen (100 % relativer Luftfeuchte) kann die Infektion frühestens 12-18 Stunden nach dem Auftreffen der Konidien auf der Blattoberfläche beginnen; reife Acervuli können nach weiteren 12-18 Stunden beobachtet werden (Bergstrom & Nicholson, 1999). Von den Acervuli ausgehend erfolgt eine rasche Ausbreitung der Sporen vor allem durch Wind, Regen und Spritzwasser auf benachbarte Pflanzen. Die Konidien werden in den Acervuli von einer schleimartigen Matrix umgeben, welche unterschiedliche Funktionen erfüllt. Zum einen schützt sie die Sporen vor Austrocknung und vor toxischen Phenolen, die von der Maispflanze gebildet werden (Nicholson *et al.*, 1986; Nicholson & Moraes, 1980), zum anderen verhindern Keiminhhibitoren die sich in der Matrix befinden und zur Gruppe der Mycosporine gehören (Arpin & Bouillant, 1981), ein verfrühtes Keimen der Sporen im Acervulus (Leite & Nicholson, 1992; Leite & Nicholson, 1993). Außerdem wird diskutiert, dass die Adhäsion der Sporen an die Blattoberfläche und die Penetration der pflanzlichen Epidermis durch

hydrolytische Enzyme in der Matrix wie Esterasen oder Cutinasen unterstützt wird (Pascholati *et al.*, 1993).

Nach der Adhäsion auf dem Blatt, wofür eine hydrophobe Oberfläche notwendig ist (Mercure *et al.*, 1994a; Mercure *et al.*, 1994b), keimen die Konidien aus und bilden melanisierte Appressorien (Nicholson & Epstein, 1991, Bergstrom, 1999). Rasmussen und Hanau (1989) konnten an melanindefizienten Mutanten von *Colletotrichum graminicola* zeigen, dass die Melanisierung für eine erfolgreiche Penetration des Wirtsgewebes von entscheidender Bedeutung ist. Zu entsprechenden Ergebnissen führten auch Untersuchungen an *C. lagenarium* (Kubo *et al.*, 1982) und *C. lindemuthianum* (Wolkow *et al.*, 1983). Henson *et al.* (1999) fassen zusammen, dass melanindefiziente Mutanten phytopathogener Pilze, die mit melanisierten Appressorien die Wirtspflanze penetrieren, wie beispielsweise *Magnaporthe grisea* und verschiedene *Colletotrichum*-Arten, apathogen sind. Diese Autoren stellten weiterhin fest, dass der Verlust der Melanisierung gelegentlich zu einer Erhöhung der Aktivität lytischer Enzyme führt, die die pilzliche Penetration begünstigen.

Vom Appressorium wird unter Ausbildung eines extrem hohen Tugordruckes (bis 5,35 MPa bei *Colletotrichum graminicola* (Bechinger *et al.*, 1999) mit einem Infektionskeil die Epidermiszelle penetriert. Begleitend wird die Anwesenheit und/oder Bildung verschiedener pilzlicher Enzyme, unter anderem Cutinasen, Cellulasen, Pektinasen und Polygalakturonasen beobachtet (Bergstrom & Nicholson, 1999), welche unterstützend in den Abbau der pflanzlichen Zellwände eingreifen. Von der Penetrationsstelle aus werden Infektionsvesikel und Primärhyphen gebildet, die jedoch nicht die Plasmamembran der Wirtszelle penetrieren. Für eine relativ kurze Zeit (24-36 Stunden) wächst der Pilz biotroph (Bergstrom & Nicholson, 1999). Erst danach werden nekrotrophe Sekundärhyphen ausgebildet, welche sich effektiv mit Hilfe zellwandabbauender Enzyme im Wirtszellgewebe ausbreiten (Perfect *et al.*, 1999).

Colletotrichum graminicola gehört somit zur Gruppe der hemibiotrophen Pilze. Nach einer kurzen initialen biotrophen Phase, die in der Regel symptomlos bleibt, erfolgt die Umstellung auf nekrotrophe Lebensweise (Bailey *et al.*, 1992). Hemibiotrophe Pilze sind somit in der Lage, beide Möglichkeiten der Versorgung mit Nährstoffen aus dem Pflanzengewebe zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Differenzierung und Entwicklung zu nutzen (Luttrell, 1974). Aufgrund der kurzen biotrophen Phase zu Beginn der Infektion sind deutliche Läsionen auf der Blattoberfläche erst 3-5 Tage nach der Inokulation zu sehen (Nicholson, 1992). Hemibiotrophie ist bei Ascomyceten und Deuteromyceten verbreitet (O'Connell & Bailey, 1991).

2 Pflanzliche Abwehrmechanismen

2.1 Überblick über pflanzliche Abwehrmechanismen

Neben präformierten, also konstitutiv vorhandenen, Abwehrmechanismen der Pflanze sind zahlreiche induzierte Abwehrmechanismen bekannt, mit denen die Pflanzen auf einen Pathogenbefall reagieren können.

Zu den präformierten Abwehrmaßnahmen gehören Bildung von mechanischen Barrieren (beispielsweise Einlagerungen aus Lignin, Suberin oder Kallose (Kolattukudy, 1980; Kolattukudy, 1985; Mellersh & Heath, 2001) sowie chemische Abwehrmechanismen. Zu diesen zählen konstitutive antimikrobielle Substanzen (z. B. Saponine, cyanogene Glycoside oder Glukosinolate (Bennett & Wallsgrove, 1994; Osbourn, 1996)).

Bei den induzierten Abwehrmechanismen kommt es im Falle der Gen-für-Gen Erkennung (Flor, 1971) häufig zu einem lokalisierten Zelltod unmittelbar an der Penetrationsstelle (Dangl *et al.*, 1996), der von der Bildung von Papillen, der Akkumulation von Phytoalexinen oder der Anhäufung reaktiver Sauerstoffspezies in unmittelbarer Umgebung der Nekrose begleitet werden kann. Liegt keine Gen-für-Gen Erkennung vor, muss als Voraussetzung für die Aktivierung von Abwehrreaktionen die Anwesenheit des Pathogens von der Pflanze erkannt werden. Diese Erkennung erfolgt durch meist niedermolekulare Stoffe, sogenannten Elicitoren (Boller, 1995). Dazu zählen lipophile Substanzen (z. B. Ergosterol, (Cardinale *et al.*, 2000)), Glycopeptide und Proteine (z. B. Pep13-Elicitin aus *Phytophthora* sp., (Nennstiel *et al.*, 1998; Nürnberger *et al.*, 1994; Nürnberger *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997)), vor allem jedoch die Abbauprodukte der pflanzlichen und pilzlichen Zellwand. Zu den pflanzlichen Elicitoren, die auch als endogene Elicitoren bezeichnet werden, gehören pektische Fragmente, die oft bei der Infektion durch zellwandabbauende Enzyme freigesetzt werden. Zu den pilzlichen Elicitoren zählen u. a. die Fragmente der pilzlichen Strukturpolysaccharide β -1,3-Glucan und Chitin (u. a. Baureithel *et al.*, 1994; Ebel, 1986).

2.2 Abwehrreaktionen mit Bedeutung für das Pathosystem Mais-*Colletotrichum graminicola*

Die erste Abwehrreaktion des Mais gegen *Colletotrichum*-Befall ist eine Reaktion der direkt attackierten Zellen und besteht in der Bildung einer Papille. Diese wird bereits in den sehr frühen Phasen der Bildung des Penetrationskeils und des Infektionsvesikels beobachtet (Politis & Wheeler, 1973). Hauptbestandteil der Papillen ist Kallose.

In einer weiteren Phase nach der Penetration, die eine räumlich begrenzte, lokale Genaktivierung umfasst (Hahlbrock *et al.*, 1995), kommt es zur Akkumulation von Phenylpropanoiden, die zum Teil antifungale Wirkung haben (Bergstrom & Nicholson, 1999; Nicholson, 1992). Die Aktivierung des Phenylpropanoid-Stoffwechsels ist eine weit verbreitete pflanzliche Abwehrreaktion. Neben der Bildung von Phytoalexinen (Ebel, 1986; Hammerschmidt, 1999 und darin enthaltene Zitate) kommt es auch zur Synthese von sogenanntem Stress-Lignin, welches sich sofort in den die Läsion umgebenden Zellen bildet und dort sowohl eine physikalische Barriere gegen das Fortschreiten des Pathogenwachstums als auch eine chemische Barriere gegen zellwandabbauende Enzyme darstellt (Bergstrom & Nicholson, 1999).

Eine weitere wichtige Abwehrreaktion stellt die systemische Genaktivierung dar (Hahlbrock *et al.*, 1995), die sich nicht mehr auf die unmittelbar penetrierten Zellbereiche beschränkt. Die Bildung von PR-Proteinen, von denen einige bezüglich ihrer Funktion gut charakterisiert sind (Bol *et al.*, 1990), kann hierzu gezählt werden. So werden für zahlreiche Pflanzen u. a. hydrolytische Enzyme wie Chitinasen (PR-3 Proteine) und β -1,3-Glucanasen (PR-2 Proteine) beschrieben. Diese sind vorwiegend gemeinsam in der Lage, Zellwände vegetativer Pilzhyphen zu lysieren (Mauch *et al.*, 1988), welche – zumindestens bei den höheren Pilzen – zu einem Großteil aus den Strukturpolymeren Chitin und β -1,3/ β -1,6-Glucanen bestehen (Sentandreu *et al.*, 1994; Sietsma & Wessels, 1994; Wessels & Sietsma, 1981). Antifungale Wirkung konnte auch in gewissem Umfang für Chitinasen aus Maissamen nachgewiesen werden (Huynh *et al.*, 1992).

Die durch erhöhte Expression von Hydrolasen bedingte gesteigerte Abwehr gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen wird schon von Broglie *et al.* (1991) beschrieben. Sie belegen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Rhizoctonia solani*-Infektionen bei transgenem Tabak (*Nicotiana tabaccum* cv. Xanthi) und Raps (*Brassica napus*), die Chitinase aus der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) exprimieren. Auf dem Prinzip der synergistischen Wirkung von Chitinase und β -1,3-Glucanase (Mauch *et al.*, 1988) basieren Versuche, in denen durch gleichzeitige Expression von Chitinase- und Glucanasegenen transgene Pflanzen über eine effizientere Kontrolle der Pathogenentwicklung verfügen (Jach *et al.*, 1995; Sela-Buurlage *et al.*, 1993).

2.3 Chitin-Fragmente als Elicitoren

Chitin-Fragmente unterschiedlicher Größen sind für zahlreiche Pflanzen als Elicitor beschrieben. Roby *et al.* (1987) konnten zeigen, dass bei der Induktion von Chitinase in Melonen kurzkettige Chitin-Oligomere (Hexa-/Heptamer) am aktivsten sind. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen an Weizen, wo die größte Elicitoraktivität bei Polymerisationsgraden von 4–9 zu finden war (Barber *et al.*, 1989; Vander & Moerschbacher, 1993). Bei Reis erfolgte die Induktion der Chitinase-Aktivität bereits durch Dimere (Vander & Moerschbacher, 1993). Die höchste Induktion der Phytoalexinproduktion und der Membrandepolarisation wurde jedoch durch das Hepta- und Oktamer erzielt (Kuchitsu *et al.*, 1993; Yamada *et al.*, 1993), für welche auch hoch affine Membranbindstellen in der pflanzlichen Plasmamembran charakterisiert werden konnten (Felix *et al.*, 1993). An *Rubus*-Protoplasten wurde der stimulierende Einfluss von Chitin-Tetrameren auf die Phenylalanin-Ammoniumlyase (PAL)-Aktivität und die Synthese von Benzoesäuren festgestellt (Lienart *et al.*, 1993). Umfangreiche Untersuchungen liegen auch zur Elicitorwirkung unterschiedlich großer Chitinfragmente in Tomatenzellkulturen vor (Felix *et al.*, 1998; Felix *et al.*, 1993). Für Oligomere mit einem Polymerisationsgrad (DP) unterhalb drei konnte keine Funktion als Elicitor mehr festgestellt werden (Felix *et al.*, 1998).

Durch die Wirkung pflanzlicher Hydrolasen wird so einerseits das Wachstum pilzlicher Pathogene auf direktem Wege beeinträchtigt, andererseits werden elicitoraktive fungale Zellwandfragmente freigesetzt, die eine Steigerung der pflanzlichen Abwehr weiter stimulieren. Pflanzenpathogene Pilze haben jedoch Mechanismen entwickelt, um sich vor diesen antifungalen Mechanismen zu schützen.

3 Schutzmechanismen des Pathogens

3.1 Zellwandbiogenese und -modifikationen

Zellwandbiogenese

Das apikale Spitzenwachstum ist charakteristisch für pilzliche Hyphen. Es tritt sonst nur beim Wachstum von pflanzlichen Pollenschläuchen und Wurzelhaaren auf. Das *steady state*-Modell (Sietsma & Wessels, 1994; Wessels, 1993), welches Spitzenwachstum und Biogenese der Zellwand beschreibt, stellt den Apex als Region mit plastischer Zellwand dar. Sekretorische Vesikel, die Vorstufen von Zellwandpolymeren und Enzyme enthalten,

fusionieren in der Apexregion mit der Plasmamembran. Die dort neu gebildeten Wandpolymere werden jedoch erst später, während das apikale Wachstum bereits fortgeschritten ist, untereinander vernetzt. Die Quervernetzung der Polymere erfolgt somit maßgeblich im subapikalen Bereich. Die Zellwand gewinnt also erst mit zunehmender Entfernung vom Apex an Stabilität und Festigkeit. Die Tatsache, dass die Vesikel bevorzugt in der apikalen Region fusionieren, wird durch das Modell des *vesicle supply center* (VSC) beschrieben (Bartnicki-Garcia *et al.*, 1995). In höheren Pilzen wird das VSC durch den Spitzenkörper repräsentiert und stellt eine Ansammlung von Vesikeln im Apex dar, die von dort aus in alle Richtungen diffundieren. Eine Manipulation des VSC ermöglicht die Richtungsänderung im Wachstum und die Initiation von Verzweigungen (Bartnicki-Garcia, 1999). Das Cytoskelett, insbesondere die Aktinfilamente, werden ebenfalls als wichtige Komponente für das apikale Spitzenwachstum diskutiert (Heath, 1994; Heath, 1995). Neben dem Transport von Vesikeln entlang der Filamente können sie über assoziierte Proteine zu einer Vernetzung von Plasmamembran und Zellwand beitragen.

Für Chitin, einem wesentlichen Bestandteil der pilzlichen Zellwand, ist die zeitliche Lücke zwischen der Synthese einzelner Chitinketten und der Kristallisation dieser Ketten zu Fibrillen durch mehrere experimentelle Hinweise belegt (Merz *et al.*, 1999). Am Zygomyceten *Mucor rouxii*, der über einen hohen Anteil von Chitosan in der Zellwand verfügt, konnte gezeigt werden, dass Chitosan nur durch ein sequentielles Zusammenwirken von Chitinsynthase und Chitindeacetylase gebildet wird (Davis & Bartnicki-Garcia, 1984a; Davis & Bartnicki-Garcia, 1984b). Die gerade entstandenen Chitinketten werden innerhalb dieser beschriebenen zeitlichen Lücke, also noch vor ihrer Stabilisierung und Kristallisation, in Chitosan umgewandelt. Dabei katalysiert die Chitindeacetylase (EC 3.5.1.41) die Umwandlung von Chitin durch Deacetylierung der N-Acetyl-D-Glucosamin-Reste. Chitin wird unter Anwesenheit von Wasser zu Chitosan und Acetat umgewandelt (vgl. Abb. I.1).

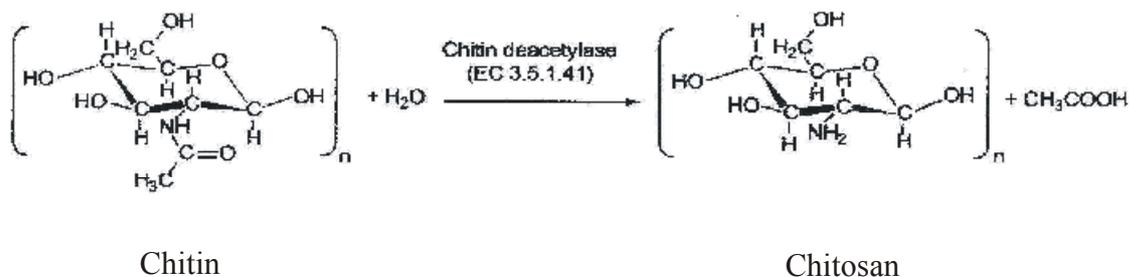


Abb. I.1: Katalytische Wirkung der Chitindeacetylase; verändert nach (Tsigos *et al.*, 2000).

Zellwandmodifikationen

Eine Möglichkeit des Pathogens, sich vor den Abwehrreaktionen der Pflanze zu schützen, stellt die Veränderung seiner Zellwand dergestalt dar, dass sie keine Gelegenheit für einen Angriff pflanzlicher Chitinasen bietet. Dies könnte zum einen durch eine Überlagerung abbaubarer Bestandteile durch solche Komponenten geschehen, die nicht mehr von den hydrolytischen Enzymen angegriffen werden. Für die Zellwand einiger *formae speciales* von *Fusarium oxysporum* konnte gezeigt werden, dass Chitin durch eine äußere Proteinschicht maskiert wird (Schoffemeer *et al.*, 1999). Zum anderen können geringfügige Modifikationen der Zellwandbestandteile dazu führen, dass sie von den Hydrolasen nicht mehr als Substrat erkannt werden. Dabei könnte es genügen, nur einzelne der Zellwandbestandteile zu verändern.

Ein Nachweis für die Veränderung der pilzlichen Zellwand während der Infektion wurde an verschiedenen Systemen erbracht. Dabei wurde hauptsächlich cytochemisch das Vorhandensein und die Verteilung von Chitin mit Hilfe des Lektins WGA (*wheat germ agglutinin*) untersucht.

Nicole & Benhamou (1991) konnten beim Weißfäuleerreger *Rigidoporus lignosus*, der Gummibaumwurzeln befällt, eine spezifische WGA-Markierung an den Hyphen auf der Wurzeloberfläche und an interzellularen Hyphen beobachten, wohingegen intrazelluläre Hyphen nicht markiert waren. Untersuchungen an verschiedenen Rostpilzen, die differenzierte Infektionsstrukturen ausbilden, ergaben, dass Strukturen, die außerhalb des Wirtsgewebes gebildet werden, eine deutliche Markierung mit WGA aufweisen. Demgegenüber waren Strukturen, die im Inneren der Pflanze gebildet werden, nur sehr schwach oder gar nicht markiert (Chong *et al.*, 1986; Deising *et al.*, 1996; Freytag, 1990; Freytag & Mendgen, 1991a; Lasso-Agredo, 1998). Umfangreiche Untersuchungen wurden am Bohnenpathogen *Colletotrichum lindemuthianum* durchgeführt. Hier waren Konidien, Keimschlauch und Appressorien sowie voll entwickelte intrazelluläre Hyphen und vegetative Hyphen mit WGA markiert. Infektionsvesikel und junge intrazelluläre Primärhyphen, welche rasch nach der Penetration gebildet werden, zeigten dagegen keine WGA-Markierung. Die Tatsache, dass bei penetrierenden Hyphen der Apex im Gegensatz zu den älteren Hyphenbereichen nicht markiert wurde, weist darauf hin, dass hier Chitin entweder in geringeren Mengen vorhanden oder schlechter für WGA zugänglich ist (O'Connell *et al.*, 1992; O'Connell & Ride, 1990). Zellwandmodifikationen, die insbesondere die Zugänglichkeit von Chitin betreffen, sind also vor allem beim direkten Kontakt von Pathogen und Wirt zu beobachten. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen die Untersuchungen von Lasso-Agredo (1998)

an *Colletotrichum graminicola*, wo WGA mit hoher Affinität an Konidien, Keimschläuchen und Appressorien band und für Infektionsvesikel und primäre Hyphe keine WGA-Markierung festgestellt werden konnte.

Dass es sich bei diesen Veränderungen nicht nur um eine Überlagerung durch andere Substanzen, sondern um eine enzymatische Modifikation handelt, deuten Untersuchungen von Deising & Siegrist (1995) am Ackerbohnenrost *Uromyces fabae* an. Sie konnten zeigen, dass bei Strukturen, die zu Beginn der Penetration gebildet werden, einerseits die Markierung mit WGA abnimmt und andererseits die Chitindeacetylaseaktivität stark ansteigt.

Auch beim Gurkenpathogen *Colletotrichum lagenarium* konnte mit Beginn der Infektion Chitindeacetylase-Aktivität gemessen werden, die im weiteren Verlauf der Infektion stark anstieg (Siegrist & Kauss, 1990).

Wird Chitin durch Deacetylierung in Chitosan umgewandelt, so wird es nicht mehr von WGA markiert (Goldstein & Poretz, 1986). Grenier *et al.* (1991) konnten mit Hilfe goldmarkierter Chitosanase aus Gerste Chitosan in den Sporen und Zellwänden verschiedener Pilze, darunter auch *Aspergillus niger* und *Colletotrichum lindemuthianum*, nachweisen.

Untersuchungen an endo-Chitinasen von Weizen zeigten, dass diese fast ausschließlich das vollständig acetylierte Substrat umsetzen und nur sehr geringe Aktivität gegenüber Chitosan besitzen (Ride & Barber, 1990). Eine Modifikation der pilzlichen Zellwandkomponente Chitin zu Chitosan würde somit möglicherweise einen wirksamen Schutz der Zellwand vor der Hydrolyse bedeuten und gleichzeitig die Freisetzung elicitoraktiver Chitin-Fragmente einschränken.

3.2 Elicitoraktivität von Chitosan und Vorkommen von Chitosanasen

Die Wirkung von Chitosan als Elicitor ist für die Effektivität der in I. 3.1 dargestellten Schutzstrategie des Pathogens vor dem Abbau durch Hydrolasen von Bedeutung. Dieses ist, wenn auch nur an einigen Systemen, beschrieben. Dabei ist es für die Beurteilung von Bedeutung, stets deutlich zwischen Oligo- oder Polymeren von Chitin bzw. Chitosan zu unterscheiden, sowie diese klar von den partiell N-acetylierten Zwischenstufen beider Stoffe abzugrenzen. Dabei steht Chitin in der Literatur in der Regel einheitlich für die vollständig acetylierte Form des Oligo-/Polyglucosamins, wohingegen die meist unvollständig deacetylierten Oligo-/Polyglucosamine dem Chitosan zugeordnet werden. Wenn aus den Quellen hervorging, dass es sich um die vollständig deacetylierte Form des Oligo-/Polyglucosamins handelt, so ist dieses in den weiteren Beispielen erwähnt. Kauss *et al.* (1989) sowie Hadwiger (1999) stellten fest, dass Polymerisationsgrad (DP) und (De-)

Acetylierungsgrad des Chitosans für seine Aktivität als Elicitor von entscheidender Bedeutung sind. Der Grad der Kalloseinduktion in Zellsuspensionen von *Catharanthus roseus* stieg mit der Zunahme des Polymerisationsgrades von Chitosan stetig an (Kauss *et al.*, 1989; Kauss *et al.*, 1990). Ausführliche Untersuchungen dazu wurden von Vander *et al.* (1998) an Weizen durchgeführt. Sie konnten zeigen, dass vollständig deacetylierte Chitosan-Oligomere keine Elicitoraktivität besitzen, wohingegen Chitin-Oligomere einen Anstieg der Peroxidase-Aktivität in den Pflanzen induzieren. Partiiell N-acetyliertes, polymeres Chitosan war dahingegen in der Lage, sowohl Peroxidase- als auch PAL-Aktivität zu induzieren. Auch Kobayashi *et al.* (1994) beurteilten partiell N-deacetylierte Chitinfragmente als sehr effektive Elicitoren in der Erbse. Dabei ist ihre Wirkung auf die pflanzliche Abwehr mit der des abiotischen Elicitors CuCl_2 zu vergleichen (Akiyama *et al.*, 1994).

An Reiszellkulturen wurde die Diterpen-Synthese durch Chitosan im Vergleich zu Chitin nur sehr schwach ausgelöst (Ren & West, 1992) und Yamada *et al.* (1993) stellten für Chitosan-Oligomere nicht die für Chitin-Oligomere beschriebene Induktion der Phytoalexinsynthese fest. An Tomaten konnte gezeigt werden, dass Chitosan als Elicitor an der Hemmung der lichtinduzierten Öffnung der Stomata über einen H_2O_2 -*pathway* beteiligt ist. Lee *et al.* (1999) deuteten dieses als eine Möglichkeit einem invasiven Eindringen des Pathogens in tiefere Zellschichten vorzubeugen. Kauss und Mitarbeiter zeigten, dass vollständig deacetyliertes Chitosan (Polymerisierungsgrad 26) im Vergleich zu partiell deacetyliertem Chitosan nur geringe H_2O_2 -Bildung auslöst (Kauss *et al.*, 1997).

Neben seiner Elicitor-Aktivität konnte für Chitosan eine antifungale Wirkung nachgewiesen werden (Allan & Hadwiger, 1979) und auch die Induktion einiger PR-Gene (bzw. deren Promotoren) wurde beschrieben (Hadwiger *et al.*, 1986; Hadwiger *et al.*, 1997; Loschke *et al.*, 1983). Untersuchungen an *Rhobus* und Weizen stellten die Induktion der Einlagerung von Lignin als charakteristische Reaktion auf Chitosan oligomere heraus (Köhle *et al.*, 1984; Vander *et al.*, 1998).

Nur wenige Berichte finden sich, in denen gezeigt wurde, dass Chitosan-Oligomere (Hexa- und Heptamer) im Gegensatz zu ihren acetylierten Formen als Elicitoren wirken. Kendra & Hadwiger (1984) konnten eine maximale Phytoalexinproduktion in Erbsenschoten beim Chitosan-Heptamer feststellen. Weit häufiger sind dagegen Ergebnisse, in denen gerade die Oligomere des Chitosans als Elicitor geringe Wirkung haben, wie z. B. beim Weizen (Kendra & Hadwiger, 1984; Vander *et al.*, 1998). Auch Kauss *et al.* (1989) zeigten, dass Chitosan nur in höheren Polymerisationsgraden als Elicitor wirksam ist. Chitosan-Fragmente bis zu einem DP von 14 sind meist bezüglich der Kallose-Induktion inaktiv (Hadwiger, 1999). Oligomere

mit weniger als 6 Zuckereinheiten verlieren ihre Pisatin-elicitierenden Fähigkeiten in Erbsen vollständig (Hadwiger *et al.*, 1994).

Inwiefern das Chitosan, das durch die Wirkung von Chitindeacetylasen in der pilzlichen Zellwand entsteht, während der Pathogenese Elicitor-Aktivität besitzt, ist schwer einzuschätzen, da seine Zusammensetzung (Polymerisations- und (De-)Acetylierungsgrad) nicht klar definiert ist. Diese Parameter besitzen jedoch wesentlichen Einfluss auf diese Eigenschaft.

Auffällig gering sind die Kenntnisse zum Vorkommen pflanzlicher Chitosanasen. Grenier und Mitarbeiter (Grenier & Asselin, 1990; Grenier *et al.*, 1993) konnten Chitosanasen nach Induktion durch chemische Stressoren in Gerste, Gurke und Tomate nachweisen. Zwei der gefundenen Enzyme waren in der Lage, Sporen von *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo-artum* und *Ophiostoma ulmi* zu lysieren, wohingegen Sporen zweier Basidiomyceten und eines Deuteromyceten nicht lysiert wurden. Es kann also nicht von einer direkten antifungalen Wirkung gesprochen werden, sondern vielmehr werden durch die Freisetzung Elicitor-aktiver Fragmente die allgemeinen pflanzlichen Abwehrmechanismen stimuliert. In Mais- und Erdnuss sämlingen konnte Chitosanase-Aktivität durch Behandlung mit Crustaceen-Chitosan, durch Inokulation mit *Bacillus subtilis* und durch Infektion mit *Aspergillus flavus* induziert werden (Cuero & Osuji, 1993; Cuero & Osuji, 1995).

Die Modifikation von Chitin in der pilzlichen Zellwand durch Chitindeacetylasen scheint somit trotz aller Unklarheiten eine geeignete Strategie darzustellen, die pflanzlichen Abwehrmechanismen soweit hinauszuzögern, bis sich das Pathogen erfolgreich im Wirt etabliert hat.

4 Pilzliche Chitindeacetylasen

4.1 Chitindeacetylasen aus nicht-pathogenen Organismen

Chitindeacetylasen sind schon seit längerer Zeit aus Pilzen der Gruppe der Zygomyceten bekannt, bei denen Chitosan ein wesentlicher Bestandteil der Zellwände ist (Wessels & Sietsma, 1981). Erstmals wurde eine Chitindeacetylase von Araki & Ito (1975) bei *Mucor rouxii* beschrieben. Da Zygomyceten einen hohen Gehalt an Chitosan aufweisen und eine entsprechend hohe Chitindeacetylase-Aktivität besitzen, bot sich *Mucor rouxii* als Modellorganismus für zahlreiche Untersuchungen zur Charakterisierung und Isolierung des

Enzyms an. Neben der Reinigung der Chitindeacetylase (Kafetzopoulos *et al.*, 1993b) und der Klonierung der cDNA (Kafetzopoulos *et al.*, 1993c; Kafetzopoulos *et al.*, 1993d) wurde auch der Mechanismus des Zusammenwirkens von Chitinsynthase und Chitindeacetylase bei der Zellwandbildung aufgeklärt (Davis & Bartnicki-Garcia, 1984 a; Davis & Bartnicki-Garcia, 1984 b).

Sequenzvergleiche zeigten, dass verschiedene kurze, hochkonservierte Bereiche hohe Homologien zu der Gruppe der NodB-Proteine aufweisen. Die Gruppe der NodA-, NodB- und NodC-Gene, welche die am weitesten verbreiteten Nodulationsgene darstellen, sind bei den Rhizobien hoch konserviert. Sie sind in Signalketten involviert, welche die Entwicklung der Knöllchen in den Wurzeln der Wirtsleguminosen auslösen (Hirsch, 1992). Das NodB-Protein deacetyliert den nichtreduzierten N-Acetylglucosamin-Rest der Chitooligosaccharid-Moleküle. Somit spiegelt sich die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz zwischen den Chitindeacetylasen und NodB-Proteinen auch auf funktioneller Ebene wieder (John *et al.*, 1993; Kafetzopoulos *et al.*, 1993d). Eine weitere Chitindeacetylase eines Zygomyceten (*Absidia coerulea*) wurde von Gao *et al.* (1995) gereinigt, charakterisiert und lokalisiert.

Man findet Chitosan aber auch bei Vertretern der Asco- und Basidiomyceten. Dort tritt es jedoch meist nur in sehr geringen Mengen und häufig nur in bestimmten Phasen des Lebenszyklus des Organismus auf. Nachdem Chitosan in den Zellwänden der Sporen von *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden konnte (Briza *et al.*, 1988), wurden auch zwei sporulationsspezifische Chitindeacetylase-Gene nach Sequenzvergleichen isoliert (Christodoulidou *et al.*, 1996). Alfonso (1995) konnte eine extrazelluläre Chitindeacetylase mit einem geschätzten Molekulargewicht von 27 kDa in *Aspergillus nidulans* nachweisen.

4.2 Chitindeacetylasen aus phytopathogenen Pilzen

Die Arbeiten zu Chitindeacetylasen aus pflanzenpathogenen Pilzen konzentrieren sich neben dem Ackerbohnenrost (*Uromyces fabae*) vor allem auf Pilze der Gattung *Colletotrichum*.

Deising & Siegrist (1995) verfolgten die Aktivität der Chitindeacetylase (5 Isoformen) in *Uromyces fabae*. Sie konnten eine streng entwicklungsspezifische Kontrolle des Enzyms feststellen, wobei die maximale Aktivität in Infektionsstrukturen, welche unmittelbar nach Penetration in das Wirtsgewebe gebildet wurden, nachgewiesen wurde.

Innerhalb der Gattung *Colletotrichum* ist das Enzym des Bohnenpathogens *C. lindemuthianum* am umfangreichsten untersucht. Neben Isolierung und Reinigung des Proteins (Kauss *et al.*, 1982) wurden zahlreiche Untersuchungen zur biochemischen

Charakterisierung durchgeführt (Kauss & Bauch, 1988; Tsigos & Bouriotis, 1995). Erst vor kurzem gelangen Klonierung und Sequenzierung der cDNA sowie Expressionstudien dieses Gens (Tokuyasu *et al.*, 1999a; Tokuyasu *et al.*, 1999b). Ebenfalls gut charakterisiert sind die Chitindeacetylasen von *Colletotrichum graminicola* (Werner, 1997) und von *Colletotrichum lagenarium*, einem Pathogen auf Gurke und Melone (Siegrist & Kauss, 1990; Siegrist & Kauss, 1993). Eine Gemeinsamkeit mit dem Rostenzym und ein wesentlicher Unterschied zu den Chitindeacetylasen der nicht-pathogenen Zygomyceten besteht darin, dass die Aktivität dieses Enzyms bei *Colletotrichum* sp. praktisch vollständig extrazellulär vorliegt. Die Hauptaufgabe scheint hier somit nicht nur in der Deacetylierung entstehender Chitin-Stränge, sondern vielmehr auch in der Modifikation bereits vorhandener Strukturen zu bestehen. Dies können das in der Zellwand gebundene Chitin oder die durch Hydrolyse der Zellwand freigesetzten Chitin-Oligomere sein. Da Porendurchmesser von ca. 0,5–2,3 nm in pilzlichen Zellwänden gefunden wurden (Schüßler *et al.*, 1995), die nur Molekülen von 15 bis maximal 20 kDa freie Diffusion ermöglichen (Money, 1990), sollte die modifizierende Wirkung der Chitindeacetylasen auf die Oberfläche der Hyphen beschränkt bleiben.

Siegrist und Kauss (1990) untersuchten die Chitindeacetylase-Aktivität während der frühen Phasen der Interaktion zwischen *Colletotrichum lagenarium* und Gurke. Die Tatsache, dass während der Infektion von Gurkenblättern ansteigende Aktivitäten der Chitindeacetylase gemessen werden konnten, weist auf die mögliche Bedeutung dieser Enzymaktivität für das Pathogen während dieser Phase der Interaktion hin. Vergleichbare Ergebnisse brachten auch die Untersuchungen während der Infektion von Maisblättern durch *Colletotrichum graminicola* (Werner, 1997). Beim Rostpilz *Uromyces fabae* deutete die differenzierungsspezifische Regulation der extrazellulären Chitindeacetylasen an, dass sie für eine Besiedlung der Interzellularräume des Ackerbohnenblattes notwendig sind (Deising & Siegrist, 1995).

5 Chitindeacetylase in *Colletotrichum graminicola* - Ziele der Arbeit

Chitin ist in pflanzenpathogenen Pilzen, besonders bei solchen, die in ihren Appressorien erhebliche Turgordrücke für eine Kraftpenetration aufbauen, ein entscheidendes strukturgebendes Polymer der Zellwand. Sowohl bei Pilzen, die natürliche Öffnungen der Blätter für die Penetration nutzen (z. B. verschiedene Rostpilze) als auch bei solchen, die

direkt durch die intakte Cuticula in das Blatt der Wirtspflanze einwachsen, kommt es während der Penetration zur Deacetylierung des Chitins zu Chitosan auf der Oberfläche der penetrierenden Hyphen. Bisher publizierte Daten deuten darauf hin, dass die Chitindeacetylasen während der Pathogenese für den Schutz von Infektionsvesikel und primärer Hyphe vor antifungalen Hydrolasen für die invasiven Fähigkeiten bei der Penetration des Wirtsgewebes von Bedeutung sind (Mendgen *et al.*, 1996). Neben der Lyse der Pilzhyphen könnte auch die Freisetzung elicitoraktiver Chitinfragmente durch die Wirkung der Chitindeacetylase vermindert werden. Bei pflanzenpathogenen Pilzen fehlen bisher jedoch stringente Untersuchungen durch Geninaktivierung und Überprüfung von Virulenz und Pathogenität der Mutanten.

Die Chitindeacetylase von *C. graminicola* wurde biochemisch charakterisiert. Untersuchungen zur Veränderung der Enzymaktivität wurden während der Pathogenese durchgeführt (Werner, 1997). In diesen konnte eine signifikante Steigerung der Chitindeacetylaseaktivität 2 Tage nach Inokulation festgestellt werden, welche sich nach weiteren 2 Tagen erneut stark erhöhte.

Weiterhin konnten Zellwandmodifikationen von *in vitro*-gebildeten Infektionsstrukturen von *C. graminicola* während der Pathogenese sichtbar gemacht werden. Erste Untersuchungen deuten darauf hin, dass mit der Bildung von Appressorien und darauffolgenden Infektionsstrukturen das Chitin auf den Hyphenoberflächen zu Chitosan umgesetzt wird (Lasso-Agredo, 1998).

Die vorhandenen Daten lassen also vermuten, dass die Chitindeacetylase von *C. graminicola* für die erfolgreiche Infektion von entscheidender Bedeutung ist und möglicherweise durch ihre Aktivität erste Abwehrmechanismen der Pflanze erfolgreich unterlaufen werden können.

Die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Dissertation verfolgen das Ziel, diese Vermutung durch gezielte Veränderungen im Chitindeacetylaseaufkommen von *C. graminicola* zu verifizieren. Dabei bezieht sich das Vorgehen auf drei Untersuchungsbereiche. Neben der Identifizierung und Klonierung des Gens für die Chitindeacetylase in *C. graminicola* wurden umfangreiche Analysen zur Regulation der Genexpression durchgeführt. Um zu überprüfen, inwieweit die Chitindeacetylase zu einer erfolgreichen Infektion des Pathogens beiträgt und ob sie möglicherweise sogar eine

Virulenz- oder Pathogenitätsdeterminante darstellt, wurden Chitinacetylase1-defiziente Mutanten hergestellt und im Infektionstest überprüft. Dabei stellten die Zugänglichkeit eines großen Spektrums molekulargenetischer Methoden sowie die gute genetische Manipulierbarkeit von *C. graminicola* (Panaccione *et al.*, 1988) einschließlich der Möglichkeit zur effizienten Transformation und knock-out-Mutagenese einen entscheidenden Vorteil bei den Arbeiten dar. Licht- und Elektronenmikroskopische Methoden erlauben es, die Wirkungsweise einzelner Gene zu charakterisieren.

Colletotrichum Species stellen wichtige Pathogene dar. Eine bessere Kenntnis möglicher Virulenzfaktoren könnte helfen, alternative Bekämpfungsstrategien zu entwickeln. Genauere Informationen über prinzipielle Abläufe und Regulationsmechanismen des Infektionsverlaufes könnten auch auf andere Pathosysteme übertragen werden und so bei diesen zur schnelleren Entwicklung wirksamer Bekämpfungsstrategien beitragen.

II Material und Methoden

1 Biologisches Material

1.1 Pilzmaterial und *in vitro*-Infektionsstrukturen

1.1.1 Isolate und Kulturbedingungen

Das Isolat M2 von *Colletotrichum graminicola* wurde als Wildtyp verwendet (Anderson & Nicholson, 1996; Bergstrom & Nicholson, 1999). Die melanindefiziente Mutante CgM1.502 von *C. graminicola* (Rasmussen & Hanau, 1989) wurde für die Markierungsversuche der Appressorien verwendet. Die Kultivierung erfolgte auf Haferflockenagar (5 % (w/v) zerkleinerte Haferflocken, 1,2 % (w/v) Agar-Agar) bei Raumtemperatur unter Schwarzlicht (Philips TL-D 36 W/ 08), um die Konidienbildung zu stimulieren. Flüssigkulturen wurden mit Kompletmedium (CM, modifiziert nach Leach *et al.* (1982), Rezept s. Anhang VII.1) angesetzt und unter Schütteln (110 rpm) bei 21°C inkubiert. Kulturen, aus denen Konidien für Transformations-Versuche gewonnen werden sollten, wurden stehend bei Raumtemperatur für 7-10 Tage inkubiert. Bei Versuchen mit Schüttelkulturen (21°C, 110 rpm) wurde festgestellt, dass *C. graminicola* in Saccharose-Medium (0,5 M Saccharose, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt) verstärkt ovale Konidien bildet, welche nach Epstein (1998) besonders für die Protoplastierung und nachfolgende Transformation geeignet sind. Die Kulturen, die in diesem Medium angesetzt wurden, konnten nach 2-3 Tagen Kultivierung (21°C, 110 rpm) für eine Transformation eingesetzt werden.

1.1.2 *in vitro*-Infektionsstrukturen

Konidien von *C. graminicola* wurden mit H₂O_{dest} von Agarplatten abgewaschen und in einer 500fach verdünnten Kartoffeldextrose-Lösung (Difco Laboratories GmbH, Augsburg; unverdünnt: 24 g/l) auf ca. 10⁴ Sporen/ml eingestellt. Davon wurden 20-100 µl Tropfen auf sterile Glas-Objektträger gesetzt und bei 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach 20-24 Stunden wurden die Strukturen im Mikroskop betrachtet. Um die Bildung intrazellulärer Infektionsstrukturen zu induzieren, wurden die Objektträger nach einer verlängerten Inkubationszeit der Konidien von ca. 36-48 Stunden in Kartoffeldextrose-Lösung für mindestens 48 Stunden in 3M Glycerol gelagert. Eine Inkubation der Konidien suspension auf Tageslichtprojektor-Folien (Nr. 3558, Avery Dennison Zweckform, Holzkirchen) anstatt der

Glas-Objektträger führte zur vermehrten Differenzierung von Appressorien. Jedoch wurden für die meisten Versuche die Glasobjektträger bevorzugt, da sie sich bei der häufig anschließenden Immunmarkierung besser handhaben ließen.

1.2 Pflanzenmaterial und Infektionsversuche

Wenn nicht ausdrücklich auf andere Sorten hingewiesen wird, wurden Maispflanzen der Sorte Mutin (*Zea mays* cv. Mutin) für Infektionsversuche genutzt. Bei den Untersuchungen zum Wirtspflanzenspektrum der Transformanten und des Wildtyps wurden neben Silomais der Sorte Mutin auch die Silomais-Kultivare Kanzler, Banguy und eine Zuckermaissorte verwendet. Gleichfalls erfolgten Infektionsversuche auf Roggen (cv. Kühnfeld, cv. Danae, cv. Borellus), Triticale (cv. Lupus, cv. Modus), Gerste (cv. Grete) und Weizen (cv. Alcedo). Alle Pflanzen wurden im Gewächshaus unter natürlichen Lichtbedingungen (16 Stunden Tagbedingungen, 8 Stunden Nachtbedingungen) angezogen.

Für Infektionsversuche wurden zum einen die jüngsten voll ausgebildeten Blätter von 14-21 Tage alten Pflanzen abgeschnitten und mit 10-20 µl Tropfen einer Sporensuspension (10^5 - 10^6 Sporen/ml H_2O_{dest} , wie unter Gldpkt. II.1.1.2 gewonnen) inokuliert. Die Blätter wurden bei 100 % Luftfeuchte inkubiert. Die Entwicklung von Symptomen wurde makroskopisch und mikroskopisch über mehrere Tage hinweg verfolgt. Weiterhin wurden ganze Pflanzen mit einer Sporensuspension (10^5 - 10^6 Sporen/ml H_2O_{dest} , wie unter Gldpkt. II.1.1.2 gewonnen in 0,01 % (v/v) Tween20) mittels eines Haarlackzerstäubers (eingesetztes Volumen 20 ml) besprüht und für 24 Stunden in einer feuchten Kammer inkubiert. Die weitere Kultivierung der inokulierten Pflanzen erfolgte entsprechend der verwendeten Pilzisolat getrennt. Die Entwicklung von Symptomen wurde auch hier makroskopisch und mikroskopisch über mehrere Tage hinweg verfolgt.

Die Kontrollpflanzen wurden der jeweiligen Methode entsprechend mit H_2O_{dest} behandelt.

Um eine Induktion pflanzlicher Abwehrmechanismen zu bewirken, wurden ganze Maispflanzen mit Salicylsäure (SA, 30 mM, 0,01 % (v/v) Tween20) besprüht (Bartholomae, 1994). Der Induktionserfolg wurde mittels Western-Blot (anti Tabak-PR-1a Antikörper (White *et al.*, 1987)) verifiziert. Nach Inkubation für 24 Stunden in einer feuchten Kammer erfolgte die Inokulation mit *C. graminicola*.

1.3 Anzucht und Kultur von Bakterien

Escherichia coli (Stämme XL1BlueMRF', DH10 β und TOP 10) wurden bei 37°C auf LB-Platten (1 % (w/v) Bactotrypton, 1 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,5 % (w/v) Agar-Agar) kultiviert. Flüssigkulturen in LB-Medium (wie oben, jedoch ohne Agar-Agar-Zusatz) wurden aus Einzelkolonien angeimpft und bei 37°C und 220 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Für kürzere Zeiträume (bis max. 4 Wochen) wurden die Platten bei 4°C gelagert, für eine längere Aufbewahrung wurde eine Flüssigkultur auf 40 % (v/v) Glycerin bzw. 7 % (v/v) DMSO eingestellt und bei -70°C eingefroren. Transformierte Bakterien mit einer Ampicillin-Resistenzkassette wurden auf die gleiche Art kultiviert, nur dass den Medien 100 μ g/ml Ampicillin zugefügt wurde.

2 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bzw. Fisher Scientific (Schwerte) bezogen. Feinchemikalien stammen von Sigma (Deisenhofen). Bezugsquellen für Enzyme, Kits oder spezielle Reagenzien sind an der entsprechenden Stelle im Text genannt.

Synthetische Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen. Die Sequenzen aller in dieser Arbeit benutzten Primer finden sich im Anhang (VII.2).

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.1.1 Präparation genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach dem Protokoll von Döbbling *et al.* (1997). Dazu wurde ca. 0,5 g Pilzmycel unter flüssigem Stickstoff zerrieben, in 800 μ l Extraktionspuffer 1 (7 M Harnstoff, 2 % (w/v) SDS, 5 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen und mit 1 Volumen Phenol:Chloroform (1:1; Qbiogene, Heidelberg; VEB Berlin-Chemie, Berlin-Adlershof) extrahiert. Durch Zentrifugation (5 min, 20800 g) wurden die Phasen getrennt und die obere wässrige Phase erneut mit 1 Volumen Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 1 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 6800 g) sedimentiert. Das Pellet wurde dann in 700 μ l Tris-EDTA-

Puffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) aufgenommen und die RNA durch Zugabe von 3,5 µl DNase-freier RNase A (10 mg/ml, hitzebehandelt; Roche Diagnostics, Mannheim) verdaut (30 min, 37°C). Der Verdau wurde durch Zugabe von 17,5 µl 20 % (w/v) SDS gestoppt. Dem schloss sich ein Proteinase K Verdau an (60 min bei 60°C mit 10 µl einer 14-22mg/ml Proteinase K Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim)). Die Proben wurden dann mit 1 Volumen Phenol:Chloroform (1:1) extrahiert, die DNA mit 1 Volumen Isopropanol gefällt (10 min, 20800 g) und mit 70 % EtOH gewaschen (5 min, 20800 g). Nach der vollständigen Trocknung in der Speed-vac wurde die DNA in 50 µl 0,1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Zur Unterstützung des Lösungsvorganges wurden die Proben für 10 min bei 37°C inkubiert.

3.1.2 Schnelle Präparation genomischer DNA zum Einsatz in der PCR

Um mit geringem Arbeitsaufwand und hoher Zuverlässigkeit eine große Zahl von *Colletotrichum*-Transformanten untersuchen zu können, war es notwendig, eine vereinfachte Methode der DNA-Präparation anzuwenden. Dazu wurden 500 µl Kompletmedium in einem 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß mit einem kleinen Stück einer Pilzkultur angeimpft und ca. 1 Woche stehend bei RT inkubiert. Das entstandene Mycel wurde durch Zentrifugation (5 min, 20800 g) in der Eppendorf-Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge 5417 R, Rotor F45-30-11) pelletiert, mit 0,5 ml H₂O_{dest} gewaschen, erneut zentrifugiert und in 50 µl 0,1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen. Nach der Zerkleinerung des Mycels mit einem Mikropistill wurden weitere 450 µl 0,1x TE-Puffer zugegeben. Dem schloss sich eine Phenol/Chloroform-Extraktion an. Dazu wurden die Proben mit 500 µl Phenol:Chloroform (1:1) gemischt und die Phasen durch Zentrifugation (5 min, 20800 g) getrennt. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 400 µl Isopropanol gefällt, welchem zur Unterstützung der Fällung Glycogen (200 ng/µl Endkonzentration) und 50 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,2, zugesetzt wurden. Nach Zentrifugation (15 min, 20800 g) wurde die sedimentierte DNA in 70% EtOH gewaschen (10 min, 20800 g), in der Speed-vac getrocknet und zuletzt in 20 µl 0,1x TE-Puffer (10 min, 37°C) gelöst. Von dieser Präparation wurden 0,5 µl (50-200 ng) für einen 10 µl PCR-Ansatz eingesetzt.

3.1.3 Präparation von Plasmid- und Cosmid-DNA

3 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Um für Sequenzierungen die

höchstmögliche Reinheit zu erhalten, wurde der optionale Waschschrift mit PB-Puffer immer durchgeführt und nach Zugabe des PE-Waschpuffers eine 2-5-minütige Inkubation eingefügt.

3.1.4 Präparation von Gesamt-RNA

Für die RNA-Isolierung wurden zum Schutz vor RNasen alle Lösungen mit DEPC behandelt, Kunststoff-Einmalartikel (Pipettenspitzen, Eppendorfreaktionsgefäße) mit DEPC-H₂O_{dest} gespült und Glaswaren für 3 h bei 200°C gebacken. Die Präparation erfolgte nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (1987).

500 mg Mycel aus Flüssigkultur bzw. Blattmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff zu Pulver zerrieben und in 5 ml Guanidin-Lösung (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Na-Citrat, pH 7,0, 0,5 % (w/v) Sarcosyl, 0,1 M β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Da nach Werner (1997) das Enzymmuster der Chitinacetylase variiert, je nachdem, ob sich der Pilz auf einer festen Unterlage oder in Flüssigkultur befindet, wurde ebenfalls RNA aus Mycel gewonnen, welches auf Haferflockenagar-Platten kultiviert wurde. Um Kontaminationen mit dem Agar zu vermeiden, wurde die Sporensuspension (s. Gldpkt. II.1.1.2) auf eine Cellophanfolie, welche auf einer Agar-Platte lag, ausplattiert. Das vorhandene Pilzmycel wurde nach 48 Stunden von den Cellophan-Folien getrennt und 500 mg Mycel in 5 ml Guanidin-Lösung aufgenommen. Appressorien wurden auf 2 DINA4-Folien, wie unter II.1.1 beschrieben, induziert, mit der Kante eines Lineals abgekratzt und in insgesamt 5 ml Guanidin-Lösung aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Ultra-Turrax. Anschließend wurden nacheinander 0,5 ml 2 M Na-Acetat, pH 4,0, 5 ml Phenol und 1 ml Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und 10 sec auf hoher Stufe gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde 20 min bei 10000 g zentrifugiert (4°C), die wässrige Phase mit 5 ml Isopropanol versetzt und die RNA für mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Danach wurde erneut 20 min bei 10000 g zentrifugiert (4°C), das Pellet in 0,8 ml Guanidin-Lösung gelöst, in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und die RNA nochmals mit 0,8 ml Isopropanol gefällt (1 h bei -20°C). Nach einer weiteren Zentrifugation (10 min, 20800 g, 4°C) wurde das Pellet mit 75 % EtOH gewaschen, an der Luft oder kurz in der Speed-vac getrocknet und schließlich in 100 µl DEPC behandeltem H₂O_{dest} resuspendiert. Um die Lösung der Pellets zu unterstützen, wurde 10 min bei 65°C inkubiert und die RNA anschließend bei -70°C gelagert.

3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA-Agarose Gele

Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0,8-2 % (w/v) Agarose (Seakem[®] LE-Agarose; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) in TAE-Puffer (40 mM Tris, pH 8,3, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA) hergestellt. Durch Erhitzen in der Mikrowelle wurde die Agarose gelöst und in einen Träger gegossen. Die Proben wurden mit 1/5 Volumen Probenpuffer (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, auf das Gel aufgetragen und in TAE-Puffer bei konstanter Spannung (80–140 V) getrennt. Anschließend wurden die Proben in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) für 20–45 min gefärbt und das Ergebnis auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 320 nm mit Hilfe einer Videodokumentationsanlage (AlphaImager, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) aufgezeichnet.

Denaturierende RNA-Agarose Gele

1 % (w/v) Agarose in RNA-Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, pH 7,0, 1 mM EDTA; DEPC-behandelt) wurde durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, nach Abkühlen auf 50–60°C auf 1,9 % (v/v) Formaldehyd eingestellt und in einen Träger gegossen. 10–15 µg Gesamt-RNA (in 3–5 µl H₂O_{dest/DEPC}) wurden mit einem vierfachen Volumen Probenpuffer (55 % (v/v) Formamid, 11 % (v/v) 10x RNA-Laufpuffer, 6,5 % (v/v) Formaldehyd, 7 % (v/v) H₂O_{dest/DEPC}, 7 % (v/v) Glycerin, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt, 15 min bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 3 V/cm Elektrodenabstand. Nach dem Lauf wurde das Gel auf dem UV-Tisch betrachtet und entsprechend den DNA-Agarose-Gelen dokumentiert.

3.3 Hybridisierungen

3.3.1 Herstellung von Hybridisierungs-Sonden

Aus Genfragmenten, die in Plasmiden vorlagen, wurden Sonden mittels einer Standard-PCR (s. Gldpkt. II.3.4) mit Digoxigenin markiert. Dazu befand sich in den Reaktionsansätzen ein spezieller DIG-dNTP-Mix. Die Endkonzentration der Nukleotide darin betrug: je 0,2 mM dATP, dCTP und dGTP, 0,13 mM dTTP und 0,07 mM DIG-dUTP (alkali-labil; sämtliche von

Roche Diagnostics, Mannheim). Der Erfolg der Markierung wurde anhand des veränderten Laufverhaltens im Agarose-Gel überprüft.

3.3.2 Southernblots

Transfer

Genomische DNA bzw. Cosmid-DNA wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen vollständig verdaut (s. Gldpkt. II.3.5.1) und im 0,8 %igen Agarose-Gel aufgetrennt (s. Gldpkt. II.3.2). Um einen besseren Transfer der größeren Fragmente auf die Nylon-Membran zu erreichen, wurde die DNA depuriniert (20 min unter Schütteln bei RT in 0,25 M HCl inkubieren). Die Depurinierung führt zu Strangbrüchen. Dem folgte ein kurzer Waschschrift in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und die Neutralisierung des Gels (20 min bei RT in 0,4 M NaOH). Anschließend wurde die DNA über einen alkalischen, abwärts gerichteten Kapillartransfer für 1,5 h auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) geblottet (Brown, 1999).

Die Transfereinheit war wie folgt aufgebaut: Zunächst ein ca. 3 cm hoher Stapel aus Papierhandtüchern, etwas größer als das Gel zugeschnitten, darauf 5 Filterpapiere (Whatman 3MM) in derselben Größe, wovon das oberste in Transferpuffer (0,4 M NaOH) getränkt war und anschließend die Membran, ebenfalls in Puffer angefeuchtet. Das Gel wurde luftblasenfrei aufgelegt. Darauf kamen 3 angefeuchtete Filterpapiere in Gelgröße und obenauf 2 größere Filterpapiere, die die Verbindung zwischen der Transfereinheit und dem danebenstehenden Pufferreservoir herstellten (vgl. Abb. II.1).

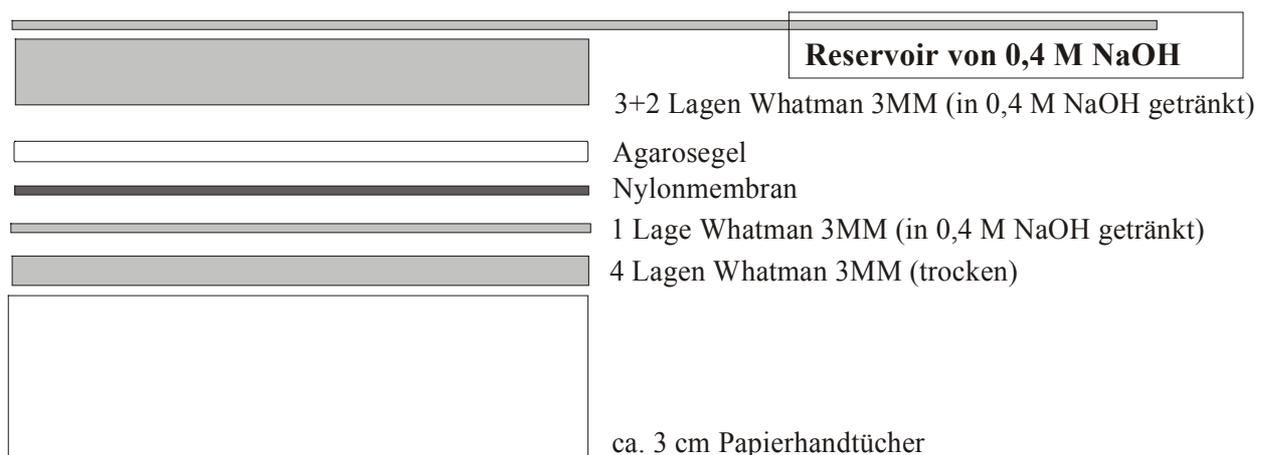


Abb. II.1: Aufbau der Transfereinheit (nach Brown (1999)).

Nach dem Transfer wurde die Membran zur Neutralisierung kurz in 2x SSC (SSC: 150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0) geschwenkt und an der Luft getrocknet. Eine weitere Fixierung war nicht nötig, da die DNA bereits durch die alkalischen Bedingungen während des Transfers kovalent an die positiv geladene Membran gebunden wurde.

Hybridisierung

Zunächst wurde für 1-2 h eine Prähybridisierung mit Hybridisierungspuffer (5x SSC, 0,1 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) Blocking reagent (Roche Diagnostics, Mannheim)) bei 60-65°C (Hybridisierungstemperatur) durchgeführt. Anschließend wurde die denaturierte Sonde (10 min, 100°C) zum Hybridisierungspuffer zugegeben und über Nacht bei 60-65°C in einem Hybridisierungs-Inkubator (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) hybridisiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 2 mal 5 min bei RT mit 2x Waschlösung (2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) und 2 mal 15 min bei der Hybridisierungstemperatur mit 0,5x Waschlösung (0,5x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen.

Nachweis der DIG-markierten Sonde

Die Membran wurde zunächst für 1 min in Waschpuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,3 % (v/v) Tween 20) äquilibriert und dann 30-60 min blockiert (1 % Blocking reagent in Waschpuffer). Anschließend folgte eine Inkubation für 30 min in Antikörperlösung (1:10000 anti-DIG-AP-Fab-Fragmente (Roche Diagnostics, Mannheim) in Blockierungslösung). Überschüssiger Antikörper wurde durch Schwenken in Waschpuffer (2 mal 15 min) entfernt, die Membran wurde dann kurz in Detektionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl) äquilibriert und zwischen zwei Plastikfolien mit dem Substrat CSPD (1 % (v/v) in Detektionspuffer; Roche Diagnostics) 15 min bei 37°C inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Membran luftblasenfrei zwischen den Folien eingeschweißt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) aufgelegt. Die Expositionsdauer richtete sich nach der Stärke des Signals. Der Film wurde in einem Röntgenfilmentwicklungsgerät (Optimax TR, MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

3.3.3 Kolonie-Hybridisierung

Die Kolonie-Hybridisierung wurde zum *Screening* einer genomischen DNA-Bank von *C. graminicola* eingesetzt. Als Sonde diente ein mit Digoxigenin markiertes Chitinacetylase-Fragment aus *Colletotrichum lindemuthianum*.

Zunächst wurde ein Rundfilter aus positiv geladener Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) auf eine LB_{Amp}-Platte aufgelegt. Darauf wurden die Bakterien in einer Dichte ausplattiert, die eine Unterscheidung von Einzelkolonien ermöglichte. Anschließend wurden Replika hergestellt, indem eine neue, zuvor auf LB_{Amp}-Platten angefeuchtete Membran zwischen zwei Whatman-Filterpapieren (Whatman, Clifton, NJ, U.S.A.) auf die bewachsene Membran aufgepresst wurde. Nach Inkubation der Replika-Filter über Nacht bei 37°C waren auch auf diesen Kolonien zu erkennen. Sie konnten nun für die Hybridisierung vorbereitet werden. Dazu wurden die Membranen zunächst kurz auf trockenes Filterpapier (Whatman 3MM) gelegt und anschließend für 15 min auf mit Denaturierungslösung (0,5 NaOH, 1,5 M NaCl) getränktes Filterpapier transferiert (Kolonieseite nach oben). Dasselbe erfolgte für 15 min auf mit Neutralisierungslösung (1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl) getränktem Filterpapier und für 10 min auf Filterpapier, das mit 2x SSC getränkt war. Anschließend wurden die Rundfilter bei RT getrocknet, um danach die DNA durch Backen (30 min, 80°C) oder durch UV-Behandlung (2 mal 3 min, $\lambda=320$ nm) zu fixieren. Nach der Fixierung erfolgte eine einstündige Behandlung mit Proteinase K (2 mg/ml in 2x SSC; Roche Diagnostics, Mannheim) bei 37°C. Danach wurde die Membran zwischen zwei mit H₂O_{dest} angefeuchtete Whatman-Filterpapiere gelegt und eventuell vorhandene Agar- und zelluläre Reste durch Überrollen mit einer Glasflasche entfernt. Die anschließende Hybridisierung und Detektion erfolgte wie beim Southernblot (s. Gldpkt. II.3.3.2) beschrieben. Signal-erzeugende Kolonien wurden in 1 ml LB_{Amp} aufgenommen, erneut ausplattiert und in weiteren Screening-Runden überprüft.

3.4 PCR-Anwendungen

3.4.1 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden mit Thermocyclern (PTC-100, PTC-150) der Fa. MJ Research (bezogen über Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf) durchgeführt. Als Standardenzym wurde die Taq-Polymerase von QIAGEN (Hilden) mit dem beigefügten

Puffer eingesetzt. In der Regel wurden Reaktionen von 10-20 µl Volumen in 0,2 ml PCR-Tubes durchgeführt.

Eine Standardreaktion setzte sich wie folgt zusammen:

1x Reaktionspuffer (inkl. 1,5 mM MgCl₂)
 0,2 mM dNTPs (äquimolare Mischung aus dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
 0,5 µM Primer 1
 0,5 µM Primer 2
 0,02 U/µl Taq-Polymerase
template DNA
 H₂O_{bidest}

Alle Standard-PCR-Programme leiteten sich von folgendem Schema ab:

1	initiale Denaturierung	2-5 min	95°C
2	Denaturierung	20 sec	94°C
3	Annealing	0,5-1 min	T _{opt}
4	Elongation	0,5-3 min	72°C
5	25-34 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
6	Abschluss-Elongation	5 min	72°C
7	Abkühlen		4°C

Die Annealingtemperatur lag meist etwas unterhalb (2-4°C) der Schmelztemperatur der Primer (gewöhnlich zwischen 55°C und 62°C). Die Elongationsdauer war abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und betrug ca. 1 min/kb.

Die optimalen Bedingungen wurden durch Variation der Parameter Annealingtemperatur und -dauer, MgCl₂-Konzentration, DNA-Konzentration und Zyklenzahl empirisch ermittelt. Bei PCRs mit degenerierten Primern wurde die Primerkonzentration auf 2 µM erhöht. Um ein unspezifisches Anlagern der Primer zu verhindern, wurden z. T. Hot-Start-PCRs durchgeführt. Dazu wurde die HotStar-TaqTM Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden) nach Angaben des Herstellers eingesetzt und das Standard-PCR-Programm um einen initialen Aktivierungsschritt der HotStar-Taq (15 min, 95°C) erweitert.

3.4.2 Touchdown-PCR

Bei der *touchdown*-PCR wird ein Gradient von Annealingtemperaturen durchlaufen, beginnend mehrere °C über der Schmelztemperatur der Primer. Dieser Vorgang soll die Bildung unspezifischer Nebenprodukte verringern (Don *et al.*, 1991). Anschließend werden

noch mehrere Zyklen unter Standard-Bedingungen durchgeführt. Das Programm wurde folgendermaßen realisiert:

1	initiale Denaturierung	2 min	95°C
2	Denaturierung	20 sec	94°C
3	Annealing	0,5-1 min	$T_{\max} - 1^\circ\text{C}/\text{Zyklus}$
4	Elongation	0,5-2 min	72°C
5	10-19 Zyklen der Schritte 1 bis 3		
6	Denaturierung	20 sec	95°C
7	Annealing	0,5-1 min	T_{opt}
8	Elongation	2-4 min	72°C
9	20-25 Zyklen der Schritte 6 bis 8		
10	Abschluss-Elongation	5-10 min	72°C
11	Abkühlen		4°C

3.4.3 Expand-PCR

Die Taq-Polymerase amplifiziert PCR-Fragmente mit einer Größe von mehr als 3 kb nicht mehr mit ausreichender Effizienz. Aus diesem Grund wurde für die Amplifikation von Fragmenten größer 2,5 kb das Expand™ Long Template PCR-System von Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Dabei wird ein Mix aus Taq-Polymerase und einer *proofreading*-Polymerase eingesetzt. Die Versuchsansätze unterschieden sich wie folgt vom Standardansatz: Der 1x Puffer enthielt 1,75 mM MgCl₂, die dNTPs wurden je 350 µM eingesetzt, die Primer je 0,3 µM. Der Enzym-Mix wurde nach Angaben des Herstellers benutzt und es wurde folgendes Programm durchgeführt:

1	initiale Denaturierung	2 min	94°C
2	Denaturierung	10 sec	94°C
3	Annealing	30 sec	T_{opt}
4	Elongation	2-4 min	68°C
5	10 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
6	Denaturierung	10 sec	94°C
7	Annealing	30 sec	T_{opt}
8	Elongation	2-4 min + 20 sec/Zyklus	68°C
9	15-20 Zyklen der Schritte 6 bis 8		
10	Abschluss-Elongation	7 min	68°C
11	Abkühlen		4°C

Die Optimierung der Expand-PCR erfolgte entsprechend den Standard-PCRs.

3.4.4 RT-PCR

Die RT-PCR dient dem Nachweis spezifischer mRNAs. Dazu wird zunächst mit einer Reversen Transkriptase ein zur mRNA komplementärer DNA-Strang synthetisiert und anschließend eine Standard-PCR durchgeführt. Um DNA-Verunreinigungen vorzubeugen, wurden zwei Maßnahmen ergriffen. Zum einen wurden die Primer so gewählt, dass sie auf beiden Seiten eines Introns binden. Dadurch unterscheiden sich die Produkte, die von mRNA bzw. von DNA als *template* erzeugt werden, in ihrer Größe. Zum anderen wurde vor der eigentlichen Reaktion ein DNase-Verdau durchgeführt.

Für diesen Verdau wurden 2,5 µg Gesamt-RNA, 2,5 U RNase-freie DNase (Promega GmbH, Mannheim), 1x Reaktionspuffer und H₂O_{dest} (DEPC-behandelt) in einem Volumen von 10 µl für 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf wurde 1 µl Stop-Lösung zugegeben und durch weitere Inkubation für 10 min bei 65°C die DNase inaktiviert..

Die RT-PCR erfolgte dann mit dem OneStep RT-PCR Kit von Qiagen (Hilden). Es wurde folgendes Programm durchgeführt:

1x Reaktionspuffer (inkl. 2,5 mM MgCl₂)
 je 0,4 mM dNTPs
 0,6 µM Primer 1
 0,6 µM Primer 2
 0,4 µl Enzym-Mix (Omniscript™ und Sensiscript™ Reverse Transkriptase sowie HotStar Taq™-Polymerase)
 0,5–1,0 µl DNase verdaute RNA (ca. 115 – 300 ng)
 H₂O_{dest} ad 10 µl

Die Ansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert, der Thermocycler vor Hineinsetzen der Reaktionstubes auf 50°C vorgeheizt und folgendes Programm durchgeführt:

1	Reverse Transkription	30 min	50°C
2	initiale Denaturierung	15 min	95°C
3	Denaturierung	20 sec	94°C
4	Annealing	30 sec	T _{opt}
5	Elongation	15-60 sec	72°C
6	25-35 Zyklen der Schritte 3 bis 5		
7	Abschluss-Elongation	10 min	72°C
8	Abkühlen		4°C

3.5 Klonierungstechniken

3.5.1 *Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen*

Alle Restriktionsenzyme und Puffer stammen von der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland). Die Restriktionsverdau wurden in Volumina von 10–200 μl durchgeführt. Dazu wurden die DNA, eine entsprechende Menge 10x Puffer, das/die Enzym/e und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf Eis gemischt und anschließend bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37°C) für 1-16 h inkubiert. Für einen vollständigen Verdau wurden dabei die Enzymmenge und die Inkubationsdauer so gewählt, dass das Produkt aus Enzymaktivität (units) und Zeit (h) größer oder gleich dem 20fachen der DNA-Menge (μg) war. Nach dem Verdau erfolgte eine Inaktivierung des/r Enzyms/e durch eine 20-minütige Inkubation bei 65°C (sofern die Inaktivierung möglich war).

3.5.2 *Eluierung spezifischer Fragmente aus Agarose-Gelen*

Sofern durch den Verdau von Plasmid-DNA mehrere Fragmente, von denen nur ein spezifisches für die Ligation genutzt werden sollte entstanden, wurde der gesamte, komplett verdaute Restriktionsansatz auf ein Agarose-Gel (s. Gldpkt. II.3.2) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die gesuchte Bande unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten und aus diesem mittels PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden; Gel-Extraktion Protokoll) eluiert.

3.5.3 *Modifikation der Enden verdauter DNA*

Für einige Klonierungen war es notwendig, die überstehenden Enden nach dem Restriktionsverdau zu modifizieren, um entweder kompatible überstehende (mit 1 oder 2 komplementären Basen) oder glatte Enden zu erzeugen.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzymen entstanden 5'-überhängende Enden, die durch eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics, Mannheim) und den dazu notwendigen dNTPs durchgeführt wurde. Für partielle Auffüllreaktionen wurden nur die Nukleotide zugegeben, die bei der Reaktion benötigt wurden. Die *template*-DNA wurde zuvor über einen PCR-Purification Kit (Qiagen GmbH, Hilden) gereinigt und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

Der Standardreaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1x PCR-Reaktionspuffer
1 U Klenow-Fragment /250 ng *template*
10 mM MgCl₂
25 μM dNTPs
template-DNA
H₂O_{bidest}

Die Reaktionsbedingungen für das Klenow-Fragment waren 30 min bei 30°C und 10 min bei 75°C für die Inaktivierung.

3.5.4 Dephosphorylierung

Um ein Religieren des Vektors zu verhindern, wurde in vielen Fällen eine Dephosphorylierung durchgeführt. Dazu wurde den Ansätzen pro 100 ng verdauter Vektor-DNA 1 unit Shrimps Alkalische Phosphatase (SAP; Roche Diagnostics, Mannheim) und ein entsprechendes Volumen 10x Dephosphorylierungspuffer zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde dann durch eine 10-minütige Inkubation bei 75°C inaktiviert.

3.5.5 Ligationen

Grundsätzlich wurden für Ligationen Vektor- und *insert*-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Dabei wurden nach folgender Formel (Mülhardt, 1999) die benötigten DNA-Mengen abgeschätzt:

$$\text{Masse } \textit{insert}\text{-DNA (ng)} = \frac{5 * \text{Masse Vektor-DNA (ng)} * \text{Länge der } \textit{insert}\text{-DNA (bp)}}{\text{Länge der Vektor-DNA (bp)}}$$

Die 10-20 μl Ansätze bestanden in der Regel aus 100 ng Vektor-DNA, einer entsprechenden Menge *insert*-DNA, 1x Ligase-Puffer und 1-2 WeissU T4 DNA Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim). Bei überstehenden Enden (*sticky ends*) erfolgte die Inkubation für 1-4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Bei glatten Enden (*blunt ends*) wurde zunächst 4 h bei 16°C und dann mindestens 12 h bei 4°C inkubiert. Für die anschließende Transformation (s. Gldpkt. II.3.7.2) wurde stets die Hälfte des Ligationsansatzes eingesetzt.

3.5.6 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die mit Taq-Polymerase erzeugt wurden, besitzen in der Regel einen A-Überhang am 3'-Ende (Clark, 1988). Für ihre Klonierung wurden TOPO TA Cloning[®] Kits von Invitrogen (Groningen, Niederlande) genutzt. Der Vektor (pCR[®]2.1-TOPO[®], pCR[®]4-TOPO[®] (neuere Version)) ist bereits linearisiert und besitzt 3'-T-Überhänge. Die Verknüpfung von Vektor und *insert* erfolgte über die Aktivität einer Topoisomerase. Die Transformation wurde mit *One Shot*[®] TOP10 kompetenten *E. coli* Zellen (Invitrogen, Groningen, Niederlande) vorgenommen. Die Arbeiten wurden gemäß der Anleitungen des Herstellers durchgeführt.

3.6 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Für Sequenzierungen wurde ein ABI Prism[®] 310 Genetic Analyzer der Firma Applied Biosystems (Weiterstadt) verwendet. PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierreaktion mit dem QIAquick PCR-Purification Kit gereinigt, Plasmid und Cosmid-Präparationen wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (beides von Qiagen GmbH, Hilden) gereinigt. Die DNA-Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bestimmt und für folgende Sequenzierreaktion als *template* eingesetzt:

- 4 µl *Ready Reaction Mix* (enthält AmpliTaq[®] FS DNA Polymerase, dNTPs, BigDye-ddNTPs)
- 5 pmol Sequenzierprimer
- DNA: 30-50 ng PCR-Produkt
- 200-250 ng Plasmid
- 400-500 ng Cosmid
- ad 10 µl H₂O_{bidest}

Das PCR Programm (*cycle sequencing*) bestand aus folgenden Schritten:

1 Denaturierung	10 sec	96°C
2 Annealing	5 sec	45-60°C
3 Elongation	4 min	60°C
4	25-30 Zyclen der Schritte 1 bis 3	
5 Abkühlen		4°C

Bei der Sequenzierung von Cosmiden wurden die Ansätze zunächst ohne *Premix* 5 min bei 96°C denaturiert, dann der *Premix* zugegeben und das Programm wie oben durchgeführt. Nach Ende des *cycle sequencing* erfolgte eine Aufreinigung des Reaktionsansatzes. Dazu wurden die einzelnen Ansätze mit H₂O_{dest} auf 100 µl aufgefüllt, 10 µl 3 M Na-Acetat und 250 µl 100 % EtOH zugefügt und 15 min bei 20800 g zentrifugiert. Anschließend wurde mit 250 µl 70 % EtOH gewaschen, nochmals 5 min zentrifugiert, das Pellet 5 min in der Speed-vac getrocknet und in 20 µl TSR-Puffer (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen. Nach einer 2-minütigen Denaturierung (90°C) und schnellem Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze in Probengefäße überführt und diese mit Septen verschlossen. Die Handhabung des Geräts erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Für die Sequenzierung wurde die Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) angewandt.

Mit Hilfe der mitgelieferten Software (Sequencing Analysis, Sequence Navigator) von Applied Biosystems bzw. mit dem Lasergene99-Programmpaket der DNASTAR Inc. (Madison, Wi, U.S.A.) erfolgte die Sequenzauswertung und Bearbeitung.

Homologievergleiche (BLASTX, BLASTN, (Altschul *et al.*, 1997)) und Datenbankrecherche erfolgten über die Internetseite des NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Zur Identifikation der Erkennungssequenzen des Introns wurden Ergebnisse von Hahn (1997) und Borgia (1996) herangezogen. Vorhersagen über die Proteinstruktur (Vorhandensein von Signalpeptiden, mögliche Transmembrandomänen) sowie über mögliche regulatorische Promotorelemente wurden über den Service der TRANSFAC *transcription factor database* (<http://transfac.gbf.de>) (Lebel *et al.*, 1998) ermittelt.

3.7 Transformationstechniken

3.7.1 Transformation von *C. graminicola*

Standardprotokoll

Für die Transformation von *C. graminicola* sind mehrere Methoden beschrieben (Epstein *et al.*, 1998; Panaccione *et al.*, 1988; Rasmussen *et al.*, 1992; Redman & Rodriguez, 1994; Rodriguez & Redman, 1992; Rodriguez & Yoder, 1987; Vaillancourt & Hanau, 1994). Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren orientiert sich weitgehend am Protokoll von Epstein *et al.* (1998), es wurden aber einige Modifikationen eingeführt.

Sporen, die auf Haferflockenagar produziert wurden, (s. Gldpkt. II.1.1.1), wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ abgewaschen. Mit dieser Sporenlösung wurden 100 ml Kompletmedium (s. Gldpkt. II.1.1.1) in einer Konzentration von 10^6 Sporen/ml angeimpft. Die Kultur wurde anschließend ohne Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 6-8 Tagen konnte die Kultur für die Transformation verwendet werden. Bei Kulturversuchen wurde festgestellt, dass *C. graminicola* in Saccharose-Medium (0,5 M Saccharose, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt) in Schüttelkultur verstärkt ovale Konidien bildet, welche nach Epstein (1998) bevorzugt für die Protoplastierung und nachfolgende Transformation geeignet sind. Die Kulturen, die in diesem Medium angesetzt wurden, konnten nach 2-3 Tagen Kultivierung (21°C, 110 rpm) für eine Transformation eingesetzt werden.

Nach der entsprechenden Zeit (7-10 Tage bei Kompletmedium, 2-3 Tage bei Saccharose-Medium) wurde die Kultur durch 2 Lagen Nesseltuch (*cheesecloth*) filtriert und das Filtrat 10 min bei 4260 g und 4°C zentrifugiert, so dass die darin enthaltenen ovalen und sichelförmigen Sporen pelletierten. Die Sporen wurden dann in 10 ml Protoplastierungslösung (20 mg/ml Lysing Enzymes von *T. harzianum* (Sigma, Deisenhofen, Kat.-Nr. L1412), 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol in 0,7 M NaCl) resuspendiert und für 3 h bei 30°C unter mäßigem Schütteln inkubiert. Der Erfolg der Protoplastierung wurde mikroskopisch überprüft. Die Protoplasten wurden anschließend durch 10-minütige Zentrifugation (800 g, 4°C) gesammelt, mit 10 ml STC (1 M Sorbitol, 50 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) gewaschen, erneut zentrifugiert und in maximal 1 ml STC resuspendiert. Anschließend wurden sie in 100 μl Aliquots in 15 ml Corning-Röhrchen aufgeteilt und auf Eis gestellt. Nach Zugabe der DNA (0,5-5 μg) wurden die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 1 ml PEG-Lösung (40% (w/v) Polyethylenglykol 4000 (3000-3700 Mr), 0,6 M KCl, 50 mM CaCl_2 , 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) zugegeben und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jedem Ansatz wurde dann 3-4 ml flüssiges (45°C) Regenerationsmedium (1 M Saccharose, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,1 % (w/v) Casein, 0,6 % (w/v) Agar-Agar) gegeben und auf Selektivmedium ausplattiert (Regenerationsmedium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar und 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)). Als Selektionsmarker diente das *hygB^R*-Gen, welches für die Hygromycin B-Phosphotransferase kodiert und den Transformanten ein Wachstum unter Anwesenheit dieses Antibiotikums erlaubt (Kaster *et al.*, 1984; Rodriguez & Yoder, 1987). Nach 7-10 Tagen wurden die entstehenden Kolonien auf neue selektive Platten (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B) übertragen. Um sicherzustellen, dass es sich um genetisch einheitliche Isolate handelt, wurden Einzelsporisolate hergestellt. Dazu wurden die Kolonien auf Haferflockenagar übertragen, bis zur Sporulation inkubiert und die Sporen nochmals in

Verdünnungen, die es erlaubten Einzelsporisolate zu identifizieren, auf selektive Platten (100 µg/ml Hygromycin B) ausplattiert.

3.7.2 Transformation von *E. coli*

CaCl₂-Transformation

Die CaCl₂-Transformation wurde nach Sambrook (1989) durchgeführt. 40 µl einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden in 10 ml LB überimpft und bei 37°C und 220 rpm im Kulturschüttler bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,3–0,4 inkubiert. Nach 1-minütiger Zentrifugation (4000 g, RT) wurde das Bakterien-Pellet in 5 ml kaltem CaCl₂ (50 mM) aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet vorsichtig in 500 µl CaCl₂ suspendiert und in 150 µl-Aliquots in vorgekühlte Corning-Röhrchen überführt. Nach Inkubation auf Eis (15 min) wurde die DNA in 50 µl 50 mM CaCl₂ zugegeben. Nach Inkubation der Zellen für 30 min auf Eis, wurden die Bakterien 3 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde 1 ml LB-Lösung zugegeben und 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Es wurden 10-150 µl dieser Kultur auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert und diese über Nacht im Brutschrank inkubiert.

TSS-Transformation (one-step E. coli transformation)

Die Transformation erfolgte nach der TSS-Methode (Transformation and Storage Solution) von Chung (1989). Dazu wurden 25 ml LB-Medium mit 200 µl einer Übernachtskultur des zu transformierenden Stammes angeimpft und bei 37°C und 220 rpm im Kulturschüttler inkubiert. Sobald die Kultur eine OD_{600nm} von 0,3-0,4 (exponentielle Wachstumsphase) erreicht hatte, wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min, 1000 g, 4°C) gesammelt und in 2,5 ml TSS (20 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄, 10 % PEG 4000 in LB, pH 6,5-6,8, steril filtrieren und 5 % (v/v) DMSO zugeben) aufgenommen. Davon wurden 100 µl Aliquots in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und 5-15 min auf Eis inkubiert. An dieser Stelle wurden nicht benötigte Aliquots für eine spätere Verwendung bei –70°C eingefroren. Anschließend wurde die DNA (Plasmide, Ligationsansätze, bis maximal 20 µl) zugegeben und weitere 30-60 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 0,9 ml LB und 10 µl 2 M Glucose (sterilfiltriert) zugegeben, 1 h bei 37°C und 220 rpm geschüttelt und 10-150 µl auf LB_{Amp}- Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Sofern zur Klonierung der TOPO TA Cloning[®] Kit von Invitrogen (Groningen, Niederlande) genutzt wurde, wurde die Transformation mit One Shot[®] TOP10 kompetenten *E. coli* Zellen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Falls die Möglichkeit zur Blau-Weiß-Selektion gegeben war, wurden vor dem Ausplattieren der Bakterien 10 µl 100 mM IPTG und 60 µl X-Gal (20 mg/ml in Dimethylformamid) auf dem Agar verteilt und das Abtrocknen der Flüssigkeit abgewartet.

Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und die Kolonien mittels PCR (s. Gldpkt. II.3.4.1) analysiert (bei Blau-Weiß-Selektion nur die weißen oder schwach blauen Kolonien). Dazu wurden die Bakterien mit der Spitze eines sterilen Zahnstochers gepickt und direkt in vorbereitete PCR-Ansätze überführt. Die Zellen lysieren während der initialen Denaturierung und die Plasmid-DNA steht als *template* zur Verfügung.

4 Proteinbiochemie

4.1 Gewinnung von extrazellulärer Waschflüssigkeit (WF)

300 µl einer Konidiensuspension (s. Gldpkt. II.1.1.1, ca. 10⁸ Sporen/ml) wurden gleichmäßig über die gesamte Oberfläche einer Petrischale mit Haferflockenagar verteilt und für ca. 48 h bei RT unter normalen Kulturbedingungen gehalten, so dass die Platten komplett mit Mycel bewachsen waren. Pro Pilzisolat wurden 4 Platten inokuliert. Die Schalen wurden dann 15 min mit 6 ml MES-Puffer (25 mM MES pH 8,0, 0,05 % (v/v) Tween 20) gewaschen. Dabei wurde die Waschflüssigkeit innerhalb eines Pilzisolates von einer Platte zur nächsten weiter verwendet, um möglichst hohe Konzentrationen extrazellulären Materials zu erreichen. Die Waschflüssigkeit wurde anschließend 15 min bei 30000 g (4°C) zentrifugiert und der Überstand in 1 ml Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

4.2 Proteinextraktion

4.2.1 Gewinnung von Blatthomogenaten

Blätter oder ganze Maispflanzen wurden wie unter Gldpkt. II.1.2 beschrieben inokuliert, zu den entsprechenden Zeitpunkten abgeschnitten und bei -70°C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

Material, das im Western Blot (s. Gldpkt. II.4.4) untersucht werden sollte, wurde in flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend sofort in der dreifachen Menge Puffer (10

mM Tris/HCl pH 8,5; 100 mM NaCl) aufgenommen. Der proteinhaltige Überstand wurde durch Zentrifugation (20 min, 30000 g, 4°C) gewonnen und in 1 ml-Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

Zur Analyse im Substrat-SDS-Gel (s. Gldpkt. II.4.3.2) wurden 0,1-0,15 g der gefrorenen Blätter in 300 µl Puffer (25 mM Na-Acetat, pH 7,5) aufgenommen und mit einem Mikropistill homogenisiert. Danach wurde 20 min bei 20800 g (4°C) zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand bei -70°C gelagert.

4.2.2 Gewinnung pilzlicher Proteine

Infektionsstrukturen von *C. graminicola* wurden wie unter Gldpkt. II.1.1 beschrieben induziert. Um unterschiedliche Differenzierungsstadien untersuchen zu können, wurden Proben von vegetativen Hyphen, undifferenzierten Konidien und von bis zu Appressorien differenzierten Infektionsstrukturen getrennt aufgeschlossen. Die Proben wurden im flüssigem Stickstoff zerrieben und anschließend sofort in Extraktionspuffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl, 2 % (w/v) SDS) aufgenommen. Der proteinhaltige Überstand wurde durch Zentrifugation (20 min, 30000 g, 4°C) gewonnen und in 1 ml-Aliquots bei -70°C aufbewahrt.

4.2.3 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976). Dazu wurden 5-10 µl der zu bestimmenden Lösung mit 0,05 N NaOH auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl BIO-RAD-Reagens (BIO-RAD Laboratories GmbH, München) versetzt und nach 5-15 min die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm mit einem Spektralphotometer (UVIKON 933 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer) gemessen. Der Proteingehalt wurde anhand einer Eichgeraden mit γ -Globulin (Sigma, Deisenhofen) als Standard ermittelt.

4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4.3.1 Standarddurchführung

SDS-PAGE wurde nach Laemmli (1970) mit Sammelgelen aus 4 % Acrylamid/0,2 % Bisacrylamid und Trenngelen aus 12,5 % Acrylamid/0,33 % Bisacrylamid durchgeführt. Es wurden jeweils vergleichbare Mengen an Protein (20 µg (bis max. 50 µg)) mit Probenpuffer auf 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau eingestellt und vor dem Auftragen auf das Gel 5 min bei 99°C denaturiert.

Als Molekulargewichtsstandard wurde der Premixed Protein Weight Marker; low-range 14,4-97,4 kDa (Roche, Mannheim) eingesetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 15 mA während des Laufes im Sammelgel bzw. 30 mA während des Laufes im Trenngel. Der Elektrodenpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS.

4.3.2 Substrat-SDS-PAGE

Zum Nachweis von Chitinacetylase-Aktivität wurden in substrathaltigen Gelen Proteinextrakte aufgetrennt und nach entsprechender Inkubationszeit die Reaktionsprodukte sichtbar gemacht.

Zur Analyse der Chitinacetylase-Aktivität wurde dem Trenngel 0,1 % (w/v) Glycolchitin zugesetzt (Trudel & Asselin, 1990). Das Glycolchitin wurde nach Trudel & Asselin (1989) aus Glycolchitosan (Sigma, Deisenhofen) durch Acetylierung mit Essigsäureanhydrid hergestellt.

Für den Nachweis pflanzlicher Chitinasen wurde die gleiche Methode verwendet. Um Chitinase-Aktivität zeigen zu können, wurde dem Trenngel 0,1 % (w/v) Glycolchitin zugesetzt.

Die Proben für die Substratgele wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer auf 2 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (ohne β -Mercaptoethanol) eingestellt und vor dem Auftragen auf das Gel nicht erhitzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei konstant 10 mA für 2-4 h bei Raumtemperatur. Nach Abschluss des Vorgangs wurde die Marker-Spur abgetrennt, in Coomassie Brilliant Blue (in 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) MeOH) gefärbt (LeGendre & Matsudaira, 1989) und in einer wässrigen Lösung aus 30 % (v/v) MeOH und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt. Die Proteine im restlichen Gel wurden in mehreren Waschschritten renaturiert (2 x 20 min und 1 x 5 min in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1 % (v/v) Triton X100 und 2 x 10 min in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, Raumtemperatur). Anschließend wurden die Gele in 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, für 18 h (Chitinacetylase-Aktivität) bis 40 h (Chitinase-Aktivität) bei 37°C inkubiert. Die Färbung erfolgte für 5 min mit 0,01 % Calcofluor White M2R in 0,5 M Tris/HCl, pH 9,0, unter Lichtausschluss. Danach wurden die Gele für mindestens 2 h unter mehrfachem Austauschen in H_2O_{dest} gewaschen. Das Chitosan, welches durch die Chitinacetylase-Aktivität entstanden ist, erscheint bei Anregung durch UV-Licht (312 nm) als helle fluoreszierende Bande, da Calcofluor White eine höhere Affinität zu Chitosan als zu Chitin besitzt. Im Gegensatz dazu erscheinen die

Bereiche mit Chitinase-Aktivität als dunkle Banden, da hier das Chitin im Gel abgebaut wurde.

4.4 Western Blot

Elektrotransfer

Western Blots wurden nach dem System von Kyhse-Anderson (1984) durchgeführt. Dazu wurden Whatman-Filterpapiere (Whatman, Clifton, NJ, U.S.A.) mit Anodenpuffer 1 (300 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH), Anodenpuffer 2 (25 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH) bzw. Kathodenpuffer (40 mM Caproat, 25 mM Tris, 20 % (v/v) MeOH) getränkt. Die getränkten Filterpapiere, das Gel und die mit MeOH aktivierte und gewässerte Blotting-Membran (PVDF; Roche Diagnostics, Mannheim) wurden wie in Abb. II.2 dargestellt luftblasenfrei geschichtet und überschüssige Flüssigkeit bei jeder neuen Lage entfernt.

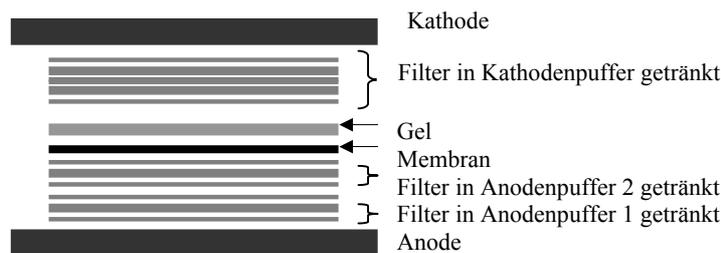


Abb. II.2: Aufbau des Transfersystems (nach (Kyhse-Andersen, 1984)).

Der Transfer erfolgte bei 2 mA/cm^2 Membranfläche für 1,5 h. Nach dem Elektrotransfer wurde die Marker-Spur abgetrennt, in Coomassie Brilliant Blue (in 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) MeOH) gefärbt und in einem Gemisch aus 30 % (v/v) MeOH und 10 % (v/v) Essigsäure entfärbt (LeGendre & Matsudaira, 1989).

Immundetektion

Der verbleibende Blot (ohne Markerspur) wurde für mindestens 3 h in Blockierungs-Puffer (2 % (w/v) BSA, 3 % (w/v) Magermilchpulver, 0,02 % (w/v) Na-Azid in TBS (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,2)) unter ständiger Bewegung auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 h (RT) mit einem 5000-fach in Blockierungs-Puffer verdünnten

Antikörper¹ gegen die Chitindeacetylase von *C. graminicola* inkubiert. Zur Kontrolle der Spezifität des Antikörpers wurde ein weiterer Blot 3 h (RT) in Präimmunserum (5000fach in Blockierungs-Puffer) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS (10 min, RT) wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (AP-conjugate, goat-anti-rabbit, Sigma, Deisenhofen) 5000fach verdünnt in Blockierungspuffer für 45 min bei RT inkubiert und erneut gewaschen (5 x 10 min in TBS, RT). Die Anfärbung der Banden erfolgte mit 0,4 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) und 0,4 mM Nitroblau Tetrazolium (NBT) (beides Carl Roth GmbH, Karlsruhe) im Detektionspuffer (100 mM Tris/ HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl). Anschließend wurde die Membran gewaschen, getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

5 Mikroskopie

Alle lichtmikroskopischen Arbeiten wurden mit dem Mikroskop Nikon Eclips E 600 (Nikon, Düsseldorf) durchgeführt. Bei den verwendeten Objektiven handelt es sich um Plan Fluor 20x/ 0,30 und Plan Fluor 40x/0,80 (Wasseremersion). Die mikroskopischen Bilder wurden photographisch festgehalten und mit den Bildverarbeitungsprogrammen Lucia 4.21 (Nikon, GmbH, Düsseldorf), Corel Photo-Paint 7.0 und Corel Draw 8.0 bearbeitet. Mikroskopisch untersucht wurden zum einen *in vitro*-differenzierten Infektionsstrukturen von *C. graminicola*; zum anderen stellte auch die Analyse des Infektionsverlaufes *in vivo* einen wichtigen Aspekt dar. Die entsprechenden Objektträger und Pflanzen wurden wie unter Gldpkt. II.1.1 und II.1.2 beschrieben inokuliert bzw. kultiviert.

5.1 Differentieller Interferenz-Phasenkontrast

Zur Untersuchung der Strukturen im Hellfeld wurde stets der differentielle Interferenz-Phasenkontrast genutzt.

Infektionsstrukturen im Blatt

Um Infektionsstrukturen von *C. graminicola* in den oberen Zellebenen des Blattes auszuwerten, wurde inokuliertes frisches Blattgewebe durch Kochen (2 min) in

¹ Die Herstellung polyklonaler Antikörper gegen ausgewählte Abschnitte der Aminosäuresequenz der Chitindeacetylase von *C. graminicola* wurde bei der BioScience GmbH, Göttingen, in Auftrag gegeben. Der Bereich der Aminosäuren 170 bis 184 des Enzyms wurde als optimaler Abschnitt ausgewählt. Das Peptid wurde synthetisiert und als Antigen bei der Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Lactoglycerol/Ethanol (1:2) entfärbt. Anschließend konnten die Blattstücke in dieser Lösung für 2-3 Tage (4°C) ohne Veränderung der Präparate aufbewahrt werden.

5.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

5.2.1 Calcofluor-Färbung

Um Pilzstrukturen gut sichtbar zu machen, wurden diese auf den zuvor entfärbten Blättern (s. Gldpkt. II.5.1) mit Calcofluor White M2R (Uvitex 2B) angefärbt (Rohringer *et al.*, 1977). In mehreren Waschschrritten mußte zunächst das Lactoglycerol aus den Zellen entfernt werden (2 mal 15 min 50 % EtOH, 2 mal 15 min 50 mM NaOH, 3 mal 15 min H₂O_{dest}). Nach der Färbung (10 min unter Lichtausschluss in 0,03 % Calcofluor) wurden die Objekte mehrmals mit H₂O_{dest} gewaschen und in 25 % Glycerol aufbewahrt. Die Anregung im Fluoreszenzlicht wurde mit dem UV 2A-Filters (EX: 330-380; DM: 400; BA: 420) betrachtet.

5.2.2 GFP-Markierung

Die Fusion eines GFP-Gens (*green fluorescence protein*, gGFP (Maor *et al.*, 1998)) mit dem Chitindeacetylase-Promotor (vgl. Gldpkt. III.1.2) sollte Studien zur Regulation der Genexpression der Chitindeacetylase von *C. graminicola* während der Infektion von Pflanzen ermöglichen. Zur Kontrolle einer erfolgreichen GFP-Expression in *C. graminicola* wurde das gesamte Plasmid gGFP, das neben einem Hygromycin-Rphosphotransferase-Gen das GFP-Gen unter Kontrolle des GAPDH-Promotors von *Aspergillus nidulans* besitzt, in den Wildtyp transformiert.

Für alle Aufnahmen wurde ein GFP-Filter eingesetzt (MBE-34-931; EX: 480/40; DM: 505; BA: 534/50).

5.2.3 Spezifische Immunmarkierung

Einbettung inokulierter Maisblätter in PEG

Maisblätter der Sorte Mutin wurden wie unter Gldpkt. II.1.2 beschrieben mit Tropfen (10-50 µl) der Sporensuspension unterschiedlicher Pilzisolatate inokuliert und bei 100 % Luftfeuchte für 2-5 Tage inkubiert. Die Infektionsstellen wurden mit einer Rasierklinge aus dem Blatt herausgeschnitten und in Fixativ (3 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,05 % (v/v) Triton X100 in PBS, pH 7,2) 3 h fixiert (Rotator, RT). Im Anschluss daran wurde in PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄ 2 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄) 2 mal 15 min

gewaschen, je 30 min in 10 %, 30 % und 50 % EtOH inkubiert und die Proben über Nacht bei 4°C in 70 % EtOH aufbewahrt. Es schlossen sich weitere Waschschriffe in steigenden Alkoholkonzentrationen an (15 min 70 %, 30 min 90 % und 2 mal 30 min 100 % EtOH), wobei der letzte Waschschriff bei 57°C durchgeführt wurde. Die PEG-Einbettung erfolgte in Anlehnung an Van Lammeren (1985). Es wurde bei 57°C für 1 h in PEG (PEG 1500:PEG 4000 = 2:1) : EtOH = 1:3, 1 h in PEG : EtOH = 1:1 und 1,5 h in PEG : EtOH = 3:1 inkubiert. Nach Aufbewahrung für 2 mal 1 h in reinem PEG (1500:4000 = 2:1) bei 57°C wurden die Blattstücken bei RT in PEG eingebettet.

Immunmarkierung

Nach dem Austrocknen der PEG-Proben wurden die Blattstücke mit einem Mikrotom (HM 335 E, MICROM) 3 µm stark geschnitten und die Schnitte auf polylysinisierte Objektträger (Poly-L-Lysin, Sigma, Deisenhofen) aufgebracht. Nach Inkubation für 10 min in PBS, um die überschüssigen PEG-Reste zu beseitigen, wurde 5 min in Ammoniumchlorid (0,1 M NH₄Cl in PBS) gewaschen, um freie Aldehydgruppen des Fixativ abzusättigen. Nach einem weiteren Waschschriff in PBS (5 min) und der Blockierung der Schnitte (30 min, 5 % (w/v) BSA in PBS) erfolgte bei 4°C über Nacht die Inkubation mit dem ersten Antikörper (anti-Chitosan² 1:1000 in PBS + 5 % (w/v) BSA; Präimmunsereum 1:1000 in PBS + 5 % (w/v) BSA) oder WGA (Wheat germ agglutinin, TexasRed[®] -X conjugate (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)) 1:10 in PBS (0,1 mg/ml⁻¹ Endkonzentration) + 5 % (w/v) BSA. Am nächsten Tag wurden die Schnitte mit der Markierung durch Anti-Chitosan und Präimmunsereum 4 mal 10 min in PBS + 0,1 % (w/v) BSA gewaschen und für 1h bei 37°C mit dem sekundären Antikörper (GAR-FITC 1:200 in PBS + 5 % (w/v) BSA, Sigma, Deisenhofen) unter Lichtausschluss inkubiert. Die Lektin-markierten Proben wurden kurz im Dunkeln in PBS gespült. Alle weiteren Schritte wurden möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt.

In Vitro-differenzierte Infektionsstrukturen auf Objektträgern wurden in derselben Weise gefärbt.

Kernfärbung

Vor der Kernfärbung mit DAPI (1 µg/ml DAPI in PBS, Roth) wurden die Schnitte 2 mal 10 min in PBS gespült und nach zwei weiteren Waschschriffen (je 5 min in PBS) in Citifluor-Glycerol (Citifluor Ltd., London, U.K.) aufgenommen und luftblasenfrei versiegelt.

² polyklonaler Chitosan-Antikörper der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz (Lasso-Agredo, 1998).

Mikroskopie

Die Blattschnitte und *in vitro*-Strukturen wurden im Dunkeln gelagert und unter Fluoreszenz-Anregung mikroskopiert. Dazu wurden folgende Filterkombinationen verwendet:

DAPI	EX: 340-380; DM: 400; BA: 435-485
TexasRed	EX: 540-580; DM: 595; BA: 600-660
FITC	EX: 465-495; DM: 505; BA: 515-555.

Parallel zu den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden Hellfeld-Aufnahmen der jeweiligen Objekte gemacht.

5.3 Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die Arbeiten zur Untersuchung der Verteilung von Chitosan in den Zellwänden der Infektionsvesikel und Primärhyphen von *C. graminicola* mittels Transmissions-Elektronen-Mikroskopie wurden von Dr. G. Hause, Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, durchgeführt.

Maisblätter der Sorte Mutin wurden wie unter Gldpkt. II.1.2 beschrieben mit Tropfen (10-50 µl) der Sporensuspension des Wildtyps CgM2 von *C. graminicola* inokuliert und bei 100 % Luftfeuchte für 40 Stunden inkubiert. Die Infektionsstellen wurden mit einer Rasierklinge aus dem Blatt herausgeschnitten und in Fixativ (0,25 % (w/v) Glutaraldehyd, 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS) 3 h bei RT fixiert (Rotator). Im Anschluss daran wurde in PBS-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄ 2 H₂O, 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen (3 mal 10 min) und je 30 min in 10 %, 30 % und 50 % EtOH dehydriert und die Proben über Nacht bei 4°C in 70 % EtOH aufbewahrt. Es schlossen sich weitere Entwässerungsschritte in steigenden Alkoholkonzentrationen an (15 min 70 %, 30 min 90 % und 2 mal 30 min 100 % EtOH). Zur Einbettung in LR White (LRW, LR White Resin Company Ltd., Berkshire, England) wurden die Proben langsam mit LRW infiltriert (schrittweise Aufkonzentrierung von LRW in der Probe) und 2 mal für 8 Stunden in konzentriertem LRW inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung in Gelatine kapseln und die Aushärtung der Proben bei 60°C im Trockenschrank (12-24 Stunden).

90 nm – Schnitte wurden auf Nickel-Grids aufgebracht und für 30 min in Blocking reagent (1 % (w/v) BSA (acetyliert), 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS) bei RT inkubiert. Danach erfolgte für die Proben der Chitosanmarkierung bei 4°C über Nacht die Inkubation mit dem

primären Antikörper (anti-Chitosan 1:1000 in Blocking reagent) oder mit Präimmenserum (1:1000 in Blocking reagent). Nach wiederholtem Waschen in Blocking reagent (4 mal 5 min) wurden die Proben für 90 min bei RT mit dem sekundären Antikörper (GAR-10 nm Gold, 1:100 in Blocking reagent) inkubiert. Die Proben der Chitinmarkierung wurden über Nacht bei RT in jeweils 20 µl-Tropfen WGA-Gold (WGA-10 nm Gold (Sigma), 1:200 in Blocking reagent) inkubiert. Alle Proben wurden nach mehreren Waschschritten (4 mal 5 min in Wasser) kontrastiert. Dazu wurden sie 60 min bei 25°C in Uranylacetat und anschließend 10 min bei 25°C in Bleicitrat inkubiert. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen.

Die Proben wurden mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (EM 900, Zeiss, Jena) analysiert.

6 Weitere Methoden

Bestimmung des Chitin-Gehalts

Für die Analyse der Zellwandzusammensetzung wurden die Zellwände vegetativer Hyphen der verschiedenen Pilz-Transformanten und des Wildtyps nach folgendem Protokoll isoliert:

Ca. 1 g Mycel wurde mit eiskaltem H₂O_{dest} gewaschen und mit einem Ultra-Turrax zerkleinert. Anschließend wurde erneut zweimal mit ca. 20 ml H₂O_{dest} gewaschen und dreimal mit 20 ml Chloroform/Methanol-Gemisch (1:1) extrahiert. Die Extrakte erschienen danach farblos. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Zellwände über eine Zentrifugation für 10 min bei 5000 g und 4°C im *swing-out* Rotor (HB-6) pelletiert. Danach wurde einmal mit Aceton gewaschen und das Material in der Speed-Vac getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Zellwände in flüssigem Stickstoff homogenisiert.

Das erhaltene Material wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Moerschbacher an der Universität Münster (Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen) mittels Gaschromatographie analysiert und die Mengen einzelner Zuckermonomere durch Auswertung der Chromatogramme bestimmt.

III Ergebnisse

1 Methodische Ansätze

1.1 Isolierung des Chitindeacetylase-Gens

Ein Chitindeacetylase-Fragment von *Colletotrichum lindemuthianum*, das freundlicherweise von Dr. Tokuyasu (National Food Research Institute, Tsukuba, Japan) zur Verfügung gestellt wurde, diente zur Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde. Mit Hilfe dieser heterologen Sonde wurde die genomische DNA-Bank von *C. graminicola* gescreent (s. Gldpkt. II.3.3). Diese DNA-Bank wurde von Dr. J. Rollins (Purdue-University, West Lafayette, IN, USA) hergestellt. Kolonien, die nach der Hybridisierung mit der heterologen Sonde starke Signale zeigten, wurden in LB_{amp} resuspendiert, auf frischen LB_{amp}-Platten in niedrigeren Kolonie-Dichten ausplattiert und erneut für eine Kolonie-Hybridisierung mit der *C. lindemuthianum* Chitindeacetylase-Sonde eingesetzt. Die Cosmide der Kolonien, die auch bei der zweiten *Screenig*-Runde ein starkes Signal zeigten, wurden isoliert. Eine direkte Amplifikation eines Chitindeacetylase-Fragmentes aus diesen Cosmiden mit Hilfe degenerierter Primer (vgl. Anhang VII.2) gelang nicht.

Es wurden deshalb durch Restriktionsverdau (s. Gldpkt. II.3.5.1) der isolierten Cosmide Fragmente klonier- und sequenzierbarer Größe erzeugt. Beim Doppelverdau mit EcoRI und HindIII hybridisierte bei den Klonen pSVcda1-3 ein Fragment von ca. 1,1 kb Größe mit der *C. lindemuthianum* Chitindeacetylase-Sonde. Die Fragmente des EcoRI/HindIII-Verdau wurden dann in ein mit denselben Restriktionsenzymen geschnittenes Plasmid (pTZ19R) ligiert und anschließend in den *E. coli*-Stamm DH10 β transformiert (s. Gldpkt. II.3.5.5 und II.3.7.2). Kolonien, die bei der Blau-Weiß-Selektion positiv waren, wurden in einem zweiten Selektionsschritt auf Nylon-Membranen gedottet und diese dann mit der heterologen Sonde aus *C. lindemuthianum* hybridisiert. Die Plasmide aus Kolonien mit starkem Signal bei der Hybridisierung wurden isoliert und einem EcoRI/HindIII-Verdau unterzogen. Das Plasmid mit dem 1,1 kb-Fragment (pTZcda) wurde sequenziert (s. Gldpkt. II.3.6). Durch Datenbank-Recherche konnte eine Homologie ($1-3e^{-16}$) mit Chitindeacetylase-Genen gezeigt werden.

Zur Sequenzierung von *up*- und *downstream*-Bereich des Gens wurde die isolierte Cosmid-DNA für die Sequenzreaktion eingesetzt. Das isolierte Gen wurde *CgCda1* bzw. das entsprechende Protein Chitindeacetylase1 bezeichnet.

1.2 Expression des Gens des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) unter Kontrolle des *CgCda1*-Promotors

Durch Fusion eines GFP-Reportergens, welches für ein fluoreszierendes Protein kodiert, mit dem Chitinacetylase-Promotor (5'-nichttranslatierender Bereich) ist es möglich, Untersuchungen zur Regulation der Expression der Chitinacetylase von *C. graminicola* durchzuführen. Nach Transformation in *C. graminicola* wurde das GFP-Gen unter Kontrolle des Chitinacetylase-Promotors exprimiert und seine Regulation fluoreszenzmikroskopisch verfolgt.

Dafür wurde zunächst ein 1411 bp großes Fragment aus Promotor-Region (1020 bp) und kodierender Region (390 bp) der Chitinacetylase1 von *C. graminicola* mittels PCR aus dem Cosmid pSVcda1 gewonnen. Durch Modifikation der verwendeten Primer verfügte das Fragment am 5'-Ende über eine XbaI-Schnittstelle und am 3'-Ende über eine NcoI-Schnittstelle. Parallel dazu wurde der kodierende Bereich des Gens des grünen fluoreszierenden Proteins gGFP (Maor *et al.*, 1998) in die BamHI-/EcoRI-Schnittstellen des Plasmides pTZ19R ligiert, was den Vektor pTZ_{GFP} ergab. Anschließend wurden sowohl Vektor als auch Promotor-Fragment der Chitinacetylase einem XbaI/NcoI-Verdau unterzogen, ligiert und in *E. coli* transformiert. Der dadurch gebildete Vektor wurde als pTZpca_{GFP} bezeichnet, da er ein Konstrukt aus dem Promotor von *CgCda1* (pca) und der kodierenden Sequenz des GFP-Genes (GFP) darstellt. Um zu bestätigen, dass das GFP-Gen *in frame* mit dem Leseraster des Chitinacetylase-Gens integriert ist, wurde dieser Bereich sequenziert.

Als weiterer Schritt war der Einbau eines Selektionsmarkers für die Transformation in *C. graminicola* notwendig. Dazu wurde zunächst das Plasmid pCR_{Hygr} (s. Gldpkt. III.1.3) mit XbaI verdaut und das 2119 bp-Fragment, das die Hygromycin-Resistenzkassette enthält, durch Eluierung der Bande aus dem Agarose-Gel gewonnen und in die XbaI-Schnittstelle des Plasmides pTZpca_{GFP} integriert (Plasmid pTZpca_{GFP/Hygr}, vgl. Abb. III.1). Dieses Plasmid wurde für die Transformation von *C. graminicola* (s. Gldpkt. II.3.7.1) eingesetzt.

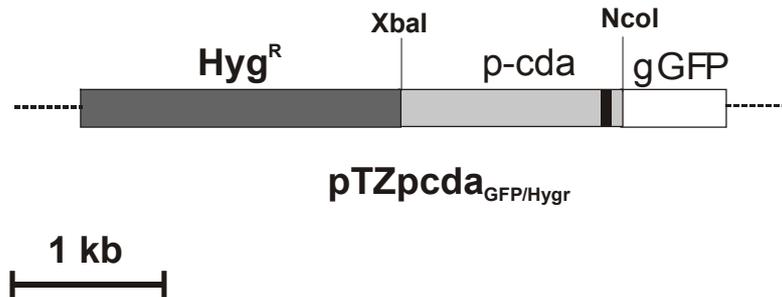


Abb. III.1: Promotor-GFP-Konstrukt des Chitinacetylase1-Gens von *C. graminicola*.

Der verwendete Bereich des Chitinacetylase1-Gens (Promotor und 390bp kodierende Region) ist hellgrau dargestellt, die Hygromycin-Resistenzkassette dunkelgrau und der kodierende Bereich des GFP-Gens weiß. Der schwarze Balken gibt Größe und Lage des Introns an. XbaI und NcoI geben die Position der Schnittstelle dieser Restriktionsenzyme an.

1.3 Knock-out Mutagenese

Die Geninaktivierung der isolierten Chitinacetylase wurde mittels *gene-disruption* (Stephenson *et al.*, 2000) durchgeführt, wobei die Hygromycin B-Resistenzkassette aus dem Plasmid pUCATPH (Lu *et al.*, 1994), die für die Hygromycinphosphotransferase aus *E. coli* kodiert, in das Chitinacetylase1-Gen von *C. graminicola* eingebaut wurde. Nach Transformation in *C. graminicola* wurde das Wildtyp-Gen durch homologe Rekombination mit den homologen Bereichen auf beiden Seiten der Resistenzkassette durch die mutierte Form ersetzt.

Dazu wurde zunächst die Hygromycin-Resistenzkassette als 2,5 kb großes Fragment mittels PCR (Primer M13 uni, M13 rev) aus dem Vektor (pUCATPH) gewonnen und in einen pCR[®]4-TOPO[®]-Vektor ligiert, was zum Plasmid pCR_{Hygr} führte. Dieser Vektor wurde mit Sall verdaut und das 2395 bp-Fragment, das die Hygromycin-Resistenzkassette enthält, nach elektrophoretischer Trennung aus dem Agarose-Gel eluiert.

Das Plasmid pTZcda (s. Gldpkt. III.1.1) wurde mit XhoI verdaut, wodurch das Gen der Chitinacetylase1 in zwei Fragmente von 468 pb und 371 pb Größe geschnitten wurde. Durch Ligation mit dem Fragment der Hygromycin-Resistenzkassette entstand das Plasmid pTZ Δ cda. Dieses wurde für die Transformation von *C. graminicola* eingesetzt (vgl. Abb. III.2). Es wird in den weiteren Ausführungen als knock-out Vektor bezeichnet.

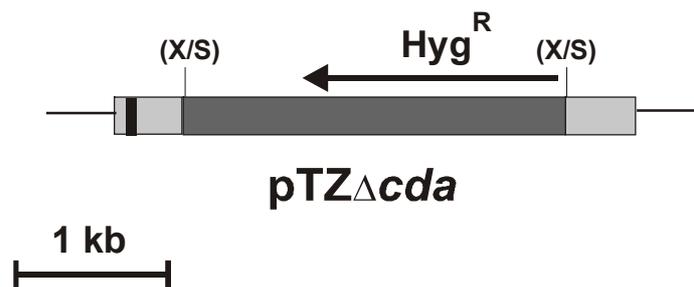


Abb. III.2: Knock-out Konstrukt des Chitinacetylase1-Gens von *C. graminicola*.

Der kodierende Bereich des Gens ist hellgrau dargestellt, die Hygromycin-Resistenzkassette dunkelgrau. Der schwarze Balken gibt Größe und Lage des Introns an. X und S geben die Position der Schnittstelle für XhoI bzw. Sall an. Klammern bedeuten, dass die ursprünglich dort vorhandene Schnittstelle durch die Ligation zerstört wurde.

2 Chitinacetylase aus *Colletotrichum graminicola*

2.1 Sequenzanalyse

Das Gen für die Chitinacetylase von *C. graminicola* (*CgCda1*) besitzt ein offenes Leseraster (*open reading frame*, ORF) von 839 bp. Dieses wird an Position 69-154 von einem Intron mit einer Länge von 86 bp unterbrochen. Es besitzt die für pilzliche Introns charakteristischen Consensus-Sequenzen am 5'- und 3'-Ende (Borgia *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1997). Zur Bestätigung von Lage und Größe des Introns wurde das mittels RT-PCR gewonnene Chitinacetylase-Transkript sequenziert.

Das *online*-Programm neural network promotor prediction (Reese & Eeckman, 1995) (http://www.fruitfly.org/cgi-bin/seq_tools/promoter.html) hat mit einer Wahrscheinlichkeit von 80 % den Promotor für den 50 bp großen Bereich von -248 bis -199 bp stromaufwärts des Translationsstartpunktes vorhergesagt. Der Transkriptionsstartpunkt befindet sich demnach an Position -208 bp. Eine mögliche TATA-Box ist 30 Nukleotide entfernt vom Transkriptionsstartpunkt in 5'-Richtung zu finden (-238 bp).

Mittels *in silicio* Analysen (MatInspector V2.2 beruhend auf der Datenbank Transfac 4.0) wurde der 5'-untranslatierte Bereich des Gens auf mögliche regulatorische Promotorelemente untersucht (vgl. Tab. III.1). Dabei wurde die Eingrenzung des Promotors auf den Bereich bis -248 bp nicht unkritisch hingenommen und die Analyse der Transkriptionsfaktoren auf den Bereich bis -1250 bp ausgedehnt.

Auffällig häufig wurden potentielle Bindungsstellen für den Faktor GCR1 (12 Übereinstimmungen) gefunden, der in *Saccharomyces cerevisiae* für eine hohe Expression von Genen der Glycolyse verantwortlich ist (Huie *et al.*, 1992). Er könnte als Hinweis auf eine konstitutive Expression der Chitindeacetylase1 in *C. graminicola* betrachtet werden.

7 Übereinstimmungen liegen mit der Bindestelle für den Faktor Nit2 vor. Dieser Transkriptionsfaktor aus *Neurospora crassa* verfügt über eine Zinkfinger DNA-Bindedomäne und stellt einen Hauptfaktor für die positive Regulierung von Genen, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind, dar (Fu & Marzluf, 1990).

Für den Transkriptionsfaktor MatA1, der zuerst bei *Saccharomyces cerevisiae* als responsives Element für den *mating* Faktor A1 beschrieben wurde (Goutte & Johnson, 1994), können 5 Bindungsstellen angenommen werden.

Ebenfalls auffällig viele Bindestellen sind für Faktoren vorhanden, die eine Reaktion auf äußere Umwelteinflüsse ermöglichen (4 Bindestellen für den Stre-Faktor und 4 für den PACC-Faktor). Stre-Faktoren sind in zahlreichen Genen von *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben und spielen eine Rolle bei stressabhängiger Genaktivierung nach Hitzeschock, Stickstofflimitierung, oxidativem und osmotischem Stress (Schuller *et al.*, 1994). Der PACC-Faktor, der zuerst in *Aspergillus nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995) beschrieben wurde, ist ein pH-responsiver Regulator. Er kodiert für eine pH-Wert-responsive Zinkfinger DNA-Bindedomäne (Denison, 2000).

3 weitere Bindestellen sind für den Faktor MIG1 vorhanden, der ebenfalls mittels Zinkfinger DNA-Bindedomäne in der Bäckerhefe an der Glucose-Reprimierung verschiedener Gene beteiligt ist (Lundin *et al.*, 1994).

Für StuA konnte in *Aspergillus nidulans* eine Rolle bei der Differenzierung von Hyphen zu sexuellen und asexuellen Fortpflanzungsorganen gezeigt werden. Bei *C. graminicola* sind im untersuchten 5'-untranslatierten Bereich 3 potentielle Bindestellen für diesen Faktor vorhanden.

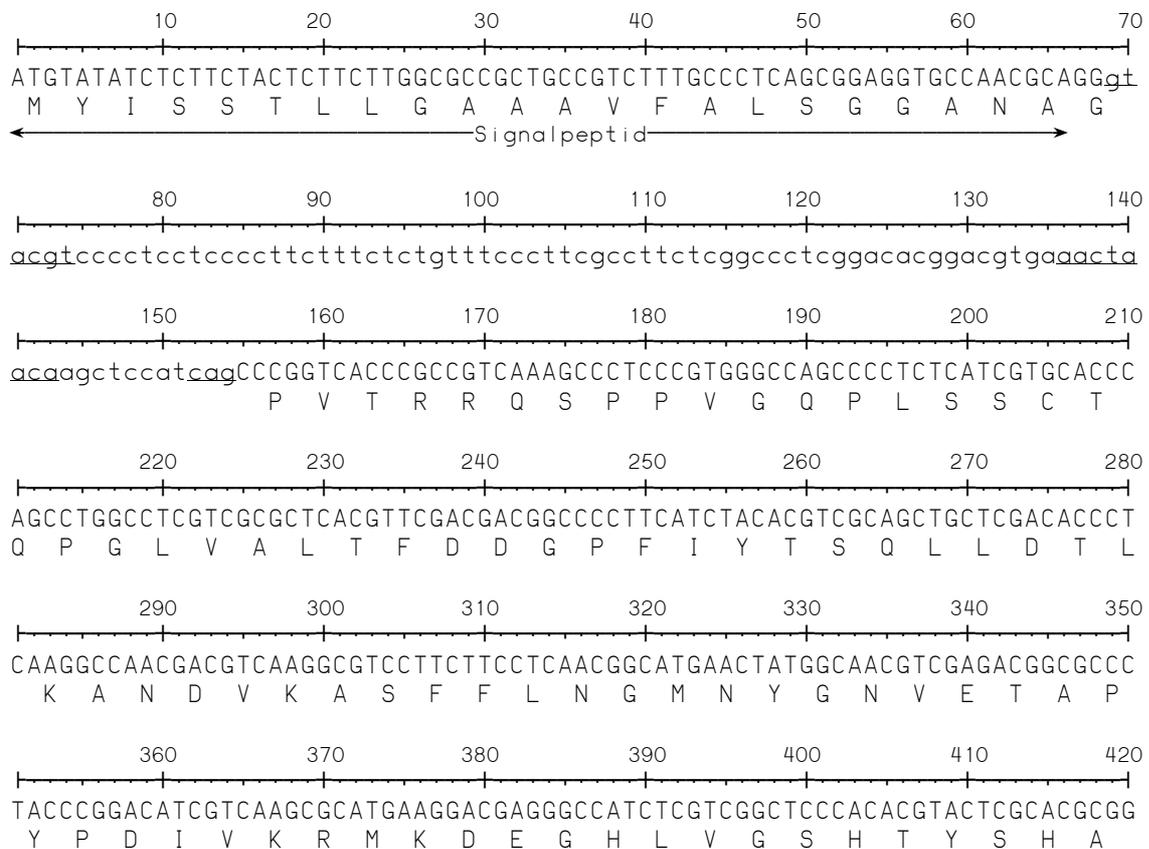
Tab. III.1: Promotorelemente im 5'-untranslatierten Bereich des Chitinacetylase1-Gens von *C. graminicola*. Es wurden 1250 Basen vor dem Translationsstart berücksichtigt. Die Konsensussequenz besteht aus einem stark konservierten Kernbereich (Großbuchstaben) und einer weniger stark konservierten Umgebung (Kleinbuchstaben). Dabei bedeuten: N = A, T, G, C; W = A, T; M = A, C; R = A, G; K = G, T; H = T, A, C; D = T, A, G; V = C, G, A; B = T, G, C; Y = C, T; S = C, G

Element	Konsensus	Position im CgCda1-Gen	Referenz
GCR1	mnCHTCcdn	-1056, -983, -854, -750, -721, -705, -535, -270, -159, -152, -145, -24	(Huie <i>et al.</i> , 1992)
Nit2	TATCnd	-1123, -1011, -708, -640, -614, -130, -113	(Fu & Marzluf, 1990)
MatA1	kGATGkvdbk	-878, -589, -243, -95, -10	(Goutte & Johnson, 1994)
Stre	ngAGGGgr	-1084, -519, -509, -493	(Schuller <i>et al.</i> , 1994)
PACC	vbybGCCAvgvvvkywy	-1081, -682, -599, -329	(Tilburn <i>et al.</i> , 1995)
StuA	dkyCGCGhks	-996, -969, -20	(Dutton <i>et al.</i> , 1997)
MIG1	krswmaahsbGGGms	-1143, -725, -218	(Lundin <i>et al.</i> , 1994)

Das gesamte Protein umfasst 250 Aminosäuren und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 27,18 kDa. Über den Service der TRANSFAC *transcription factor database* (Lebel *et al.*, 1998) wurde die Proteinstruktur genauer charakterisiert. Danach stellte der Bereich der ersten 22 Aminosäuren das Signalpeptid dar. Das verbleibende Strukturpeptid umfasst 228 Aminosäuren und besitzt somit ein berechnetes Molekulargewicht von 25,11 kDa.

Abb. III.3 zeigt die Nukleotidsequenz des Chitinacetylase1-Gens von *C. graminicola* einschließlich der sequenzierten *up-* und *downstream*-Bereiche und der möglichen Bindestellen für Transkriptionsfaktoren.

GGAGGGAGTAAAAACGAAACAAAGTTTGAAGGAAAAGTGTCCAGGCACCCAAGCTAAAGG -1191
 AAGGGCTGGATCAACAACGGTGTCTGTTGGCGCATACTTAGCCGGTCCCAGATTGAGGCATCTTGATACA -1121
 GCGGACAGCGGCGCTTGTTGCTGACTCGAACCCCCCTGGCCGGGTTTGGCCGAGTCCCATGCGGGTTCCT -1051
 ACGCCAGAACACACCACTTACAGTCTCAATTTACCGTTTATCTAGCGTCGTTCCGCGTTGCCCCAGCCAT -981
 CCTCCGCAAGCCGCGAGCAGCCAGCCTGTCAGCTAGTCAGCATGGTTGCCACCTTTTTGGCATTGGCAGT -911
 GTTGTGTGTGCCGACTCGCAAGTGCCAGTATGATGGAATGGCAGATTTGCTCTGCCTCCACATCCCGG -841
 TGGGCTGAAATGGTTTCTCGTCTCACCCATCCAAAGGTACCATGTCTCTTGTGAGAAGAATCCTTCCA -771
 GTCAGCTGTCAGCTTAACGGCTCAAGCCTCTTGACGTCAAACCGGGGCTCCTCCACGGCTATCTTCC -701
 TGTAACCTCCTCAGTCCGCCATGCCCTTTCGCCGTACCATGTACGGGGTCTACAGCTCGTATCGGAGCC -631
 TCATCCGTCGTACGATAAATCCTTGACAGCTGCCAAGACATCATGACGCCCCAGGGCTGAACGGCCAACA -561
 TCCGTCGAGCACCTCGAAGCAAGCGCTTCATGCGGGATGGAGGGGGATGAGGGGGAGGGTAGGAGAGG -491
 GGAGGACGGGCCACCGTCTCCGTCTTCTTCGTCCGGTTTCTCAAACCTCGTCGACGATGAGGCAGGACAGC -421
 CACCCTTCGCAGCCTGCGGGTTCGTCTCTTAGCGGGACAATGATTAAGCTCTGCTCATGGATGAGTCGG -351
 CCAAGGGTGGTGAGTTCTTGGCAAGGACCCGTCAAACCTCAGACCGTTTCAAGTGTGTTGCATGTCTCCTTC -281
 TGTCAGACTCTTCTCCGTAACGTCTCAAATCCCATCATCATATAAGTCTTCTGCTTCTCCCCCGTTT -211
 TGCCCAACCTCTCGACTTGGCTTCATCCTGCATCCTGCATCCTGCACCCTGCTTCTGCTTCTGCTTCC -141
 TGCTTCTCGTATCCAAGCAAGCTTAAAGCTTAAATATCAACCTCACTCACATCCGAGTCCCTGTACCCACTGACTT -71
 TCCCGGTCACTGTCACTGTCACTCTCAGTCTCACTTACTACCAAGACTTCCGCGCTCCATCACAGCAGCC -1



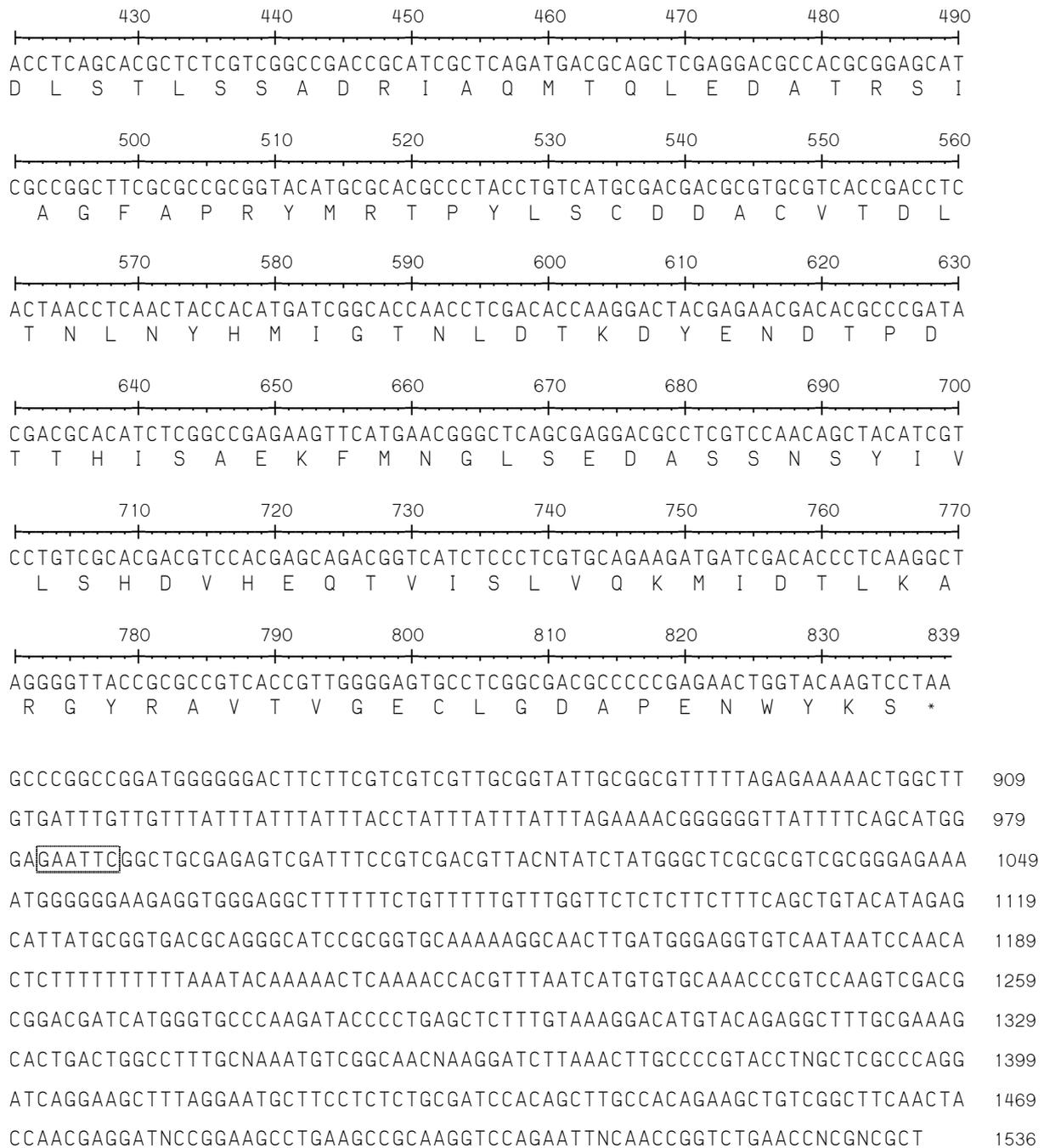


Abb. III.3: Nukleotidsequenz des Chitinacetylase1-Gens (*CgCda1*) aus *C. graminicola* und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz (einschließlich *up*- und *downstream*-sequenzierter Bereiche und möglicher Bindestellen für Transkriptionsfaktoren).

Der ORF umfasst 839 Basen und besitzt ein Intron (mit Kleinbuchstaben geschriebener Bereich innerhalb der Gensequenz). Die Erkennungssequenzen des Introns sind unterstrichen. Die für die Klonierung genutzten EcoRI- und HindIII-Schnittstellen sind eingerahmt.

Die Farben symbolisieren die Erkennungssequenz potentieller Bindestellen der Transkriptionsfaktoren: GCR1 (grün), Nit2 (rot), MatA1 (blau), Stre (violett), PACC (pink), StuA (dunkelblau), MIG1 (braun).

Gegenwärtig ist neben den Chitinacetylase-Sequenzen des Zygomyceten *Mucor rouxii* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993d), der taxonomisch relativ weit von *C. graminicola* entfernt steht, und der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Christodoulidou *et al.*, 1996) auch die Sequenz der Chitinacetylase von *Blumeria graminis* (Arbeitsgruppe um S. J. Gurr) bekannt. Daneben sind Sequenzinformationen der Chitinacetylase von *Colletotrichum lindemuthianum* (Tokuyasu *et al.*, 1999b), also eines zur selben Gattung wie *C. graminicola* gehörenden Pilzes, verfügbar. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen dieser Chitinacetylase unter Einbeziehung der nahestehenden Gruppe der NodB-Proteine zeigt, dass nur wenige kurze hochkonservierte Bereiche vorliegen. Lediglich zur Chitinacetylase von *C. lindemuthianum* sind auf Aminosäureebene 69 % Identität vorhanden. Die NodB-Proteine, welche (neben den NodA- und NodC-Proteinen) an der Synthese der Nod-Faktoren beteiligt sind, die die Bildung von Knöllchen an den Wirtsleguminosen auslösen (Hirsch, 1992), stehen dem CgCda1-Protein strukturell ebenfalls sehr nahe (vgl. Abb. III.4).

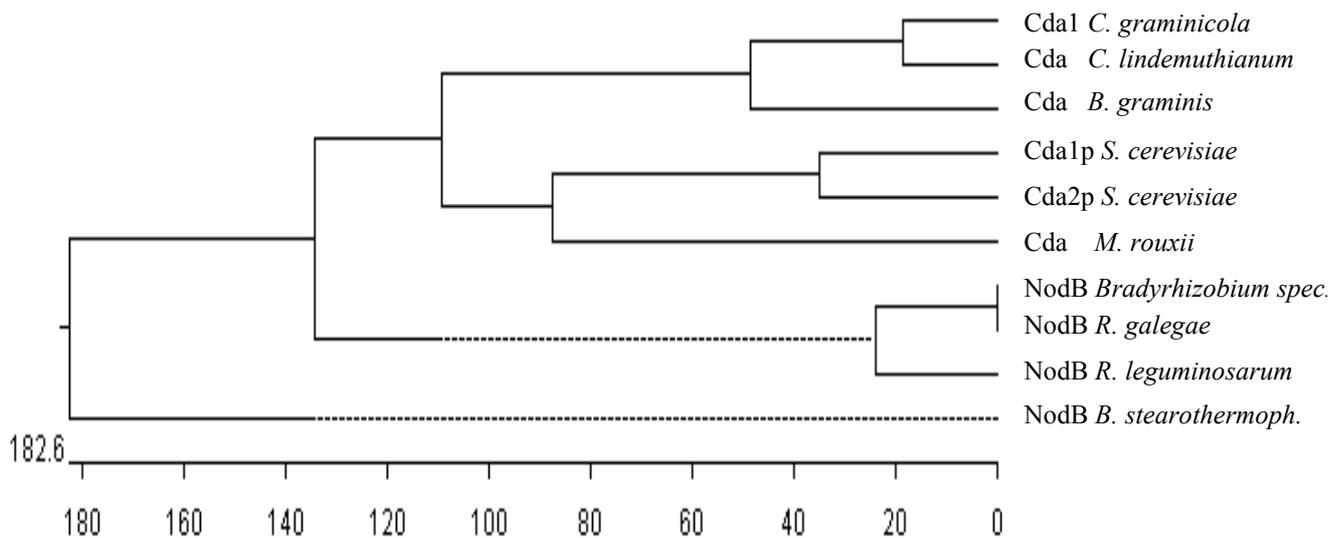


Abb. III.4: Phylogenetischer Baum der Chitinacetylase unter Einordnung der sequenzierten Chitinacetylase I von *C. graminicola*.

Für das Alignment wurden nur vollständige Sequenzen aus der Genbank benutzt. Die Zugangsnummern der Gene für die Genbank sind: NodB *Rhizobium galegae*: P50354; NodB *Rhizobium leguminosarum*: P04339; NodB *Bacillus stearothermophilus*: B47692; Cda1p *Saccharomyces cerevisiae*: Q06703; Cda2p *Saccharomyces cerevisiae*: Q06702; Chitinacetylase *Mucor rouxii*: P50325; Chitinacetylase *Blumeria graminis*: AAK84438; die Sequenz der Chitinacetylase von *Colletotrichum lindemuthianum* wurde von Dr. Tokyjasu zur Verfügung gestellt.

Über den Service der NCBI (Altschul *et al.*, 1997) wurde die Proteinstruktur nach möglichen Strukturdomänen analysiert. Der Bereich der Aminosäuren 44 bis 183 wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit als Polysaccharid Deacetylase Domäne ($1 \cdot 10^{-24}$) erkannt (vgl. Abb. III.5). Diese Strukturdomäne findet sich ebenfalls in den Chitindeacetylasen der anderen Pilze, den NodB-Proteinen unterschiedlicher Rhizobium-Arten und in Endoxylanasen, welche glycosidische Bindungen im Xylan hydrolysieren.

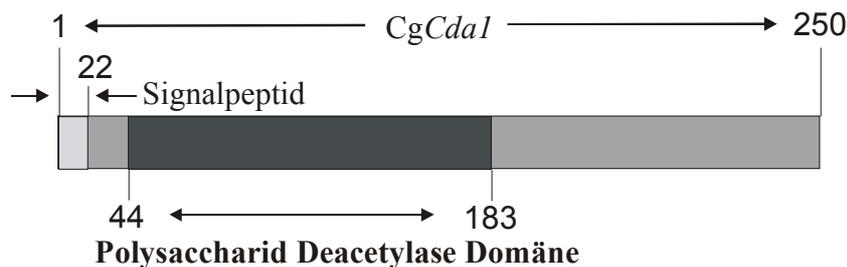


Abb. III.5: Schematische Darstellung der Proteinstruktur und der Polysaccharid Deacetylase Strukturdomäne der Chitindeacetylase 1 in *C. graminicola*.

Das Signalpeptid (hellgrau) umfasst die ersten 22 Aminosäuren des Gens. Die Polysaccharid Deacetylase Domäne (dunkelgrau) erstreckt sich über den Bereich der Aminosäuren 44 bis 183.

2.2 Regulation der Genexpression

2.2.1 RT-PCR

Zur Untersuchung der Regulation der Transkription des Chitindeacetylase-Gens wurde Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien des Pilzes isoliert (Chomczynski & Sacchi, 1987). Um Verunreinigungen durch DNA auszuschließen, wurde zum einen ein DNase-Verdau durchgeführt. Zum anderen wurden die Primerpaare so gewählt, dass das genomisch amplifizierte Fragment ein Intron enthält, wodurch bei DNA als *template* die PCR-Produkte 86 bp größer sind als die der RT-PCR (Primerkombination CDA-C.gr.-3 und CDA-C.gr.-4, vgl. Anhang VII.2).

Da Werner (1997) in Abhängigkeit von den Kulturbedingungen Unterschiede im Enzymmuster der Chitindeacetylasen feststellte, wurde für die RNA-Isolation der Pilz in Flüssigmedium oder auf einer Cellophan-Oberfläche kultiviert.

Die RT-PCR mit spezifischen Primern ergab, dass Chitinacetylase-Transkripte sowohl in den Appressorien, als auch in vegetativen Pilzhyphen vorliegen. In ruhenden Sporen von *C. graminicola* war kein Nachweis der Chitinacetylase möglich (vgl. Abb. III.6).

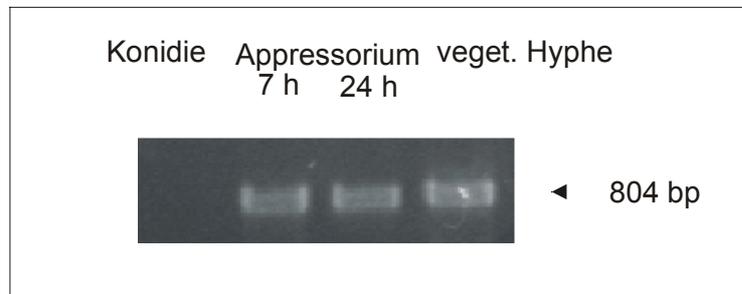


Abb. III.6: RT-PCR mit spezifischen Primern für das Chitinacetylase1-Gen unterschiedlicher Differenzierungsstadien von *C. graminicola*. Die RNA wurde aus Konidien, nicht melanisierten und melanisierten Appressorien und vegetativen Hyphen aus Flüssigmedium gewonnen. Die Fragmente besitzen eine Größe von 804bp.

Daneben wurde auch die Transkription des Chitinacetylase1-Gens während des Infektionsverlaufes untersucht. Dazu wurde RNA aus Maisblättern nach unterschiedlichen Zeiten nach Inokulation gewonnen und mittels RT-PCR das Vorkommen von Chitinacetylase-Transkripten überprüft. Die Chitinacetylase-Expression konnte für die frühen Phasen der Infektion nachgewiesen werden (vgl. Abb. III.7).

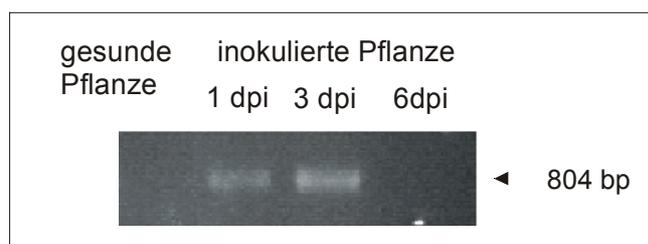


Abb. III.7: RT-PCR mit spezifischen Primern für das Chitinacetylase1-Gen von *C. graminicola* auf inokuliertem Blattmaterial. Die RNA wurde aus gesunden Pflanzen und unterschiedlich lang inokulierten Maispflanzen gewonnen. Das amplifizierte Fragmente besitzt eine Größe von 804bp.

2.2.2 Western Blot

Weiterhin wurden Untersuchungen zur Regulation auf der Ebene der Translation durchgeführt. Dafür wurden gegen einen Abschnitt der Chitinacetylase1 polyklonale

Peptid-Antikörper hergestellt. Die Herstellung dieser polyklonalen Antikörper wurde bei der BioScience GmbH, Göttingen, in Auftrag gegeben. Der Bereich der Aminosäuren 170 bis 184 des Enzyms wurde als optimaler Abschnitt ausgewählt. Das Peptid wurde synthetisiert und als Antigen bei der Immunisierung von Kaninchen verwendet. Mit diesem konnte das CgCda1-Protein sowohl im Homogenat vegetativer Hyphen als auch in extrazellulärer Waschflüssigkeit nachgewiesen werden (vgl. Abb. III.8).

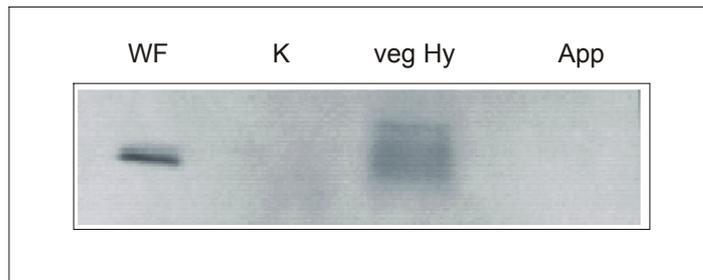


Abb. III.8: Nachweis der Chitinase 1 von *C. graminicola* im Western Blot. Blots von Proteinextrakten (je 20 µg) aus extrazellulärer Waschflüssigkeit (WF), Konidien (K), Appressorien (Ap) und vegetativen Hyphen (veg Hy) wurden mit polyklonalen Antikörpern gegen dieses Enzym geprobt. Die nachgewiesenen Proteine besitzen eine Größe von ca. 25 kDa.

2.2.3 Expression mit GFP-Fusion

Die Bildung von Infektionsstrukturen verläuft bei *C. graminicola* nicht synchron. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass bei der Isolierung der Gesamt-RNA RNAs unterschiedlich weit differenzierter Strukturen isoliert wurden. Um die Ergebnisse der RT-PCR verifizieren zu können, sollte durch Ligation eines fluoreszierenden GFP-Reportergens hinter den Chitinase 1-Promotor die Regulation der Chitinase 1-Promotoraktivität von *C. graminicola* während der Infektion von Pflanzen untersucht werden.

Nach Transformation in *C. graminicola* sollte das GFP unter Kontrolle des Chitinase 1-Promotors exprimiert und kann fluoreszenzmikroskopisch verfolgt werden. Die Konstruktion des geeigneten Transformationsvektors (pTZpcda_{GFP/Hygr}) wurde unter Gldpkt. III.1.2 beschrieben.

Dieser Vektor wurde in *C. graminicola* transformiert. Neben ihrer Hygromycin-Resistenz wurden die einzelnen Transformanten auch mittels PCR und unter Verwendung konstrukt-spezifischer Primer (vgl. Anhang VII.2) auf die Anwesenheit des Vektors überprüft. 18 verschiedene Transformanten, die sowohl Hygromycin-resistent waren, als auch das Promotor-GFP-Konstrukt integriert hatten, wurden fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Als Kontrolle für die Funktionsfähigkeit des GFP in *C. graminicola* diente das Plasmid gGFP, das

neben einer Hygromycin-Resistenz das GFP-Gen unter Kontrolle des GAPDH-Promotors von *Aspergillus nidulans* besitzt (Maor *et al.*, 1998).

Die Kontrolle zeigte eine gut sichtbare grüne Fluoreszenz von Konidie, Keimschlauch und vegetativen Hyphen (vgl. Abb. III.9). Eine Expression des GFP in allen untersuchten Transformanten konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt gezeigt werden. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte darin zu suchen sein, dass der gewählte Promotorbereich noch zu klein ist. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass dieses Gen während der pilzlichen Entwicklung nur sehr schwach exprimiert wird.

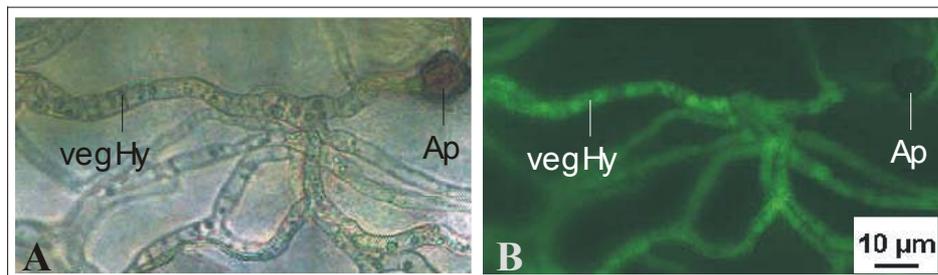


Abb. III.9: GFP-Expression in primären Hyphen von *C. graminicola* unter Kontrolle des GAPDH-Promotors auf der Cuticula inokulierter Maisblätter. Bei starker Expression ist die grüne Fluoreszenz der Hyphen des Pilzes gut sichtbar. Eine Konidie ist in diesem Beispiel nicht abgebildet.

2.3 Inaktivierung der Chitindeacetylase CgCda1

Nachweis der Geninaktivierung

Ein Nachweis der homologen Rekombination des Vektors pTZ Δ cda1 (knock-out Vektor) und somit der erfolgreichen Geninaktivierung erfolgte zunächst durch PCR. Aus den hygromycinresistenten Transformanten, die somit über mindestens einen integrierten Vektor verfügen mußten, wurde DNA isoliert. Durch die Wahl unterschiedlicher Primerkombinationen war es möglich, Transformanten mit homologer Integration des Vektors (Primerkombination CDA-P-EcoRI oder CDA-C.gr.-R5 und hph4, vgl. Anhang VII.2) von solchen mit ektopisch integriertem Vektor (Primerkombination CDA-C.gr.-3 oder 4 und hph4, vgl. Anhang VII.2) zu unterscheiden. Neben drei Chitindeacetylase1-defizienten Mutanten (Δ Cgcda1.26, Δ Cgcda1.30 und Δ Cgcda1.40) wurden auch zwei Isolate mit ektopischer Integration des Vektor (T_{ekt} 24 und T_{ekt} 29) in die weiteren Untersuchungen einbezogen.

In einem weiteren Schritt wurden diese Transformanten durch RT-PCR auf die Anwesenheit von Chitinacetylase1-Transkripten getestet und keine Transkripte in den knock-out-Mutanten nachgewiesen. Eine weitere RT-PCR mit einer Primerkombination, die lediglich einen kurzen Bereich nach Transkriptionsstartpunkt des Chitinacetylase1-Gens abdeckte, zeigte, dass die Transkription erst durch die integrierte Hygromycin-Resistenzkassette abgebrochen wird (vgl. Abb. III.10).

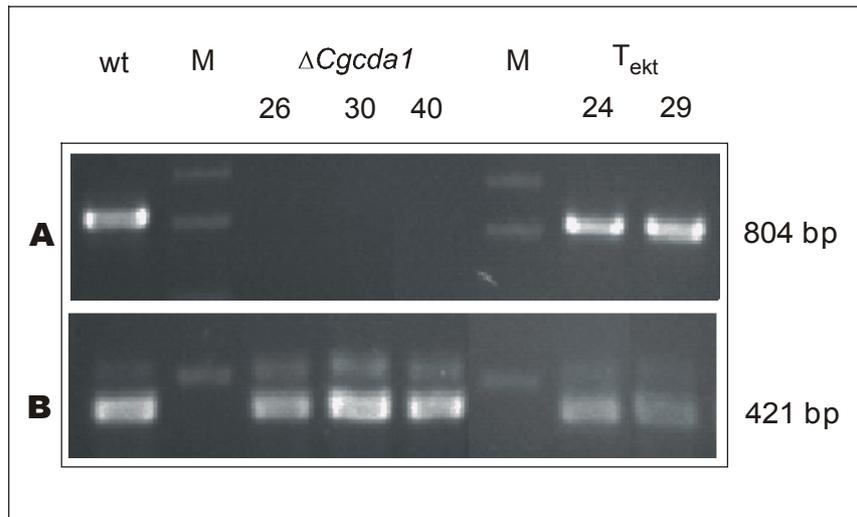


Abb. III.10: RT-PCR mit spezifischen Primern für das Chitinacetylase1-Gen von *C. graminicola*. Die RNA wurde aus vegetativen Hyphen des Wildtyp-Isolates (wt), der Chitinacetylase1-defizienten Mutanten ($\Delta Cg\mathit{cda1}$ 26, 30 und 40) und der Transformanten mit ektopisch integriertem knock-out Vektor (Tekt 24 und 29) gewonnen. Unter A sind Transkripte der Primerkombination CDA-C.gr.-3 und CDA-C.gr.-4 (vgl. Anhang VII.2) amplifiziert. B zeigt die Amplifikation eines 421 bp großen Fragmentes 5' vor der Integrationsstelle der Hygromycin-Resistenzkassette (Primerkombination CDA-C.gr.-3 und CDA-C.gr.-S1, vgl. Anhang VII.2). Die Doppelbanden in B werden auf einen unvollständigen DNase-Verdau zurückgeführt. M = Größenmarker

Weiterhin wurde mittels eines genomischen Southern untersucht, wieviele Kopien des *CgCda1*-Gens im Wildtyp vorliegen und ob die Transformanten über das veränderte Gen verfügen. Dazu wurde die aus den Transformanten gewonnene genomische DNA mit Restriktionsenzymen (EcoRI / HindIII) verdaut und mit einer spezifischen Sonde für das Chitinacetylase1-Gen geprobt (vgl. Abb. III.11).

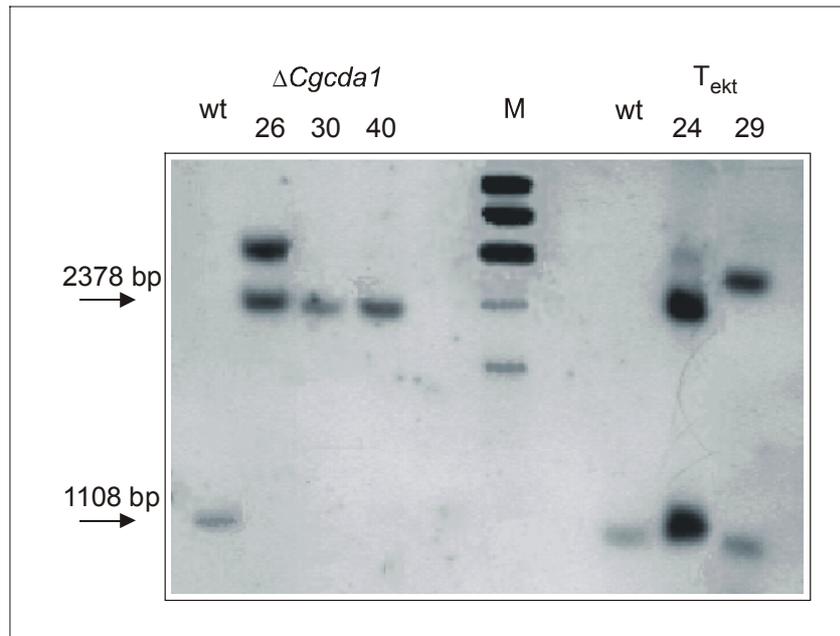


Abb. III.11: Genomischer Southern-Blot der verschiedenen Pilztransformanten. Genomische DNA wurde mit EcoRI und HindIII verdaut, elektrophoretisch getrennt, auf eine Nylon-Membran geblottet und mit einer DIG-markierten CgCda1-Sonde geprobt. Das Wildtyp-Gen (1108 bp) ist sowohl im Wildtyp (wt) als auch in den Transformanten mit ektopischer Integration des knock-out Vektors (Tekt 24 und 29) vorhanden. Die *CgCda1*-defizienten Mutanten ($\Delta Cgcda1$ 26, 30 und 40) zeigen die Bande, die für das Chitindeacetylase1-Hygromycin-Konstrukt erwartet wurde (2378 bp). M = Größenmarker

Das Wildtyp-Gen (*CgCda1*) läßt sich in einer Kopie für den Wildtyp und die Transformanten mit ektopisch integriertem Vektor nachweisen. Bei Letzterem kommt zusätzlich zum Wildtyp-Gen noch eine weitere deutlich größere Bande hinzu, die sich durch das Chitindeacetylase1-Hygromycin-Konstrukt ergibt. Die $\Delta Cgcda1$ -Transformanten mit homologer Rekombination des Vektors verfügen ausschließlich über das Chitindeacetylase1-Hygromycin-Konstrukt (Abb. III.11). Die Transformante $\Delta Cgcda1.26$ besitzt zusätzlich zum homolog integrierten Vektor einen ektopisch integrierten Vektor.

Zusätzlich wurden die Transformanten auf Chitindeacetylase-Aktivität geprüft. Dazu wurden in substrathaltigen Gelen die Proteine extrazellulärer Waschflüssigkeit aufgetrennt und das Reaktionsprodukt Chitosan mit Hilfe von Calcofluor sichtbar gemacht. Chitindeacetylase-Aktivität ist so nach gelelektrophoretischer Trennung eines Proteingemisches gut nachweisbar (Trudel & Asselin, 1990).

Im Substratgel wurde deutlich, dass der Wildtyp über drei Isoformen der Chitindeacetylase verfügt (vgl. Abb. III.12). Neben der kleineren und deutlich aktiveren Isoform mit einer

Größe von ca. 25 kDa existiert eine Isoform mit einem Molekulargewicht von ca. 41 kDa. In den Chitinacetylase1-defizienten Mutanten sind diese beiden Isoformen des Enzyms nicht mehr nachweisbar. Eine dritte Isoform mit einem Molekulargewicht größer 200 kDa ist aber in allen Transformanten nachweisbar.

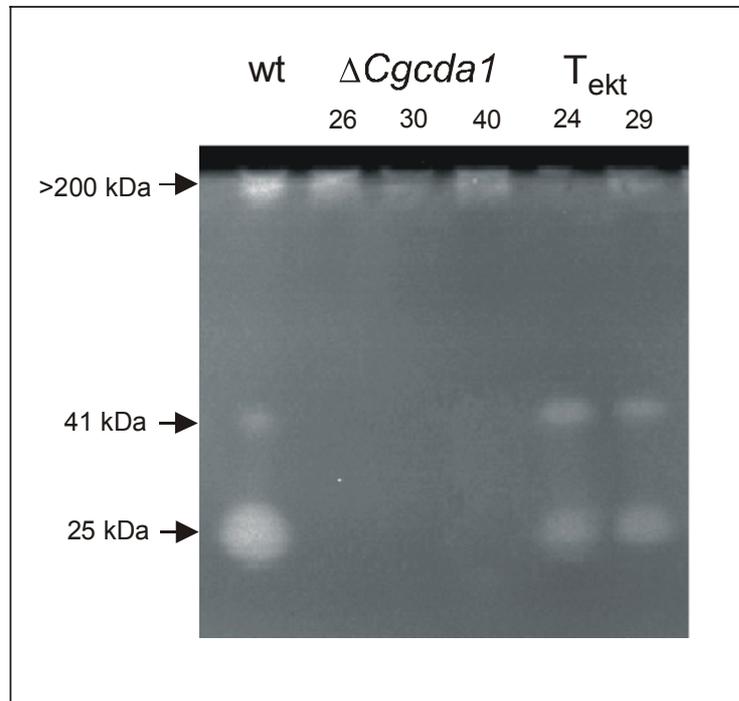


Abb. III.12: Chitinacetylase-Isoformen im Substrat-SDS-PAGE. Aufgetragen sind extrazelluläre Waschflüssigkeiten des Wildtyp (wt) und der Transformanten ($\Delta Cgca1$ 26, 30 und 40 sowie T_{ekt} 24 und 29); als Substrat dient Glykol-Chitin; M = Größenmarker

2.4 Evaluierung der Pathogenität und Charakterisierung des Phänotyps der Mutanten

Die Transformanten mit ektopischer bzw. homologer Integration des knock-out Vektors wurden in Virulenztests überprüft und bezüglich ihres Phänotyps untersucht.

2.4.1 Wachstumsuntersuchungen

Platten mit unterschiedlichen Nährsubstraten (Haferflocken- und Minimalmedium) wurden mit den Pilzisolaten inokuliert und unter optimalen Bedingungen (s. Gldpkt. II.1.1.1) inkubiert. Bezüglich Morphologie (vgl. Abb. III.13) und Wachstumsgeschwindigkeit des

gebildeten Mycels konnten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Isolaten gezeigt werden. Die Konidienlager der T_{ekt} 24 mit ektopisch integriertem Vektor verfügen über eine leicht ins rötliche verschobene Pigmentierung, die aber keinen sichtbaren Einfluss auf die Wachstumsgeschwindigkeit des Mycels besitzt. Alle untersuchten Isolate zeigten auf Minimalmedium eine durchschnittliche Zunahme der Flächenausdehnung des Mycels von 4 bis 5 mm pro Tag.

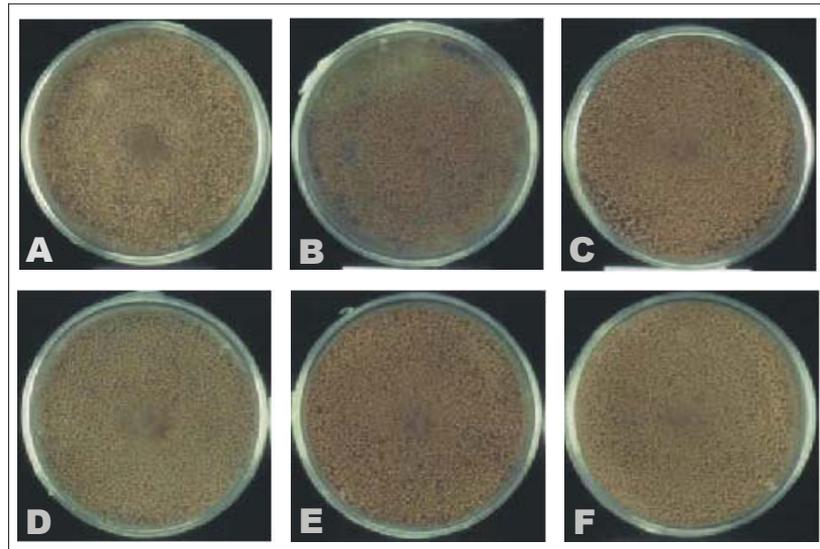


Abb. III.13: Morphologie der Transformanten auf Haferflockenmedium.

Zwischen den Transformanten und dem Wildtyp sind keine Unterschiede zu erkennen. Die orangefarbene, bei der Transformante T_{ekt} 24 (B) leicht ins Rötliche verschobene Pigmentierung wird durch die Konidienlager auf der Oberfläche des Mycels hervorgerufen.

A – Wildtyp, B - T_{ekt} 24, C - T_{ekt} 29, D - $\Delta CgCda1$ 26, E - $\Delta CgCda1$ 30, F - $\Delta CgCda1$ 40

Innerhalb des zeitlichen Verlaufs der Bildung von Infektionsstrukturen (Konidienkeimung, Appressoriendifferenzierung) gab es bei den *in vitro*-Tests keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den *CgCda1*-defizienten Isolaten.

Hier tritt wiederum die Transformante T_{ekt} 24 hervor. Während der Wildtyp auf festen Unterlagen in diesem Medium (500fach verdünnte Kartoffeldextrose, vgl. Gldpkt. II.1.1.1) Appressorien unmittelbar nach einem sehr kurzen Keimschlauch differenziert, zeigt unter gleichen Bedingungen die Transformante T_{ekt} 24 im wesentlichen vegetatives Wachstum; nur wenige Sporen differenzieren nach langem Keimschlauchwachstum Appressorien (vgl. Abb. III.14). Diese Tatsache lässt vermuten, dass durch die ektopische Integration des Vektors essentielle Gene für die Oberflächenerkennung oder die Signaltransduktion inaktiviert wurden.

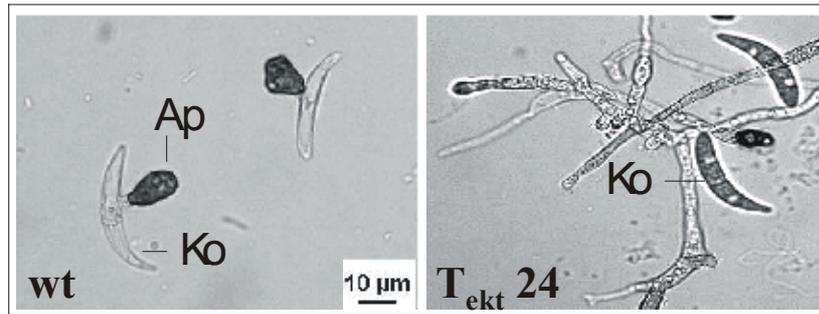


Abb. III.14: Infektionsstrukturen von *C. graminicola*.

Der Wildtyp differenziert in der Regel aus einem kurzen Keimschlauch pro Konidie ein melanisiertes Appressorium. Die Transformante T_{ekt} 24 ist in der Differenzierung von Infektionsstrukturen gestört.

2.4.2 Virulenztests

Von großem Interesse war, ob die *CgCda1*-defizienten Mutanten in der Lage sind, erfolgreich ihre Wirtspflanze zu infizieren. Dazu wurde Sporensuspension der einzelnen Isolate in definierter Konzentration auf Blätter der Maissorte Mutin ausgebracht. Die Symptombildung wurde makroskopisch und mikroskopisch verfolgt.

Es konnten keine Unterschiede in Infektionsverlauf und Virulenz der verschiedenen Transformanten festgestellt werden. Die $\Delta Cgcdc1$ -Mutanten sind voll virulent. Sie können die Zellwand ihrer Wirtspflanze penetrieren und effektiv angrenzendes Wirtspflanzengewebe besiedeln. Auch eine vor der Inokulation erfolgte Aktivierung der pflanzlichen Abwehrmechanismen durch Salicylsäurebehandlung, die Chitinasen induziert, reduzierte die Virulenz der Transformanten nicht (vgl. Abb. III.15).

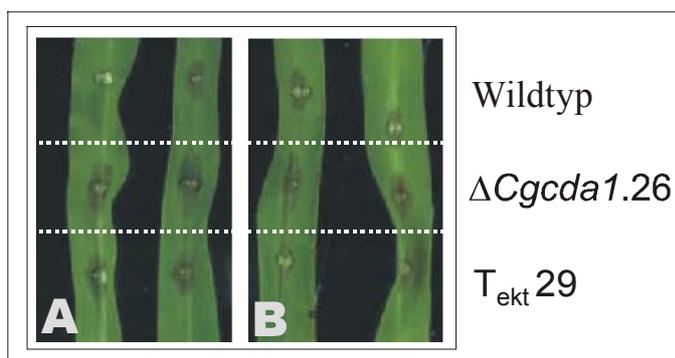


Abb. III.15: Virulenztest mit $\Delta Cgcdc1$ -Mutanten unter Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen.

Auf abgeschnittene Blätter der Pflanzen wurden Tropfen einer Sporensuspension definierter Konzentration aufgebracht. Unter A sind Blätter un behandelter Maispflanzen inokuliert, unter B erfolgte 24 Stunden vor Inokulation eine Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen durch Behandlung der Pflanzen mit 30 mM Salicylsäure.

Es wurde außerdem untersucht, ob sich die Transformanten auf unterschiedlichen Maissorten (die Silomaisorten Kanzler, Banguy, Mutin und Zuckermais-F1-Hybriden) in ihrer Virulenz unterscheiden. Dazu wurden ganze Pflanzen ohne vorhergehende Induktion der Abwehr mit einer Sporensuspension der untersuchten Isolate inokuliert. Der Infektionsverlauf wurde makroskopisch verfolgt. Bezüglich der Virulenz der Isolate konnten keine gravierenden Unterschiede festgestellt werden.

Geringere Unterschiede zeigten sich zum einen in einer leicht gesteigerten Symptomausprägung beim Silomais der Sorte Mutin nach Infektion mit den *CgCda1*-defizienten Mutanten. Generell konnte eine erhöhte Anfälligkeit von Zuckermais gegenüber dem Wildtyp und allen verwendeten Transformanten beobachtet werden (vgl. Abb. III.16).

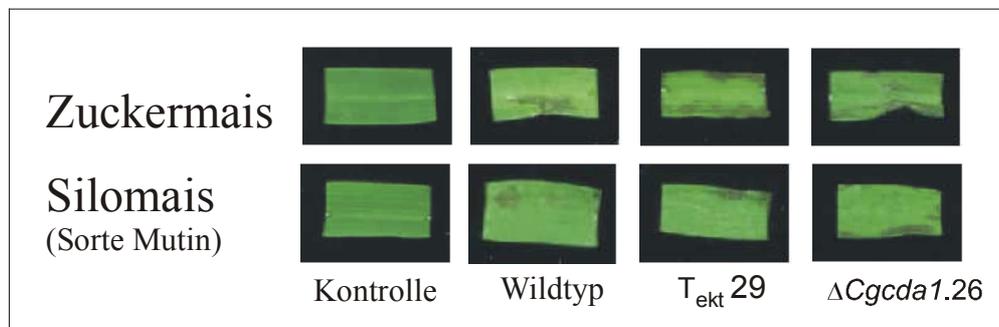


Abb. III.16: Virulenztest mit $\Delta Cgcedal$ -Mutanten auf unterschiedlichen Maiskultivaren.

Ganze Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension der untersuchten Isolate inokuliert. In der oberen Reihe sind infizierte Blattbereiche der Zuckermaispflanzen zusammengestellt, in der unteren Reihe Blätter der Silomais-Sorte Mutin.

Um mögliche Veränderungen des Wirtspflanzenspektrums zu prüfen, wurden Infektionsversuche auf einer kleinen Auswahl anderer Gramineen (Roggen, Triticale, Gerste und Weizen) durchgeführt. Beim Wildtyp und bei allen PilzTransformanten konnte die Differenzierung der Infektionsstrukturen bis zur Appressorienbildung beobachtet werden. Die Penetration und die Differenzierung von Infektionsvesikeln waren nicht nachweisbar. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass andere Sorten dieser Gramineen eine Penetration des Pilzes zulassen.

Ein Nachweis von Chitindeacetylase-Aktivität in Proteinextrakten infizierter Maisblätter mit Substrat-SDS-Gelen gelang aufgrund der dominierenden Aktivität der ebenfalls in diesen Extrakten vorhandenen pflanzlichen Chitinasen nicht.

2.4.3 Induktion antifungaler Proteine

In einem weiteren Versuchsansatz wurde versucht, die Frage zu klären, inwieweit es zu einer Veränderung der Synthese einiger antifungaler Proteine in infizierten Pflanzen kommt.

Chitinfragmente unterschiedlicher Größe wirken in verschiedenen Pflanzen (u.a. Melone, Weizen, Reis) als Elicitoren von Abwehrreaktionen (Barber *et al.*, 1989; Kuchitsu *et al.*, 1993; Roby *et al.*, 1987). Diese Fragmente werden vermutlich durch pflanzliche Chitinasen freigesetzt. Außerdem sind Oligomere dieser Größe auch geeignete Substrate für Chitindeacetylasen (Gao *et al.*, 1995; Kafetzopoulos *et al.*, 1993a; Tsigos *et al.*, 2000; Tsigos *et al.*, 1999). Sollten die Transformanten von *C. graminicola* durch den Verlust der Chitindeacetylase1 nicht mehr oder nur noch beschränkt in der Lage sein, die entstehenden Chitin-Oligomere zu deacetylieren, müßte dieses Defizit in einer gesteigerten Abwehr infizierter Pflanzen zu sehen sein. Dieses könnte sich durch die vermehrte Bildung von Chitinasen bemerkbar machen.

Für den Nachweis pflanzlicher Chitinasen wurde Proteinextrakt aus inokulierten Blättern gewonnen und im Substrat-SDS-Gel untersucht. Bereiche mit Chitinase-Aktivität erscheinen im Glycolchitin-haltigen Substratgel als dunkle Banden. Das erhaltene Muster vorhandener Chitinasen nach Infektion war bei allen verwendeten CgCda1-Transformanten und dem Wildtyp von *C. graminicola* gleich.

2.4.4 Untersuchungen zur Beschaffenheit der pilzlichen Zellwände

Durch extrazelluläre Chitindeacetylase-Aktivität könnten Zellwandmodifikationen während der pilzlichen Infektion erfolgen, die dem Pilz einen entscheidenden Infektionsvorteil bieten. Infektionsversuche mit *CgCda1*-defizienten Mutanten von *C. graminicola* zeigten jedoch, dass der Pilz trotz des Ausschaltens des *CgCda1*-Gens in der Lage war, erfolgreich seine Wirtspflanzen zu infizieren.

Es war deshalb von besonderem Interesse, die Bedeutung dieser Chitindeacetylase auf Zellwandmodifikationen während der Pathogenese zu untersuchen. Untersuchungen mit Hilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie erlaubten zunächst, die Anwesenheit der Kohlenhydrate Chitin und Chitosan in der Zellwand der Infektionsstrukturen beim Wildtyp genauer charakterisieren zu können. Um die Zellwandzusammensetzung von Wildtyp und Transformanten während des Infektionsverlaufes zu verfolgen, wurden fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchung der in vitro-differenzierten Infektionsstrukturen erlaubte dabei, konkrete Aussagen zur Oberflächenmarkierung zu treffen, da nur äußere Zellwandbereiche von der Markierung

erfasst wurden. Innere Zellschichten sind für Antikörper und Lektine nicht zugänglich. Zur spezifischen Markierung von Chitin diente TexasRed[®] – bzw. Gold-konjugiertes WGA (wheat germ agglutinin). Chitosan wurde mit polyklonalen Antikörpern gegen Chitosan und FITC-konjugiertem sekundären Antikörper bzw. sekundärem Gold-markiertem Antikörper nachgewiesen.

Bei den nachfolgenden Betrachtungen sind die Ergebnisse der Immunmarkierung der Infektionsstrukturen der Transformante T_{ekt} 24 (ektopische Integration) nicht mit eingeflossen. Da lediglich bei diesem Isolat eine deutlich andere Zellwandstrukturierung zu beobachten war, werden die Ergebnisse im Anschluss an die allgemeinen Ausführungen in einem getrennten Abschnitt dargestellt.

Untersuchung der Zellwandmodifikationen in vivo

Infizierte Blattbereiche wurden mit einem Skalpell isoliert, anschließend fixiert und mit dem Mikrotom geschnitten. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und mit WGA und anti-Chitosan-Antikörper markiert.

A) Nachweis von Chitin und Chitosan in der Zellwand von Infektionsstrukturen des Wildtyps durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie

Die Ergebnisse der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie erlauben einen genauen Einblick in die spezifische Verteilung von Chitosan bzw. Chitin auf der Oberfläche der Infektionsstrukturen. Es ist eine Chitosan-Markierung der äußeren Bereiche des Appressoriums zu erkennen, welche die extrazelluläre Matrix, die die Appressorien umgibt, darstellt (vgl. Abb. III.17 A.2). Daneben ist die innere Appressorienwand stark mit Chitosan-Gold markiert (vgl. Abb. III.17 D.3). Bei den Infektionsstrukturen, die innerhalb des Blattes differenziert werden, ist erkennbar, dass die äußeren Bereiche der Zellwand von Infektionsvesikel und intrazellulärer Hyphe chitosanhaltig sind.

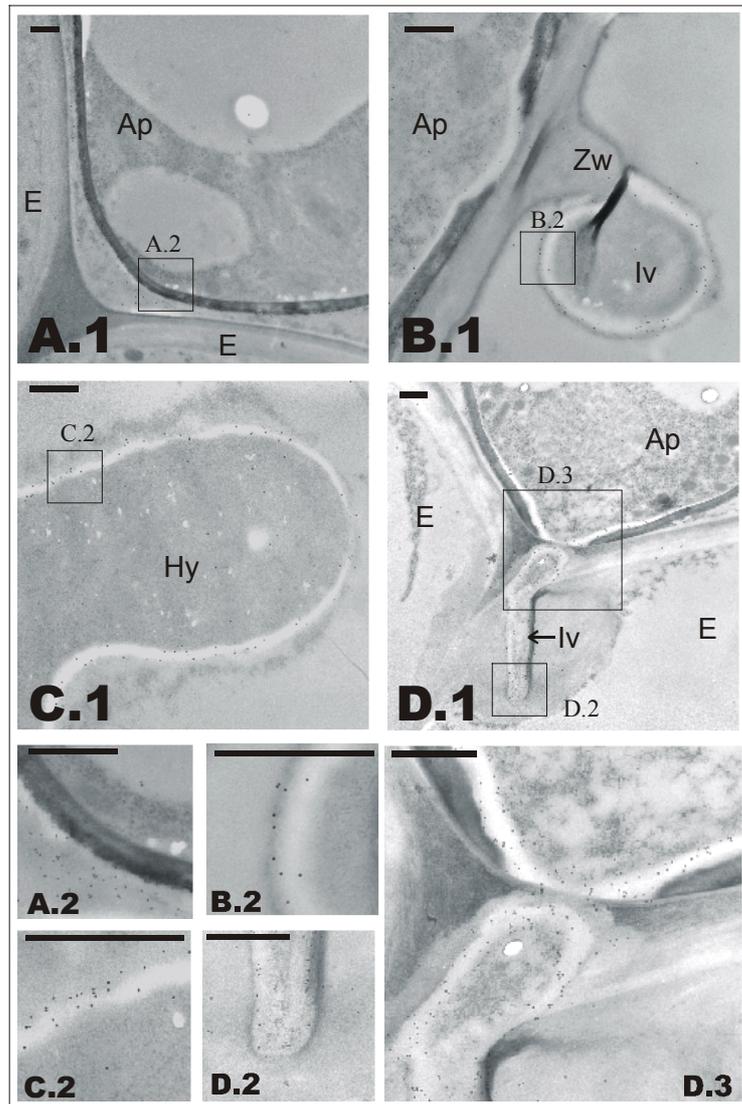


Abb.III.17: Immunmarkierung der *in vivo* –differenzierten Infektionsstrukturen von *C. graminicola* mit Chitosan-Gold.

Alle Abbildungen stammen vom Wildtyp. Ap – Appressorium; Iv – Infektionsvesikel; Hy – primäre Hyphe; E – Epidermiszelle des Maisblattes; Zw – Zellwand des Maisblattes.

A.1 zeigt ein Appressorium auf Epidermiszellen. Der Rahmen symbolisiert den Bereich der Abbildung, der vergrößert dargestellt wurde. Unter B.1 und D.1 sind penetrierende Appressorien mit Infektionsvesikel abgebildet. C.1 zeigt einen Schnitt durch eine Pilzhyphe, die innerhalb des infizierten Blattgewebes wächst.

Der Balken entspricht 1 µm.

Parallel dazu wurde in anderen Präparaten die Verteilung von Chitin mit Gold markiertem WGA untersucht. Chitin konnte ebenfalls in der Zellwand der intrazellulären Hyphen nachgewiesen werden (vgl. Abb.III.18 B.2). Daneben ist eine stärkere Chitinmarkierung für die äußere, melanisierte Appressorienwand zu verzeichnen (vgl. Abb.III.18 C.2). Im

Penetrationskeil, sogenannten *penetration pegs*, konnte Chitin nur für die unmittelbare Apexregion nachgewiesen werden.

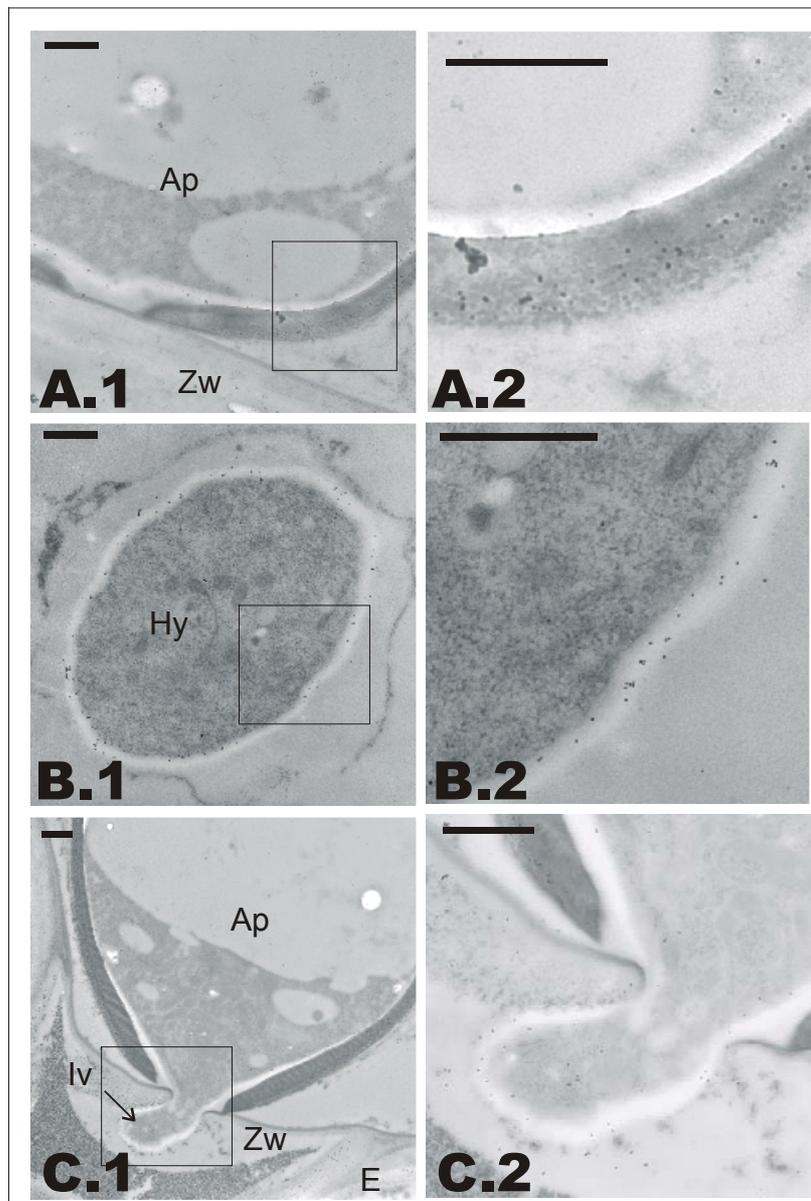


Abb.III.18: Immunmarkierung der *in vivo* -differenzierten Infektionsstrukturen von *C. graminicola* mit Gold-markiertem WGA.

Alle Abbildungen stammen vom Wildtyp. Ap – Appressorium; Hy – intrazelluläre Hyphe; E – Epidermiszelle des Maisblattes; Zw – Zellwand des Maisblattes; Iv - Infektionsvesikel.

A.1 zeigt ein Appressorium, welches gerade beginnt, durch die Epidermiszelle zu penetrieren. Der Rahmen symbolisiert den Bereich der Abbildung, der vergrößert dargestellt wurde. Unter B.1 ist eine intrazelluläre Pilzhyphe abgebildet. C1 zeigt ein penetrierendes Appressorium mit Penetrationskeil.

Der Balken entspricht 1 μ m.

Um einen Vergleich der Markierungsmuster der Zellwand intrazellulärer Hyphen besser zu ermöglichen, sind in Abb. III.19 Bildausschnitte direkt gegenüber gestellt. Chitosan ist vor allem in den äußeren Wandabschnitten der Hyphe zu finden, wohingegen Chitin verstärkt in tieferen Wandschichten markiert wird. Zum besseren Vergleich ist daneben die Markierung von Chitin bei einer vegetativen Hyphe auf der Blattoberfläche dargestellt. Die WGA-Gold-Partikel sind da gleichmäßig über den gesamten Zellwandbereich der Hyphe nachweisbar.

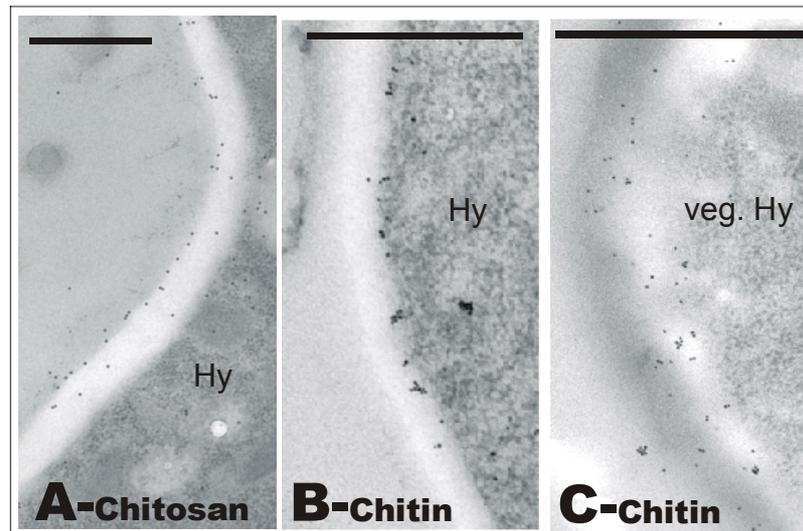


Abb.III.19: Immunmarkierung der *in vivo* –differenzierten Infektionsstrukturen von *C. graminicola* mit Chitosan-Gold und Gold-markiertem WGA.

Die Abbildungen stammen vom Wildtyp. Hy – intrazelluläre Hyphe; veg. Hy – vegetative Hyphe außerhalb des Blattes.

A zeigt eine intrazelluläre Pilzhyphe mit Chitosan-Gold-Markierung, B zeigt eine intrazelluläre Pilzhyphe mit WGA-Gold-Markierung; C zeigt zum Vergleich die WGA-Gold-Markierung der Zellwand einer vegetativen Hyphe außerhalb des Blattes.

Der Balken entspricht 1 μm .

B) Nachweis von Chitin und Chitosan in der Zellwand der Infektionsstrukturen des Wildtyps und der Transformanten durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Infektionsstrukturen der verschiedenen Transformanten und Chitinacetylase1-defizienten Mutanten wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie auf die spezifische Verteilung von Chitin und Chitosan untersucht.

Der Chitosan-Antikörper erkannte deutlich das Infektionsvesikel. Es war ebenfalls eine schwache Markierung der inneren Appressorienwand zu erkennen (vgl. Abb. III.20).

Chitin ist nur schwach auf den intrazellulären Primärhyphen nachweisbar, die Septen der Hyphen treten dagegen deutlich durch ihre kräftige Chitinmarkierung hervor. Das Infektionsvesikel ist ebenfalls deutlich mit WGA markiert. Da die Chitinacetylase ein sekretiertes Protein ist und die modifizierende Wirkung des Enzyms auf die Oberfläche der Hyphen beschränkt bleibt, war dieses Ergebnis bei den *in vivo*-Objekten zu erwarten. Im Querschnitt sind nicht nur die äußeren Chitosan-haltigen Zellwandbereiche, sondern auch tiefer liegende Abschnitte für das Lektin zugänglich.

Überraschend war auch hier, ähnlich wie bei den Untersuchungen *in vitro*, dass neben dem Wildtyp auch die *CgCda1*-defizienten Mutanten und T_{ekt} 29 Chitosan als Zellwandkomponente in den Infektionsstrukturen besitzen (vgl. Abb. III.20).

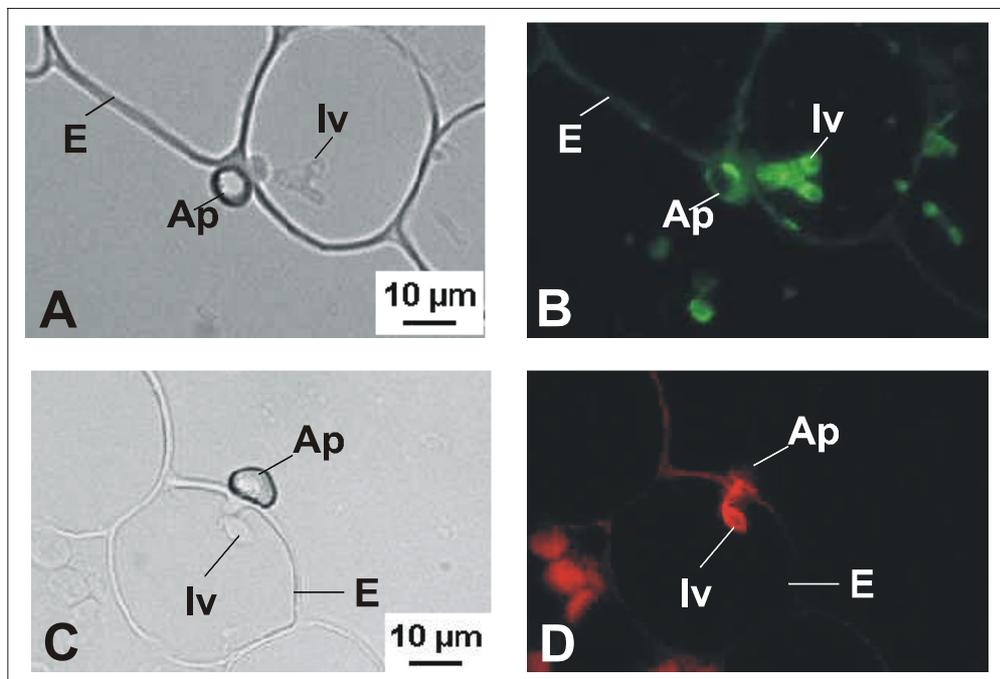


Abb. III.20: Fluoreszenzmarkierung der *in vivo*-differenzierten Infektionsstrukturen von *C. graminicola*.

A und C sind Hellfeldaufnahmen; B und D die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen. III.20.A und B stammen vom Wildtyp, III.20.C und D von Infektionsstrukturen der Mutante $\Delta CgCda1.26$. Ap – Appressorium; Iv – Infektionsvesikel; E – Epidermiszelle des Maisblattes.

Im ersten Bildpaar ist die Markierung des Infektionsvesikels mit dem Chitosan-Antikörper zu sehen, das Appressorium ist schwächer markiert. Ein entsprechende Markierung zeigten die Infektionsstrukturen der Mutante $\Delta CgCda1.26$.

Das zweite Bildpaar zeigt die Chitinmarkierung mit Texas Red-gekoppeltem WGA. Das Lektin bindet spezifisch an das Infektionsvesikel.

Untersuchung der Zellwandmodifikationen in vitro

Von den Ergebnissen der Immunmarkierung der *in vivo* gebildeten Infektionsstrukturen kann nicht automatisch auf das Kohlenhydratmuster der *in vitro* differenzierten Infektionsstrukturen geschlossen werden. Strukturelle Unterschiede der Infektionsvesikel *in vivo* und *in vitro* sind u. a. bei dem nahe verwandten Pilz *C. lindemuthianum* beschrieben (Mendgen & Deising, 1993; O'Connell & Bailey, 1991; O'Connell & Ride, 1990).

Zur Untersuchung der spezifischen Markierung der Infektionsstrukturen *in vitro* wurden Tropfen einer Sporensuspension auf Glas-Objektträger gebracht. Die Differenzierung von Infektionsvesikeln und primären Hyphen, also von Strukturen, die zeitlich erst nach dem Appressorium gebildet werden, erwies sich als schwierig. Erst durch 3M Glycerol im Medium war eine Differenzierung dieser Strukturen sicher reproduzierbar. Bei den *in vitro*-differenzierten Objekten wurden durch die Markierung nur äußere Zellwandbereiche erfasst. Innere Zellschichten sind für Antikörper und Lektine nicht zugänglich.

Chitosan ist bei allen untersuchten Proben, d. h. sowohl bei dem Wildtyp als auch bei den *CgCdal*-defizienten Mutanten und der Transformante T_{ekt} 29 mit ektopischer Integration des Vektors, auf der Oberfläche von Keimschläuchen und Infektionsvesikel vorhanden. Konidien wurden nicht markiert (vgl. Abb. III.21).

WGA, das spezifisch an Chitin bindet, markiert lediglich Teilabschnitte der Keimschläuche und einzelne Bereiche der Konidien. Auf der Oberfläche der Infektionsvesikel konnte kein Chitin nachgewiesen werden. Durch die Verwendung melanindefizienter Mutanten von *C. graminicola* konnte gezeigt werden, dass auf der Oberfläche der Appressorien, die unter natürlichen Bedingungen auf der Cuticula der Wirtsblätter gebildet werden, Chitin als Strukturpolymer vorhanden ist (vgl. Abb. III.21). Eine Immunmarkierung der Appressorien der Melanin-defizienten Mutante von *C. graminicola* mit Chitosan-Antikörper wurde *in vitro* nicht durchgeführt.

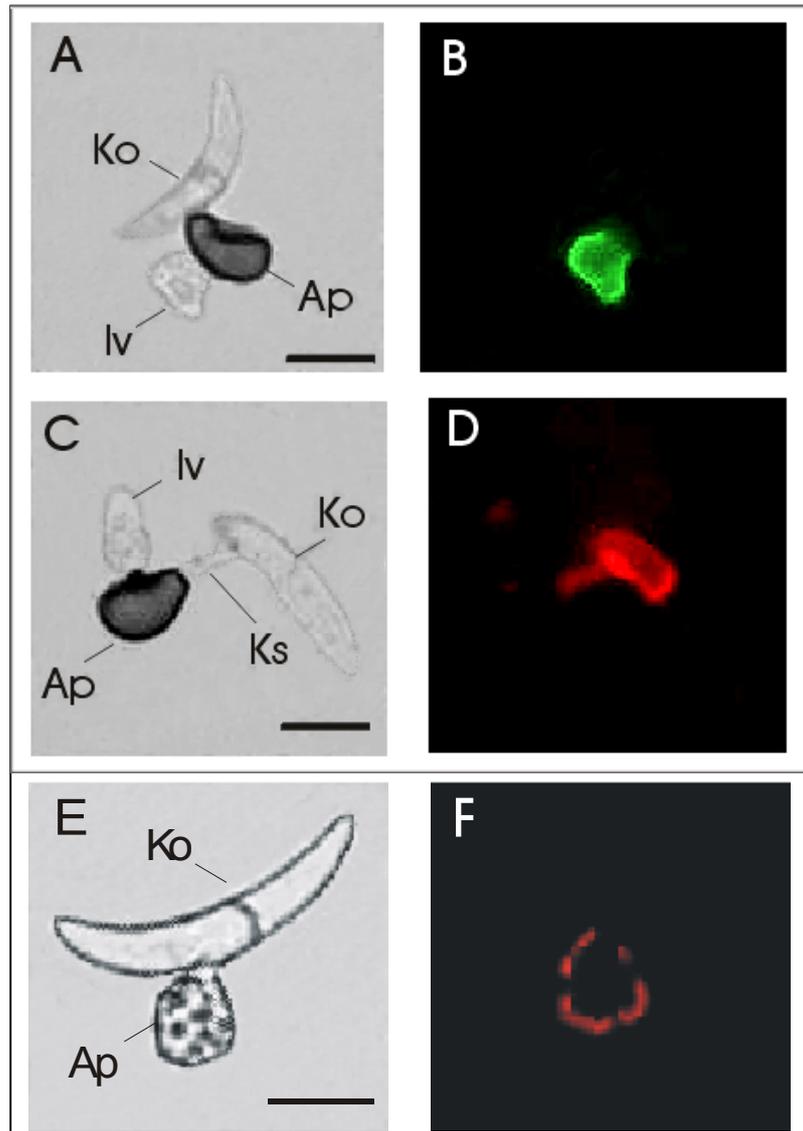


Abb. III.21: Spezifische Fluoreszenzmarkierung der *in vitro* -differenzierten Infektionsstrukturen von *C. graminicola*.

A, C und E sind Hellfeldaufnahmen; B, D und F die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen III.20.A und B stammen vom Wildtyp, III.20.C und D von Infektionsstrukturen der Mutante $\Delta Cg\text{cda}1.26.$, III.20.E und F von der melanindefizienten Mutante CgM1.502; Ap – Appressorium; Iv – Infektionsvesikel; Ko – Konidie; KS - Keimschlauch. Der Balken entspricht 10 μm .

Chitin (rote Fluoreszenz durch Texas-Red-gekoppeltes WGA) ist auf der Oberfläche von Teilabschnitten der Konidie (D), des Keimschlauches (D) und des Appressoriums (F) zu finden. Chitosan (grüne Fluoreszenz durch FITC-gekoppelten sekundären Antikörper) befindet sich auf der Oberfläche von Infektionsvesikel (B) und Keimschlauch (ohne Abbildung).

Beschaffenheit der Zellwand der Transformante T_{ekt} 24 mit ektopisch integriertem Vektor

Während der Charakterisierung des Phänotyps der *CgCda1*-defizienten Mutanten wurde deutlich, dass trotz des Ausschaltens dieses Gens Zellwandmodifikation, das Eindringen ins Wirtsgewebe und die damit verbundene erfolgreiche Besiedlung des Wirtsgewebes unbeeinträchtigt bleiben.

Um so überraschender waren die Ergebnisse der Markierung der Infektionsstrukturen der Transformante T_{ekt} 24. Chitosan war hier auf den Infektionsvesikeln durch Fluoreszenz-Immunmarkierung weder in der Pflanze noch auf artifiziellen Keimunterlagen nachweisbar. Eine Modifikation der Zellwandzusammensetzung im Sinne einer deutlichen Erhöhung des Anteiles von Chitosan als Strukturpolymer konnte in dieser Transformante nicht gezeigt werden. Bei den Keimschläuchen, die sich auf der Blattoberfläche befinden, ist Chitosan ausreichend vorhanden, um einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis durchzuführen. Die Chitinmarkierung mit WGA war mit den Ergebnissen der anderen Isolate und dem Wildtyp identisch.

2.4.5 Analyse der Zusammensetzung der Pilzzellwand

Die Analyse der Zusammensetzung der Pilzzellwand vegetativer Hyphen wurde im Labor von Herrn Prof. Moerschbacher (Institut für Biochemie und Biotechnologie der Pflanzen, Münster) mittels Gaschromatographie durchgeführt.

Die Chitindeacetylase katalysiert mit der Abspaltung von Acetylgruppen die Umwandlung von N-Acetylglucosamin in Glucosamin. Bei den *CgCda1*-defizienten Mutanten könnte dieses gar nicht oder nur vermindert wirken, wodurch ein geringerer Glucosamin-Anteil in der Zellwand im Vergleich zum Wildtyp zu erwarten wäre. Da nicht ausreichend Material von Infektionsstrukturen von *C. graminicola* für eine Analyse zur Verfügung stand, wurde in einem ersten Test die Zusammensetzung der Zellwände vegetativer Hyphen untersucht.

In Tabelle III.2 ist der Gehalt an Zuckermonomeren in den Zellwänden der verschiedenen Transformanten im Vergleich zum Wildtyp dargestellt. Zwischen den analysierten Proben treten nur geringfügige Differenzen auf. Eine deutliche Tendenz bezüglich einer veränderten Zellwandzusammensetzung der Transformanten ist nicht zu erkennen.

Tab. III.2: Gehalt an Zuckermonomeren in den Zellwänden verschiedener *CgCda1*-Transformanten und des Wildtyps.

GlcA – Acetylglucosamin – Chitosan; GlcNAc – N-Acetylglucosamin – Chitin

Isolat	Mannose ($\mu\text{g}/\text{mg}$ TG)	Galactose ($\mu\text{g}/\text{mg}$ TG)	Glucose ($\mu\text{g}/\text{mg}$ TG)	GlcA ($\mu\text{g}/\text{mg}$ TG)	GlcNAc ($\mu\text{g}/\text{mg}$ TG)
Wildtyp	58,8	67,8	598,4	17,7	67,3
$\Delta Cg cda 1.26$	56,8	89,9	546,2	16,8	72,0
$\Delta Cg cda 1.30$	58,6	71,8	557,1	11,9	46,8
$\Delta Cg cda 1.40$	65,0	91,8	586,0	14,0	50,3
Tekt 24	58,7	78,3	517,3	15,5	46,2
Tekt 29	73,4	78,5	663,0	12,5	59,9

Der Chitin-(GlcNAc)-Gehalt beträgt zwischen 6,6 % und 10,1 % der Gesamtmenge an Zuckermonomeren in der Zellwand. Die hier auftretenden geringfügigen Unterschiede werden als individuelle Abweichungen der Transformanten verstanden. Die Chitosan-(GlcA)-Gehalte der Transformanten sind alle niedriger als die des Wildtyps. Jedoch sind auch innerhalb dieser Wertegruppe die Unterschiede so gering, dass man diese nicht auf eine eingeschränkte Wirkung der Chitindeacetylase zurückführen kann.

IV Diskussion

1. *Colletotrichum graminicola* als Modell zur Untersuchung der Zellwandmodifikation bei phytopathogenen Pilzen

Pathogene, die mit komplexen Infektionsstrukturen in ihre Wirtspflanze eindringen, ermöglichen eine detaillierte Analyse der Wechselbeziehungen zwischen Schaderreger und seinem Wirt zu definierten Stadien der Interaktion. Neben phänotypischen Untersuchungen mittels mikroskopischer Techniken, die die vorgefundenen Strukturen beschreiben, dienen molekularbiologische Untersuchungen dazu, die Funktion und die Bedeutung einzelner Gene in diesem komplexen System zu definieren.

Das Phänomen einer sich ändernden Zusammensetzung der Oberflächen von *in vivo* gebildeten Infektionsstrukturen wurde bei unterschiedlichen Wirt-Parasit-Beziehungen nach Lektinmarkierung an verschiedenen Rostpilzen (Chong *et al.*, 1986; Deising *et al.*, 1996; Freytag & Mendgen, 1991a; Freytag & Mendgen, 1991 b; Lasso-Agredo, 1998), *Colletotrichum lindemuthianum* (O'Connell *et al.*, 1992; O'Connell & Ride, 1990) oder *Rigidoporus lignosus* (Nicole & Benhamou, 1991) mit Hilfe mikroskopischer Untersuchungen beschrieben. Oftmals jedoch sind die Pilze, die für diese Betrachtungen herangezogen werden, insbesondere z. B. die Roste, nicht geeignet, um molekulargenetische Untersuchungen vorzunehmen.

Für Untersuchungen zur Bedeutung der Chitinacetylase bei der Infektion an Mais stellt *C. graminicola* ein geeignetes Modell dar. Das Pathogen ist in der Lage, mit Hilfe definierter Infektionsstrukturen (Appressorien) intakte Pflanzenzellen zu penetrieren. Erste Hinweise dafür, dass es dabei zu einer Änderung der Oberflächenstruktur der Infektionsvesikel kommt, wurden von Lasso-Agredo (1998) erbracht. Die im Rahmen der Arbeit von Lasso-Agredo entwickelten polyklonalen Antikörper gegen Chitosan ermöglichen eine spezifische Immunmarkierung von Chitosan in den Pilzzellwänden. Extrazelluläre Chitinacetylasen, die bei einer Modifikation der Zellwand eine Rolle spielen könnten, wurden von Werner (1997) biochemisch charakterisiert.

Der Vorteil gegenüber obligat biotrophen Rostpilzen und gegenüber Basidiomyceten ist v. a. in der guten Handhabung von *C. graminicola* im Labor zu sehen. Als hemibiotrophes Pathogen hat es den Vorteil, modernen gentechnischen Methoden zugänglich zu sein. Die

Tatsache, dass in *C. graminicola* die haploide Kernphase während des Großteils des Lebenszyklus vorliegt, erleichtert die genetische Manipulation. Die Möglichkeit zur effizienten und stabilen Transformation gestattet die Durchführung von knock-out Mutagenesen, um die Funktion einzelner Gene genau definieren zu können. Ein geeignetes Transformationssystem ist in der Arbeitsgruppe etabliert. Umfangreiche Untersuchungen zur Zellwandbiosynthese und der Bedeutung von Chitin-Synthasen bei diesen Prozessen innerhalb der Arbeitsgruppe (Werner, 2001) ermöglichen die Problematik der Zellwandmodifikation auch in einem größeren Rahmen zu beleuchten.

Die erzielten Ergebnisse lassen sich auch auf andere ökonomisch bedeutsame *Colletotrichum*-Arten übertragen, da diese prinzipiell das gleiche Infektionsprinzip anwenden. Darüber hinaus können Aussagen auch auf andere Pathogene übertragen werden, wenn diese wie z. B. *Magnaporthe grisea* über einen ähnlichen Penetrationsmechanismus verfügen.

2 Wirkungsweise und Vorkommen der Chitindeacetylasen

2.1 Wirkprinzip und biochemische Einteilung der Chitindeacetylasen

Die Chitindeacetylase katalysiert die Umwandlung von Chitin durch Deacetylierung der *N*-Acetyl-D-Glucosamin-Reste. Chitin wird hydrolytisch zu Chitosan und Acetat umgewandelt. Dabei lassen sich charakteristische Substratspezifitäten für einzelne Chitindeacetylasen beschreiben, die sich sowohl auf die Größe der Oligoglykoside als auch auf deren Deacetylierungsgrad beziehen. Umfangreiche Untersuchungen dazu wurden für die Chitindeacetylasen von *Mucor rouxii* und *Colletotrichum lindemuthianum* durchgeführt. Die Chitindeacetylase von *M. rouxii* kann Chitin-Oligosaccharide mit einem Polymerisationsgrad (DP) unterhalb 3 nicht mehr effizient deacetylieren. Chitin-Oligosaccharide mit einem DP von 4 und 5 werden vollständig, mit einem DP von 3, 6 und 7 nur unvollständig deacetyliert (Tsigos *et al.*, 1999). Für die Chitindeacetylase von *C. lindemuthianum* konnte eine vollständige Deacetylierung von Chitin-Oligosacchariden mit einem DP von 4, 3 und 2 gezeigt werden (Tokuyasu *et al.*, 1997).

Chitindeacetylasen sind sowohl bei pathogenen als auch bei nichtpathogenen Organismen zu finden. Neben ihrer Rolle bei der Zellwandbiogenese – hauptsächlich bei Pilzen, bei denen das Polysaccharid Chitosan Bestandteil der Zellwand ist (u. a. Kafetzopoulos *et al.*, 1993c)

wird für die Chitinacetylase auch eine Bedeutung bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen diskutiert (Deising & Siegrist, 1995; O'Connell & Ride, 1990; Vander *et al.*, 1998).

2.1.1 Chitinacetylasen mit Bedeutung bei der Zellwandbiogenese

Die ersten Berichte über eine Chitinacetylase betreffen den Zygomyceten *Mucor rouxii* (Araki & Ito, 1975). Da Zygomyceten einen hohen Gehalt an Chitosan in ihren Zellwänden aufweisen und eine hohe Chitinacetylase-Aktivität besitzen, eignen sie sich besonders gut für die Charakterisierung dieses Enzyms. Neben der Chitinacetylase von *Mucor rouxii* (Kafetzopoulos *et al.*, 1993 a) wurde auch die des Zygomyceten *Absidia coerulea* (Gao *et al.*, 1995) gereinigt und charakterisiert. Beide Enzyme sind ca. 75 kDa groß und besitzen bei 50°C ihr Aktivitätsoptimum im sauren Milieu (pH 4,5-5). Durch Acetationen werden sie in ihrer Aktivität gehemmt. Mit Hilfe polyklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, dass beide Chitinacetylasen im periplasmatischen Raum lokalisiert sind (Bartinicki-Garcia, 1989; Gao *et al.*, 1995).

Durch Sequenzvergleiche des Hefegenoms mit den aus Zygomyceten isolierten Genen konnten zwei Chitinacetylasen (Cda1p und Cda2p) der Hefe *S. cerevisiae* isoliert werden (Christodoulidou *et al.*, 1996), die bei der Bildung der Ascosporenwände von Bedeutung sind. Sie sind jedoch biochemisch nicht genauer untersucht.

Alfonso (1995) beschreibt eine Chitinacetylase aus *Aspergillus nidulans*, die mit 27 kDa deutlich kleiner als die der Zygomyceten ist. Sie liegt im wesentlichen extrazellulär vor, besitzt eine hohe Temperaturstabilität und wird in ihrer Aktivität durch Acetat nicht gehemmt.

2.1.2 Chitinacetylasen mit Bedeutung in Wirt-Parasit-Interaktionen

Die beschriebenen Chitinacetylasen der pflanzenpathogenen Pilze liegen zu einem großen Anteil oder vollständig sekretiert vor. Sie sind hauptsächlich in frühen Stadien nach der Chitin-Strang-Synthese aktiv, also deutlich bevor die Polymere die rigidifizierten Zellwandabschnitte erreicht haben. Diese Aussage wird durch Arbeiten aus der Gruppe von Prof. Moerschbacher unterstützt (El Gueddari *et al.*, 2002, in Vorbereitung), die zeigen, dass lediglich der Apex interzellulär wachsender Infektionshyphen des Weizenschwarzrostes Chitin auf der Oberfläche aufweisen und die daran anschließenden Bereiche Chitosan auf ihrer Oberfläche besitzen. Daneben konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie gezeigt werden, dass Chitin lediglich im Apexbereich junger Infektionsvesikel nachweisbar ist, wohingegen eine Chitosanmarkierung auf der

gesamten Oberfläche der Infektionsvesikel feststellbar war. Die Arbeiten zu Chitindeacetylasen aus pflanzenpathogenen Pilzen konzentrieren sich in der Literatur auf Rostpilze und *Colletotrichum*-Species.

Deising & Siegrist (Deising & Siegrist, 1995) konnten in *Uromyces fabae*, dem Ackerbohnenrost, 5 streng morphogenetisch regulierte Isoformen mit Molekulargewichten von 12,7; 15,2; 25,2; 30,7 und 48,1 kDa charakterisieren, die teilweise sekretiert vorlagen. Ähnlich den Chitindeacetylasen der Zygomyceten besitzen sie ihr Aktivitätsoptimum im sauren Milieu bei pH-Werten von 5,5-6.

Bei *C. lagenarium* – einem Gurkenpathogen – fanden Siegrist & Kaus (1990) eine 31 kDa große Chitindeacetylase, die sekretiert vorlag und durch ihre hohe Hitzestabilität auffiel. Ihr Aktivitätsoptimum erreichte sie bei pH 8,5. Bei *C. lindemuthianum* – einem Bohnenpathogen – wurde zuerst von Tsigos *et al.* (1995) eine mit 150 kDa Molekulargewicht auffällig große Chitindeacetylase biochemisch charakterisiert. Kurze Zeit später konnte eine weitere, wesentlich kleinere Chitindeacetylase (24 kDa) von Tokuyasu *et al.* (1996) aus *C. lindemuthianum* isoliert werden. Beide Enzyme liegen vollständig extrazellulär vor, haben ihr Aktivitätsoptimum bei 50°C im alkalischen Milieu (pH 8,5 (150 kDa-Isoform) und 11,5 (24 kDa-Isoform)) und werden nicht durch Acetat inhibiert.

Chitindeacetylasen von *C. graminicola* wurden von Werner (1997) biochemisch untersucht. Im Gegensatz zu *C. lindemuthianum*, bei dem zwei unterschiedliche Chitindeacetylasen nachgewiesen wurden (Tokuyasu *et al.*, 1996; Tsigos & Bouriotis, 1995), konnte Werner drei aktive Isoformen des Enzyms beschreiben. Da die extrazellulären Chitindeacetylasen als Gesamtextrakt untersucht wurden, konnte er spezifische Aussagen zu einzelnen Isoformen nicht treffen. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Klonierung und anschließende knock-out Mutagenese von *CgCda1* erlaubt, einzelne Aussagen zu spezifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass *CgCda1* nur die beiden kleineren Isoformen von 25 und 41 kDa Größe kodiert.

Für *C. graminicola* lässt sich zusammenfassen, dass die Chitindeacetylaseisoformen mit 25,1 und 41 kDa Molekulargewicht von einem Gen kodiert werden (*CgCda1*) und der Pilz noch ein weiteres Gen für eine Chitindeacetylase besitzt, die im Proteingel eine Größe größer/gleich 200 kDa zeigt. Beide Enzyme liegen vollständig sekretiert vor und besitzen ihr Aktivitätsoptimum bei 60°C im basischen Milieu (pH 8,5). Sie sind über 3 Stunden bei 30°C ohne Aktivitätsverlust aktiv und erst bei 80°C sind höhere Aktivitätsverluste messbar. Die Chitindeacetylasen von *C. graminicola* sind unempfindlich gegenüber Acetat (Werner, 1997).

Tabelle IV.I fasst die Charakteristika verschiedener Chitinacetylrasen zusammen.

Tab. VI.1: Biochemische Charakteristik der Chitinacetylrasen verschiedener Pilze nach (Tsigos *et al.*, 2000), verändert und ergänzt.
n.v. = nicht verfügbar

	<i>Mucor rouxii</i>	<i>Absidia coerulea</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	<i>Uromyces fabae</i>	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>		<i>Colletotrichum graminicola</i>	
Mw kDa	75	75	27	12,7/15,2/25,2 30,7/48,1	24	150	25,1 / 41	>200
sekretiert	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	ja
pH-Optimum	4,5	5,0	7,0	5,5-6,0	11,5	8,5	8,5	
Temperatur- optimum °C	50	50	50	n. v.	50	50	60	
Inhibierung durch Acetat	ja	ja	nein	n. v.	nein	nein	nein	

2.2 Chitinacetylrasengene verschiedener Mikroorganismen

Von den zur Zeit bekannten Chitinacetylrasen sind bisher nur wenige Gene kloniert und sequenziert. Dazu zählen neben der Chitinacetylrase des Zygomyceten *Mucor rouxii* die beiden Chitinacetylrasen Cda1p und Cda2p der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. 1999 gelang es Tokuyasu und Mitarbeitern, das Gen für die 24 kDa große Chitinacetylrase aus *C. lindemuthianum* zu klonieren und zu sequenzieren (Tokuyasu *et al.*, 1999b). Von der Arbeitsgruppe um S. J. Gurr ist eine weitere Chitinacetylrase-Gensequenz eines phytopathogenen Pilzes (*Blumeria graminis*) in der Genbank veröffentlicht (Zugangsnummer: AAK84438). Nähere Informationen zu dieser Chitinacetylrase sind noch nicht zugänglich.

Innerhalb der Gruppe der Chitinacetylrasen bestehen mit 69 % Identität auf Aminosäureebene erwartungsgemäß die größten Übereinstimmungen von CgCda1 zur Chitinacetylrase von *C. lindemuthianum*. Im großen Abstand folgen die Chitinacetylrasen der anderen Pilze: Chitinacetylrase von *Blumeria graminis* mit 38 % Identität auf Aminosäureebene, Cda2p von *S. cerevisiae* mit 32 %, Cda1p von *S. cerevisiae* mit 30 % und Chitinacetylrase von *Mucor rouxii* mit 26 %. Auffällig war, dass die vorhandenen Sequenzhomologien, mit Ausnahme eines einzelnen kurzen Sequenzabschnittes über 7 Aminosäuren (as 48 bis as 54 von *C. graminicola*: LTFDDGP), stets nur über wenige und meist nicht benachbarte Aminosäuren ausgeprägt sind. Längere zusammenhängende

homologe Sequenzbereiche, beispielsweise über 10 bis 15 Aminosäuren, wie sie u. a. bei den Chitinsynthasen durchaus zu finden sind, treten bei den Chitindeacetylasen nicht auf.

Bei den Sequenzanalysen bestätigte sich die von Tsigos *et al.* beschriebene (John *et al.*, 1993; Kafetzopoulos *et al.*, 1993d) strukturelle Ähnlichkeit der Chitindeacetylasen mit den NodB Proteinen verschiedener *Rhizobien*. Vergleicht man die Aminosäure-Ähnlichkeiten zwischen CgCda1 und den NodB-Proteinen einzelner *Rhizobien* (z.B. NodB von *R. galegae* mit 32 % Identität auf Aminosäureebene, NodB von *R. leguminosarum* mit 27 %) fällt auf, dass diese vergleichbar sind mit denen zwischen CgCda1 und Chitindeacetylasen der Zygomyceten.

Ebenfalls zu beobachten war, dass sich die Bereiche der Gene, in denen durch Sequenzvergleiche Ähnlichkeiten festgestellt werden konnten, meist über 150 und 200 Aminosäuren ausdehnen, in denen nur einzelne Aminosäuren mit größeren Abständen untereinander konserviert sind. Tsigos *et al.* (2000) definieren diesen in seiner Gesamtheit konservierten Bereich als „NodB-homology domain“ (vgl. Abb. IV.2). Er ist vergleichbar mit der durch den Service der NCBI (Altschul *et al.*, 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) ermittelten Polysaccharid Deacetylase Domäne, der bei *C. graminicola* den Bereich der Aminosäuren 44 bis 183 von CgCda1 mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ($1-1e^{-24}$) einnimmt.

Die signifikanten Übereinstimmungen auf der Aminosäureebene zu den NodB Proteinen der *Rhizobien* finden sich auch funktionell wieder. Die NodB Proteine sind Chitooligosaccharid-Deacetylasen, die essentiell für die Biosynthese von bakteriellen Nod-Faktoren sind (Denarie *et al.*, 1996). Diese Nod-Faktoren besitzen die einheitliche Grundstruktur eines N-Acetyl-Glucosamin-Oligomers mit einer für ihre biologische Aktivität erforderlichen N-Acetyl-Substituierung am nichtreduzierenden Molekülende. Die NodB Proteine entfernen diese N-Acetylgruppe des Oligomers, wodurch die benötigte freie Aminogruppe für eine nachfolgende N-Acylierung entsteht (John *et al.*, 1993).

Ebenfalls größere Ähnlichkeiten der „NodB-homology domain“ auf struktureller und funktioneller Ebene bestehen zu bestimmten Regionen in mikrobiellen Acetyl-Esterasen und Xylanasen (XylD von *Cellulomonas fimi* mit 30 % Identität auf Aminosäureebene) (Clarke *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1999). Für diese wurde eine Deacetylaseaktivität ausschließlich gegenüber acetyliertem Xylan gezeigt (Millward-Sadler *et al.*, 1994), wodurch eine anschließende effiziente Hydrolyse dieses Substrates durch Xylanasen möglich wird.

Außerdem zeigen sich Ähnlichkeiten in der Sequenz zu verschiedenen, zum Teil noch uncharakterisierten Genbereichen in extremophilen *Bacillus spec.* (NodB-like protein von *B. stearothermophilus* mit 31 % Identität auf Aminosäureebene, Chitindeacetylase-like protein von *B. halodurans* mit 32 %).

In Abb. IV.1 sind die Bereiche mit Sequenzhomologie graphisch zusammengefasst.

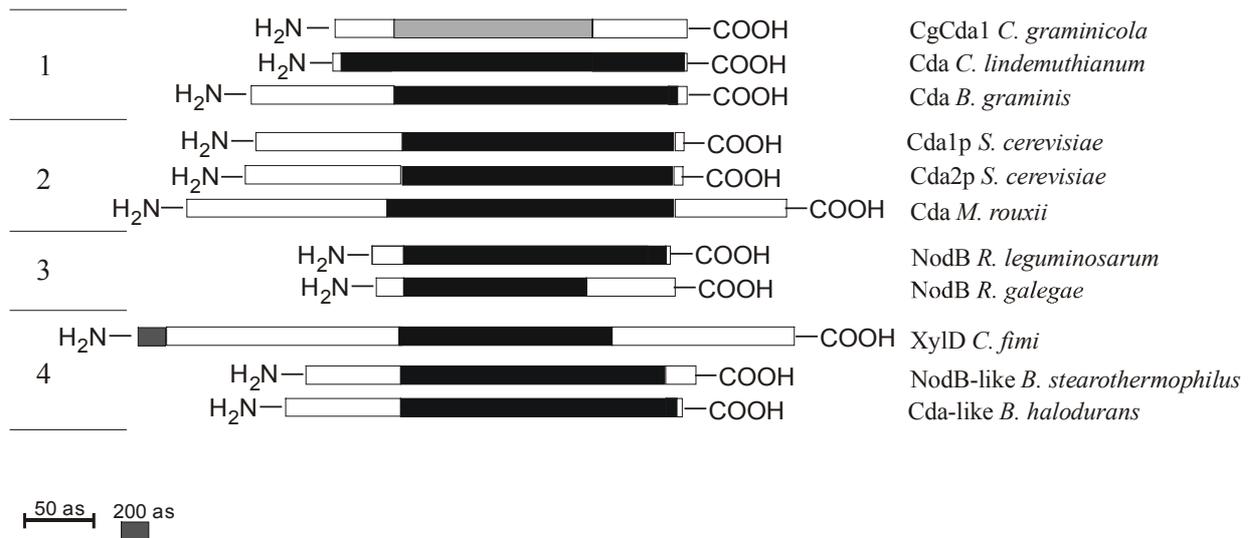


Abb. IV.1: Sequenzhomologien auf Aminosäureebene verschiedener Organismen; nach Tsigos (2000) verändert.

Die schwarz gekennzeichneten Bereiche charakterisieren die Abschnitte der Proteine, in denen Sequenzhomologien vorhanden sind. Sie umfassen den von Tsigos (2000) nicht spezifisch abgegrenzten Bereich der „NodB-homology domain“. In Gruppe 1 werden die Chitindeacetylasen phytopathogener Pilze zusammengestellt, in Gruppe 2 die der nichtpathogenen Pilze, in Gruppe 3 die NodB Proteine der *Rhizobien* und in Gruppe 4 die strukturverwandten Gene bakterieller Organismen.

Die Zugangsnummern der Gene für die Genbank (siehe auch Abb. III.4) sind: Cda-like protein *Cellulomonas fimi*: P54865, NodB-like protein *Bacillus halodurans*: NP_242783.

Der einzige Bereich hoher Homologie über einen zusammenhängenden Sequenzabschnitt von 7 Aminosäuren (Aminosäure 48 bis Aminosäure 54 von *C. graminicola*: LTFDDGP) konnte auch für die NodB- und die bakteriellen CDA-ähnlichen Proteine bestätigt werden. Dieser Bereich ist offensichtlich trotz der geringen Sequenzähnlichkeit der Chitooligosacchariddeacetylasen (die Identität auf Aminosäureebene zur Chitindeacetylase von *C. graminicola* geht mit nur einer Ausnahme (*C. lindemuthianum*) nie über 38 %) gut konserviert. Das lässt vermuten, dass dieser Genbereich eine besondere funktionelle Struktur,

eventuell Bestandteile der katalytischen Domäne, der Chitooligosacchariddeacetylasen kodieren könnte.

3. Regulation der Chitindeacetylase1 von *C. graminicola*

3.1 Aktivitätsuntersuchungen

Prinzipiell erfolgt die Regulation eines Gens entsprechend seiner Funktion. Chitindeacetylasen mit Bedeutung für allgemeine Prozesse der Zellwandbiogenese, eines Vorgangs also, der während der gesamten pilzlichen Entwicklung benötigt wird, sind durch die konstitutive Expression des Gens jederzeit verfügbar. Beispiel hierfür ist die Chitindeacetylase des Zygomyceten *Mucor rouxii*. Kommen den Chitindeacetylasen aber nur innerhalb einzelner Entwicklungsphasen des Pilzes Funktionen zu, wie möglicherweise bei der Penetration des Wirtsgewebes, liegt häufig eine stadienspezifische Regulation des Gens vor.

Da bei vielen Chitindeacetylasen Sequenzinformationen nicht vorliegen, wurde durch Aktivitätsuntersuchungen analysiert, bei welchen Entwicklungsstadien dieses Protein benötigt wird.

Die Chitindeacetylase-Aktivität während der Morphogenese wurde bei unterschiedlichen Pilzen untersucht.

Für nichtpathogene Pilze mit stadienspezifisch regulierter Chitindeacetylase liegen Untersuchungen zu *Saccharomyces cerevisiae* (Christodoulidou *et al.*, 1996) vor. Hier wurde Chitindeacetylaseaktivität nur zu bestimmten Zeiten während der Sporulation beobachtet. Sie ist hier in die Bildung der Ascosporenwand involviert (Christodoulidou *et al.*, 1996; Christodoulidou *et al.*, 1999).

Umfangreichere Untersuchungen liegen zur Aktivität von Chitindeacetylasen bei phytopathogenen Pilzen vor. An *Uromyces fabae* konnte bei *in vitro*-Untersuchungen auf künstlichen Unterlagen ein starker Anstieg der Chitindeacetylase-Aktivität während der Bildung von Strukturen beobachtet werden, die *in vivo* nach der Penetration der Spaltöffnungen gebildet wurden (Deising & Siegrist, 1995). Siegrist & Kauss (1990) konnten mit Hilfe von radioaktiv markiertem Substrat die Chitindeacetylase-Aktivität von *C. lagenarium* während der Infektion messen. Sie stellten ebenfalls fest, dass die Aktivität der Chitindeacetylase nach der Entwicklung von Appressorien ansteigt. In den darauf folgenden zwei Tagen war ein leichter Abfall der Aktivität zu beobachten. Ab dem vierten Tag stieg

gleichzeitig mit dem massiven Auftreten makroskopisch sichtbarer Krankheitssymptome die Chitinacetylase-Aktivität bis zum 6. Tag nach der Inokulation an.

Einen ähnlichen Aktivitätsverlauf stellte Werner (1997) bei seinen Untersuchungen mit Hilfe eines enzymatischen Assays für die Chitinacetylase-Aktivität bei *C. graminicola* fest. Er verweist auch gleichzeitig auf die nur beschränkte Aussagekraft eines Aktivitätsassays, da dieser sehr stark mit der pilzlichen Biomasseentwicklung korreliert. Rückschlüsse über eine stadienspezifische Regulation lassen sich kaum ableiten. Ein weiterer wesentlicher Nachteil ist dann gegeben, wenn mehrere Chitinacetylase-Gene exprimiert werden. Diese können ohne gentechnische Manipulation, wie z. B. knock-out Mutagenese, oder säulenchromatographischer Trennung mit FPLC häufig nicht getrennt erfasst werden.

3.2 Regulation der Genexpression von CgCda1

3.2.1. Regulatorische Promotorelemente

Die Analyse der Sequenz 5' der Gensequenz von *CgCda1* zeigte mehrere mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Um eine Wertung der Ergebnisse dieser Analyse vornehmen zu können, ist es sinnvoll, Promotorbereiche vergleichbarer Gene ebenfalls zu untersuchen. Da schon die Angaben zur kodierenden Sequenz anderer Chitinacetylase nur an wenigen Beispielen in der Literatur bzw. in der Genbank verfügbar sind, wunderte es nicht, dass Informationen zum *upstream*-Bereich noch seltener zu finden waren.

Bei den Chitinacetylase aus *C. lindemuthianum* und *Mucor rouxii* lagen jeweils nur Sequenzen über Bereiche von 78 pb bzw. 88 bp vor, für die bei der Analyse keine Bindestellen für Transkriptionsfaktoren gefunden wurden.

Das Hefegenom ist komplett sequenziert und die Sequenzen sind frei zugänglich. Bereiche von 1250bp *upstream* der kodierenden Sequenz von *Cda1p* und *Cda2p* der Hefe *S. cerevisiae* konnten zum Vergleich herangezogen werden. Bei phytopathogenen Pilzen waren ausreichende Sequenzinformationen nur für die Chitinacetylase von *Blumeria graminis* verfügbar. Hier sind neben der Sequenz keine Informationen wie Regulation, Aktivität oder biochemische Charakterisierung vorhanden.

Trotz dieser unbefriedigenden Datenlage fällt auf, dass in den analysierten Promotorbereichen ähnliche Elementemuster zu finden sind, wobei einige Gemeinsamkeiten innerhalb der *upstream*-Genbereiche der phytopathogenen Pilze auftreten (vgl. Tab. IV.2).

Tab. IV.2: Vergleich der Anzahl möglicher Bindestellen für regulatorische Promotorelemente verschiedener Chitindeacetylasen.

n.v. = nicht vorhanden

		Colletotrichum graminicola	Blumeria graminis	S. cerevisiae Cda1p	S. cerevisiae Cda2p
GCR1	Glykolyse	12	3	3	n.v.
Nit2	N ₂ -Metabolismus	7	20	16	10
MatA1	sex. Differenzierung	5	6	2	5
Stre	Streßresponse	4	3	1	n.v.
PACC	pH-response	4	1	n.v.	2
StuA	Hyphendifferenzierung	3	2	n.v.	n.v.
MIG1	Glukosereprimierung	3	1	n.v.	n.v.

Das Vorkommen spezifischer Transkriptionsfaktoren ist bisher nicht genauer untersucht worden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass homologe Proteine auch in *C. graminicola* vorhanden sind.

Mit 12 Bindestellen ist der putative Transkriptionsfaktor GCR1 bei *C. graminicola* auffällig häufig zu finden. GCR1, der zuerst in *S. cerevisiae* beschrieben wurde, vermittelt die Expression von Genen der Glykolyse, welche normalerweise als konstitutiver Stoffwechselweg betrachtet wird (Huie *et al.*, 1992). Er könnte als Hinweis auf eine sehr schwache, jedoch in vielen Entwicklungsstadien stattfindende Expression von *CgCda1* betrachtet werden. Die Regulation der Enzymaktivität könnte neben der Stärke der Expression, welche sich z. B. in der Transkriptmenge widerspiegelt, auch maßgeblich posttranskriptionell über Modifizierung der Translation erfolgen. Eine konstitutive Expression spricht jedoch meist dafür, dass es sich um ein essentielles Gen für den Organismus handelt. Dies steht scheinbar im Widerspruch zu der Tatsache, dass bei den *CgCda1*-defizienten Mutanten kein Phänotyp beobachtet werden konnte.

Nit2 verfügt im *CgCda1*-Promotorbereich über 7 potentielle Bindestellen und ist damit deutlich weniger vertreten als bei den Vergleichssequenzen. Er ist ein wesentlicher Faktor für die positive Regulierung von Genen des Stickstoffmetabolismus (Fu & Marzluf, 1990). Er reguliert die Expression von Genen, deren Proteine in der Lage sind, Stickstoff

unterschiedlicher Quellen zu verwerten, wenn die primären Stickstoffquellen nicht verfügbar sind oder Stickstoff-Mangelbedingungen vorliegen (Marzluf, 1997). Stickstoff-Mangelbedingungen könnten zum einen während des Wachstums des Pilzes auf der Blattcuticula vorliegen. Zum anderen schlussfolgern Talbot *et al.* (1997) aus ihren Beobachtungen, dass besonders während der Pathogenese für den in Reisblättern wachsenden Pilz *Magnaporthe grisea* Stickstoff-Mangelbedingungen vorliegen. Eine stickstoffabhängige Regulation von Genen mit Bedeutung für die Pathogenität des Organismus ist mehrfach beschrieben. Bei *Magnaporthe grisea* konnte für das MPG1-Gen, das nur während der Appressoriendifferenzierung und der Ausprägung von Krankheitssymptomen im Reisblatt hoch exprimiert wird, ebenfalls eine Abhängigkeit der Expression von Nährstoff-Mangelbedingungen gezeigt werden (Talbot *et al.*, 1997). Die Autoren präsentieren Hinweise, dass das Wachstum des Pilzes in der Pflanze durch Stickstoff-Limitierung charakterisiert ist. Diese Bedingungen führen auch *in vitro* zu einer gesteigerten Expression von MPG1. Für *Cladosporium fulvum* konnte eine gesteigerte Expression des *Avr9*-Genes während des Wachstums des Pilzes in der Wirtspflanze gezeigt werden (Van den Ackerveken *et al.*, 1994). Stickstoff-Mangelbedingungen führten auch hier *in vitro* zu einer drastischen Erhöhung der *Avr9*-Expression. Für den Promotor von *Avr9* wurden 12 potentielle Nit2-Bindestellen beschrieben. Mit der Klonierung des *Nrf1*-Gens von *Cladosporium fulvum* (*nitrogen response factor*), das auf Aminosäureebene 98% Identität zu Nit2 besitzt, konnte eine stickstoffabhängige Regulation von *Avr9* genauer charakterisiert werden (Pérez-García *et al.*, 2001).

Für den Transkriptionsfaktor MatA1, der an der sexuellen Differenzierung in *S. cerevisiae* beteiligt ist (Goutte & Johnson, 1994), liegen, vergleichbar mit der Chitindeacetylase von *B. graminis* und Cda2p der Hefe, 5 bzw. 6 Bindestellen vor. Bei der Hefe konnte gezeigt werden, dass Cda2p-defiziente Transformanten über eine stark geschädigte Ascosporenbildung verfügten (Christodoulidou *et al.*, 1999). Ein Zusammenhang zwischen *CgCda1* und der sexuellen Differenzierung wurde bei *C. graminicola* nicht untersucht.

Als deutliche Unterscheidung zu den Hefegenen finden sich bei beiden Chitindeacetylasen der phytopathogenen Pilze eine hohe Anzahl von Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die eine Reaktion auf äußere Umwelteinflüsse ermöglichen. So haben Stre-Faktoren eine große Bedeutung bei der Aktivierung von Genen unter Stress (Schuller *et al.*, 1994), wohingegen PACC einen pH-responsiven Regulator darstellt (Tilburn *et al.*, 1995). Eine Reaktion der Chitindeacetylase auf sich ändernde Umgebungsbedingungen erscheint durchaus plausibel. Bereits im Inneren des Appressoriums ist ein enormer hydrostatischer Druck zu finden. In

Magnaporthe grisea konnte gezeigt werden, dass Melanin die Porengröße der Appressorienwand auf weniger als 1 nm verringert (Howard *et al.*, 1991b). Die Anreicherung osmotisch aktiver Substanzen im Inneren der Appressorien führt dazu, dass ein hohes osmotisches Potential aufgebaut wird, so dass Wassermoleküle in das Appressorium aufgenommen werden (Howard *et al.*, 1991a). Talbot und Mitarbeiter konnten eine Glycerolkonzentration von mehr als 3 molar in den Appressorien von *M. grisea* zeigen (de Jong *et al.*, 1997). Der grundsätzliche Mechanismus scheint in *C. graminicola* der ähnliche zu sein. Auch hier scheint Glycerol die osmotische Substanz zu sein (Sugui, J. und Deising, H. B., persönliche Mitteilung).

StuA-Bindestellen sind nur bei den Chitindeacetylasen von *C. graminicola* und *B. graminis* vorhanden. Sie spielen eine Rolle bei der Differenzierung von Hyphen zu sexuellen und asexuellen Fortpflanzungsorganen. Dieser Prozess wurde innerhalb dieser Arbeit bei *C. graminicola* nicht untersucht. MIG1, der in der Hefe die Glycose-Reprimierung vermittelt (Lundin *et al.*, 1994), ist ebenfalls nur in den untersuchten Promotorelementen der pathogenen Pilze zu finden. Bei Untersuchungen in *Candida albicans* wurde ein Einfluss des Transkriptionsfaktors auf Filamentbildung und Pathogenität jedoch ausgeschlossen (Zaragoza *et al.*, 2000).

3.2.2 Regulation auf Transkript- und Proteinebene

Bei *S. cerevisiae* schlussfolgern Christodoulidou und Mitarbeiter (1996) aus der um zwei Stunden verzögert auftretenden Aktivität im Vergleich zum Auftreten von Transkripten der Chitindeacetylase, dass diese erst als Zymogen vorliegt, und dass eine Umwandlung zum aktiven Enzym erst nach dem Transport durch Abspaltung der Signalpeptides im periplasmatischen Raum erfolgt.

Bei *C. graminicola* konnte die Regulation von CgCda1 auf unterschiedlichen Ebenen untersucht werden. Im Unterschied zu den Chitindeacetylasen der Hefe, deren Gene nur zu bestimmten Zeiten während der Sporulation exprimiert wurden, können Transkripte von CgCda1 über einen relativ weiten Zeitraum der pilzlichen Entwicklung in jungen und reifen Appressorien und in vegetativen Hyphen nachgewiesen werden. Lediglich in ruhenden Konidien wurden keine Transkripte gefunden. Innerhalb des Infektionsverlaufs waren CgCda1-Transkripte nur in den frühen Stadien der Infektion nachweisbar (nach 1 und 3 Tagen). Zu einem späteren Zeitpunkt, als makroskopisch sichtbare Symptome auftraten, war ein Nachweis von CgCda1-Transkripten nicht möglich. Jedoch könnte der in der Literatur

beschriebene erneute Anstieg der Chitindeacetylase-Aktivität (ca. 6 Tage nach Inokulation) (Werner, 1997) auch durch Transkripte der zweiten, noch nicht charakterisierten Chitindeacetylase in *C. graminicola* hervorgerufen werden. Einen ähnlichen Verlauf der Chitindeacetylase-Aktivität beschreiben auch Siegrist & Kauss (1990) bei *C. lindemuthianum*. Einen Tag nach Inokulation der Pflanzen mit Sporen von *C. lindemuthianum*, nachdem ein erster Anstieg der Chitindeacetylase-Aktivität zu verzeichnen war, blieb diese für die folgenden zwei Tage konstant oder sank sogar leicht ab. Erst am vierten Tag, parallel zur Bildung sichtbarer Läsionen auf den Blättern, wurde erneut ein starker Anstieg der Chitindeacetylase-Aktivität beobachtet. Zu dieser Zeit wird von den Autoren die Ausbreitung der Sekundärhyphen durch das Wirtspflanzengewebe vermutet. Bei *C. graminicola* erfolgt die Ausbildung von Sekundärhyphen und damit der Wechsel von der biotrophen in die nekrotrophe Lebensform bei Raumtemperatur nach ca. 72 Stunden (Sugui, J. und Deising, H.B., persönliche Mitteilung).

Um die Expression von *CgCda1* während des Infektionsvorgangs *in vivo* besser verfolgen zu können, wurden Promotor-GFP-Konstrukte dieses Gens hergestellt und in *C. graminicola* transformiert. In begleitenden Untersuchungen zeigte sich, dass nur dann Fluoreszenz zu beobachten war, wenn das GFP-Gen unter Kontrolle des GAPDH-Promotors stand.

Pilzpromotoren besitzen in der Regel eine Größe von weniger als 1 kb. Die Strukturanalysen (vgl. Gldpkt. II.3.6) ermittelten bei *CgCda1* den Bereich von 248 bis 199pb *upstream* des Startkodon als mögliche Promotorregion. Weitere Kontrollelemente, wie z. B. eine TATA-Box, sind in unmittelbarer Nachbarschaft integriert. Es ist naheliegend, dass das *CgCda1*-Gen nur sehr schwach exprimiert wird und dadurch eine GFP-Expression unter Kontrolle des *CgCda1*-Promotors zwar vorhanden, jedoch sehr schwach und darum nicht sichtbar war. Eine immunologische Detektion des GFP, die im Rahmen der Untersuchung nicht durchgeführt wurde, könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, da es die Nachweisgrenze dieser Methode erlauben würde, auch schwach exprimierte Genprodukte zu identifizieren. Die dargestellten Ergebnisse sprechen dafür, dass *CgCda1* zwar schwach, jedoch über einen ausgedehnten Zeitraum der pilzlichen Differenzierung exprimiert wird.

Untersuchungen zur Regulation der Chitindeacetylase auf Proteinebene sind in der Literatur nicht beschrieben. Der Nachweis von *CgCda1* im Hyphenhomogenat als breitere Bande innerhalb des Bereiches zwischen 25 und 30 kDa im Western Blot spricht dafür, dass das Enzym erst nach der Translation prozessiert wird und somit einer posttranslationalen

Regulation unterliegt. Weiterhin konnte in Appressorien von *C. graminicola* kein Chitinacetylase1-Protein nachgewiesen werden, obwohl Transkripte in jungen und reifen Appressorien vorlagen. Es könnten folglich auch posttranskriptionale Regulationsmechanismen eine Rolle spielen. Wahrscheinlich ist jedoch auch, dass CgCda1 aufgrund der höheren Nachweisgrenze des Western Blot im Proteinextrakt der Appressorien nicht bestätigt werden konnte.

Zwischen dem Nachweis von CgCda1-Transkripten in RT-PCRs und dem Protein im Western Blot auf der einen und den Ergebnissen zur Chitinacetylase-Aktivität in *C. graminicola* (Werner, 1997) auf der anderen Seite treten Differenzen auf. Diese könnten darauf zurückzuführen sein, dass es eine weitere Chitinacetylase in *C. graminicola* gibt, deren Bedeutung eventuell in späten Infektionsstadien liegen könnte.

4. Biologische Funktionen der Chitinacetylase

Für Chitinacetylase werden in der Literatur zwei biologische Rollen diskutiert. Neben ihrer Bedeutung bei einigen Prozessen der Wirt-Parasit-Interaktion, wie bei der Penetration der Pflanzenzelle und beim Schutz vor lytischen Enzymen, kann für sie auch eine Rolle bei der Chitinmodifikation nachgewiesen werden.

Untersuchungen zur Rolle der Chitinacetylase bei der Zellwandbiogenese sind vor allem bei solchen Organismengruppen zu finden, deren Zellwand über einen hohen Chitosangehalt verfügt. Am Zygomyceten *Mucor rouxii* wurde gezeigt, dass Chitinsynthese und Chitinacetylase in einer Tandem-Funktion arbeiten (Davis & Bartnicki-Garcia, 1984a). Das bedeutet, dass die Chitinsynthese Chitin durch Polymerisation synthetisiert und die Chitinacetylase anschließend die N-Acetyl-Bindungen hydrolysiert. Die Umwandlung neu gebildeter Chitinmikrofibrillen in Chitosan ist dabei wesentlich effektiver, als die Umwandlung von vollständig fibrillär vorliegendem Chitin. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wessels und Mitarbeiter (1994). Sie stellten fest, dass die Modifikation des Chitins durch Chitinacetylase bei der Zellwandbiogenese der Zygomyceten zwischen den Prozessen zur Synthese von Chitin und dessen vollständiger Kristallisation stattfindet.

Eine ähnliche biologische Rolle wurde bei den beiden Chitinacetylase der Hefe *S. cerevisiae* festgestellt. Ihnen kommt eine wichtige Bedeutung bei der korrekten Bildung der

Ascosporenwand zu (Christodoulidou *et al.*, 1996; Christodoulidou *et al.*, 1999). Christodoulidou und Mitarbeiter (1996) stellten fest, dass Ascosporen ohne Chitosanschicht eine stark verringerte Stabilität gegenüber lytischen Enzymen besaßen. Die Ascosporen der Doppelmutante ($\Delta Cda1p/\Delta Cda2p$), im Vergleich zu denen des Wildtyps bzw. der Einfachmutanten ($\Delta Cda1p$ oder $\Delta Cda2p$), waren empfindlicher gegenüber hydrolytischen Enzymen. Gleichzeitig stellt dieses System das einzige dar, bei dem mit Hilfe der knock-out Mutagenese einzelne Chitindeacetylase-Gene funktional charakterisiert wurden. Christodoulidou und Mitarbeiter (1999) zeigten, dass der Verlust von Cda1p zur Folge hat, dass die Chitosanhülle diffus und weniger kompakt als beim Wildtyp ist, wohingegen die äußerste Hüllschicht intakt schien. Ein Verlust von Cda2p führte zu drastischeren Schäden. Die Chitosanhülle ist nicht mehr nachweisbar und die äußere Hüllschicht erscheint zerrissen (Christodoulidou *et al.*, 1999). Fehlen beide Chitindeacetylasen, werden keine Schichten mehr gebildet. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass sich Aktivitätsmaximum und Zeitraum der Aktivität beider Chitindeacetylasen unterscheiden. Cda2p ist im Hefesystem das deutlich aktivere Protein.

Neben ihrer Funktion bei der Zellwandbiogenese wird für einige Chitindeacetylasen eine wichtige Rolle bei Prozessen der Wirt-Parasit-Interaktion, als Schutzmechanismus vor lytischen Enzymen während der Penetration der Pflanzenzelle, vermutet. Exakte Beweise, bei denen mit Hilfe der knock-out Mutagenese ein solcher Einfluss gezeigt werden konnte, sind jedoch in der Literatur nicht beschrieben. Es werden lediglich zwei unterschiedliche Modelle diskutiert.

Das erste Modell beschreibt die aktive Rolle der Chitindeacetylase bei der Modifikation und Maskierung elicitoraktiver Chitinfragmente. Es wird gestützt durch die Substratspezifitäten der Chitindeacetylasen für kurzkettige Oligoglucosamine und durch die Tatsache, dass die Chitindeacetylasen pathogener Pilze meist vollständig sekretiert vorliegen (Tsigos *et al.*, 2000). Chitinoligomere mit einer Größe von 2-10 Einheiten, die durch Hydrolyse der Pilzzellwände durch pflanzliche Chitinasen freigesetzt werden, stellen ein geeignetes Substrat aller untersuchten Chitindeacetylasen dar (Gao *et al.*, 1995; Kafetzopoulos *et al.*, 1993a; Tsigos & Bouriotis, 1995). Diese Chitin-Oligomere elicitieren sehr effektiv die pflanzliche Abwehr (Barber *et al.*, 1989; Kauss *et al.*, 1989), wohingegen die deacetylierten Formen keine oder nur geringe Elicitoraktivität besitzen (Vander *et al.*, 1998). Eine Modifizierung der Chitinoligomere durch die Chitindeacetylase könnte also auch beim Mais zu einer deutlichen Verzögerung pflanzlicher Abwehrprozesse führen.

Das zweite Modell beschäftigt sich mit der Rolle der Chitinacetylase beim Penetrationsprozess pilzlicher Hyphen, die einen hohen Chitingehalt in ihrer Zellwand besitzen. Diese Hyphen werden durch die enzymatische Deacetylierung vor dem Angriff pflanzlicher Endochitinasen geschützt (Mendgen *et al.*, 1996). Gleichzeitig wird die Entstehung elicitoraktiver Elemente verringert. Ausführlich sind diese Zusammenhänge beim Ackerbohnenrost *Uromyces fabae* diskutiert (Deising & Siegrist, 1995). Auf der Oberfläche pilzlicher Strukturen, die im Inneren von Blättern gebildet wurden, war kein Chitin durch WGA-Markierung nachweisbar. Zur selben Zeit wurde die Synthese mehrerer Chitinacetylase-Isoformen beobachtet (Deising & Siegrist, 1995). Für weitere phytopathogene Pilze konnte eine Änderung der Zusammensetzung der Strukturkohlenhydrate auf der Oberfläche einzelner Zellwandbereiche gezeigt werden. Dies wird in der Regel aus einer veränderten Zugänglichkeit des Chitins der Zellwand gegenüber dem Lektin WGA während der Pathogenese geschlussfolgert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein Gen (*CgCda1*) für eine Chitinacetylase aus *C. graminicola* isoliert werden. Dieses Gen wurde durch knock-out Mutagenese inaktiviert.

Im Substrat-SDS-Gel wurde deutlich, dass von den vorhandenen drei Isoformen der Chitinacetylase in *C. graminicola* die beiden kleineren Isoformen von 25 kDa und 41 kDa von dem Gen *CgCda1* kodiert werden. Eine dritte Isoform mit mehr als 200 kDa Größe im Substrat-SDS-Gel war auch nach Inaktivierung von *CgCda1* noch aktiv. Die $\Delta Cgda1$ -Mutanten verfügen demnach über Chitinacetylase-Aktivität, wodurch eindeutige Aussagen zur Funktion der Chitinacetylase1 bei der *Colletotrichum*-Infektion am Mais erschwert werden. Die Parallelen zu *C. lindemuthianum* sind offensichtlich. Es wurde von Tsigos & Bouriotis (1995) im Substrat-SDS-Gel eine Chitinacetylase mit einer scheinbaren Größe von 250 kDa nachgewiesen, deren reelles Molekulargewicht nach Deglykosylierung auf ca. 150 kDa geschätzt wurde. Tokuyasu (1996) konnte eine zweite, deutlich kleine Chitinacetylase mit 24 kDa Molekulargewicht bei *C. lindemuthianum* nachweisen.

Die *CgCda1*-defizienten Mutanten zeigen keine charakteristische Abweichung im Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte keine offensichtliche Funktion der Chitinacetylase1 in *C. graminicola* in Bezug auf Wachstum, Differenzierung von Infektionsstrukturen und Pathogenität festgestellt werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Funktion von CgCda1 von einer anderen Isoform des Enzyms übernommen wird. Das könnte gleichzeitig als Zeichen dafür verstanden werden, dass es sich um ein wichtiges Protein handelt, denn essentielle Funktionen werden in der Regel durch Redundanzen der Gene bzw. Enzyme sichtbar (Mendgen *et al.*, 1996). Umfangreiche Untersuchungen zu den Chitinacetylase-Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* belegen, dass beide Chitinacetylase-Genen funktionell redundant sind. Lediglich die Doppelmutante (Δ Cda1p/Cda2p) besitzt eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber lytischen Enzymen, wohingegen die Einfachmutanten (Δ Cda1p, Δ Cda2p) eine dem Wildtyp vergleichbare Empfindlichkeit zeigen (Christodoulidou *et al.*, 1996). Bei Endoxylanase-Genen von *Magnaporthe grisea* konnte gezeigt werden, dass nach Inaktivierung von zwei Xylanase-Genen (*xyl1* und *xyl2*) die Expression dreier weiterer Xylanase-Gene, welche in den Kulturfiltraten der Einfachmutanten oder des Wildtypes nicht auftraten, erfolgt (Wu *et al.*, 1994).

Eine weitere Erklärung könnte darin bestehen, dass die Chitosan-Bildung, die auf die Aktivität von CgCda1 zurückgeht, so gering ist, dass ein Wegfall von CgCda1 keinen feststellbaren Einfluss hat. Dem steht jedoch die Tatsache gegenüber, dass gerade die kleine Isoform der Chitinacetylase von 25 kDa im Substrat-SDS-Gel mit einem artifiziellen Substrat die deutlich aktivere Isoform darstellte.

Als weitere Erklärung für eine fehlende Veränderung des Phänotyps der Chitinacetylase1-defizienten Transformanten könnte gelten, dass das Enzym nur während ganz bestimmter Entwicklungsphasen des Pilzes, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, benötigt wird. So wurden z. B. die sexuellen Stadien des Lebenszyklus von *C. graminicola* nicht untersucht.

Die Ergebnisse vermitteln das Bild, dass der Verlust von CgCda1 ohne Einfluss auf die Differenzierung von Infektionsstrukturen, den Infektionsverlauf und die Virulenz von *C. graminicola* ist. Daneben zeigen sich das vegetative Wachstum des Pilzes sowie die Zusammensetzung der Zellwand seiner Hyphen unbeeinträchtigt. Durch den Wegfall von CgCda1 konnte keine veränderte pflanzliche Abwehr, wie z. B. eine verstärkte Expression von Chitinasen, beobachtet werden. Dies wäre zu erwarten gewesen, wenn CgCda1 maßgeblich an der Beseitigung Elicitor-aktiver Chitinoligomere während des Infektionsprozesses beteiligt wäre.

Genauere Aussagen über eine Bedeutung der Chitinacetylase für die *Colletotrichum*-Infektion am Mais können erst nach Inaktivierung beider Chitinacetylase-Gene in *C. graminicola* getroffen werden.

5. Modifikation der Zellwandzusammensetzung bei der *Colletotrichum*-Infektion

5.1 Differenzierung von *in vivo*- und *in vitro*-gebildeten Infektionsstrukturen

Ein Verlust der Chitinacetylase1 scheint nach den bisher diskutierten Ergebnissen ohne Einfluss auf Wachstum, Entwicklung und Pathogenität des Pilzes zu sein. In diesem Zusammenhang ist die Rolle der Chitinacetylase1 bei der Modifikation der Zellwand von Infektionsstrukturen ein interessanter Aspekt. Dabei sind die Strukturen besonders wichtig, die *in vivo* von den Appressorien ausgehend differenziert werden und die innerhalb des Blattes – also *in planta* – gebildet werden. So beschreiben O'Connell & Ride (1990) eine deutliche Änderung der WGA-Markierung junger intrazellulärer Hyphen im Vergleich zur Markierung von Keimschlauch, Appressorium und reifen, voll entwickelten, intrazellulären Hyphen bei *C. lindemuthianum*. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Freytag & Mendgen (1991) bei Untersuchungen an *Uromyces fabae*. An *Rigidoporus lignosus* wurde ebenfalls eine Änderung der WGA-Markierungsdichte der Zellwand der Hyphen während des Penetrationsprozesses festgestellt (Nicole & Benhamou, 1991).

Um mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden Aussagen über die Oberflächenmodifikation der Zellwand intrazellulärer Primärhyphen treffen zu können, sind *in vivo* Beobachtungen nur bedingt geeignet, da es sich hier in der Regel um Schnitt-Präparate handelt, also tiefere Schichten der Wände der spezifischen Markierung ebenfalls zugänglich sind. Eine Beantwortung der Frage, ob Modifikationen die obersten Zellwandbereiche betreffen, konnte mit der Fluoreszenzmarkierung an Schnitten nicht getroffen werden. Es wurden deshalb zusätzlich *in vitro* differenzierte Infektionsstrukturen fluoreszenzmarkiert, da bei diesen nur die äußeren Bereiche der Zellwand der Markierung zugänglich sind.

Die *in vitro*-Differenzierung von Infektionsstrukturen über das Stadium des Appressoriums hinaus ist bei *C. graminicola* schwierig. Lasso-Agredo (1998) beschreibt eine Induktion

solcher Strukturen auf einer Unterlage aus 8%iger Agarose, die nach Isolierung für die weiteren mikroskopischen Untersuchungen verwendet wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang eine Isolierung der *in vitro*-gebildeten Infektionsstrukturen nach der von Lasso-Agredo (1998) beschriebenen Methode nicht.

Die Bildung von *in vitro*-differenzierten Infektionsvesikeln auf Objektträgern gelang erst reproduzierbar bei Konzentrationen von 3M Glycerol im Medium, was einem enormen osmotischen Stress auf die Infektionsvesikel gleichkommt. De Jong *et al.* (1997) konnten in *Magnaporthe grisea* zeigen, dass innerhalb des Appressoriums Glycerolkonzentrationen von über 3M Glycerol aufgebaut werden. Da Melanin die Porendurchmesser der Appressorienwände auf unter 1 nm reduziert und somit nur noch Wasser, aber keine größeren gelösten Stoffe, diese Schicht passieren können (Howard *et al.*, 1991b), kommt es zu einem starken Anstieg des Turgordruckes innerhalb des Appressorium. Dieser hohe Turgordruck ist gezielt auf die Penetrationspore an der Basis des Appressoriums gerichtet und ermöglicht eine Penetration der darunterliegenden Blattepidermis. Der grundsätzliche Penetrationsmechanismus scheint in *C. graminicola* der gleiche zu sein. Auch hier scheint Glycerol der entscheidende Metabolit zu sein (Sugui, J. und Deising, H.B., persönliche Mitteilung).

Inwieweit *in vitro*-differenzierte Infektionsstrukturen überhaupt mit den *in vivo*-gebildeten Strukturen übereinstimmen, wird sehr kritisch in der Literatur diskutiert. Es wird mehrfach darauf hingewiesen, dass Unterschiede zwischen beiden Formen der Infektionsstrukturen zu finden sind. O'Connell & Ride (1990) konnten an *C. lindemuthianum* zeigen, dass *in vitro*-Infektionshyphen eine höhere Affinität gegenüber WGA besitzen, und dass sie sich von den *in vivo*-Infektionshyphen morphologisch deutlich unterscheiden. Diese Ergebnisse wurden von O'Connell & Bailey (1991) bestätigt. Zur Bekräftigung einer deutlichen Unterscheidung wurde für die *in vitro*-Präparate der Begriff des appressorialen Keimschlauches (*appressorial germ-tube*) für die dem Appressorium entspringenden Infektionsvesikel verwendet. Ebenfalls an *C. lindemuthianum* konnte mit Hilfe eines Biotrophie-spezifischen Antikörpers (UB25) gezeigt werden, dass die Primärhyphen in interzellularen Bereichen und dieser appressoriale Keimschlauch nach Penetration auf Nitrocellulose-Filter im Gegensatz zu den *in vivo* gebildeten Infektionsvesikeln nicht durch diesen Antikörper markiert wurden (Green *et al.*, 1995; Pain *et al.*, 1994).

5.2 Markierung von *in vivo*- und *in vitro*-differenzierten Infektionsstrukturen

5.2.1 Spezifität der Markierung

O'Connell & Ride (1990) zeigten in mehreren Versuchen die Spezifität der WGA-Bindung an Chitin und Chitinoligomere. Daneben stellten sie eine Bindung von WGA an Glykokonjugate mit frei zugänglichen (GlcNAc)₂-Resten fest. Auffällig war auch, dass WGA sehr intensiv Zellkompartimente des Blattes markierte, darunter Sclerenchym- und Xylem-Bestandteile. Diese Beobachtung konnte auch an den Maisblattquerschnitten bestätigt werden. Chitosan zeigte keine Bindung von WGA (Goldstein & Poretz, 1986).

Der Chitosan-Antikörper wurde bereits von Lasso-Agreto zur spezifischen Markierung von chitosanhaltigen Oberflächenstrukturen verwendet (Lasso-Agreto, 1998). Für die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine wesentlich niedrigere Antikörperkonzentration verwendet. Diese wurde zuvor optimiert.

5.2.2 Markierungsmuster der Infektionsstrukturen

Die in den Markierungsversuchen ermittelte Verteilung der Oberflächenkohlenhydrate auf den Infektionsstrukturen von *C. graminicola* ist sowohl für die *in vivo*-gebildeten Strukturen als auch für die *in vitro*-gebildeten Infektionsstrukturen gleich. Es konnten demnach bezüglich der Kohlenhydratverteilung keine Unterschiede zwischen Infektionsstrukturen auf künstlichen Keimunterlagen und den auf und in den Pflanzen gebildeten Strukturen festgestellt werden.

Der Übersichtlichkeit halber sind die Ergebnisse der spezifischen Markierung von Chitin und Chitosan in Tabelle IV.3 knapp zusammengefasst.

Tab. IV.3: Vorhandensein von Chitin und Chitosan in den Infektionsstrukturen von *C. graminicola* (Wildtyp und Transformanten sind zusammengefasst dargestellt).

TEM – Transmissions-Elektronen-Mikroskopie; FM – Fluoreszenzmikroskopie

Felder, in denen keine Aussage steht, wurden in den Untersuchungen nicht erfasst.

		Appressorium	Infektionsvesikel	intrazelluläre Hyphe	Konidie	Keimschlauch
TEM <i>in vivo</i>	Chitin	ja	begrenzt auf Apexbereich	ja		
	Chitosan	ja	ja	ja		
FM <i>in vivo</i>	Chitin	selten	ja	ja		
	Chitosan	ja	ja	ja		
FM <i>in vitro</i>	Chitin	ja	nein		ja	ja
	Chitosan		ja		nein	ja

Konidie, Keimschlauch und Appressorium zeigten eine spezifische Affinität gegenüber WGA, was dafür spricht, dass ihre Zellwandoberfläche chitinhaltig ist. Bei den *in vitro*-Präparaten konnte für die Keimschläuche zusätzlich Chitosan als Zellwandkohlenhydrat nachgewiesen werden. Für die Appressorien war *in vivo* ebenfalls eine schwache Chitosan-Markierung nachweisbar.

Die Infektionsvesikel zeigten sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine spezifische Markierung mit Chitosan-Antikörper. Eine WGA-Bindung war nur bei den Schnittpräparaten der *in vivo*-gebildeten intrazellulären Hyphen vorhanden, da hier auch tiefer liegende Zellschichten dem Lektin zugänglich sind. Die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie erlaubt einen detaillierteren Einblick in die Verteilung von Chitin und Chitosan. Beim Penetrationskeil, der die Epidermiszellwand penetriert (häufig in der Literatur als *penetration peg* bezeichnet), konnte Chitin nur für die Apexregion nachgewiesen werden. Diese Beobachtung unterstützt die Aussagen von Davis & Bartnicki-Garcia (1984 a) und Wessels *et al.* (1994), dass die Chitindeacetylierung erst zwischen den Prozessen zur Synthese von Chitin und dessen Kristallisation stattfindet.

In der Zellwand junger intrazellulärer Hyphen waren sowohl Chitin als auch Chitosan als Strukturpolymer nachweisbar. Dabei fiel auf, dass durch Chitosan-Gold verstärkt die äußeren Zellwandbereiche markiert waren, wohingegen WGA-Gold-Partikel vor allem in tieferen

Wandschichten nachweisbar waren. Voll entwickelte sekundäre Hyphen der nekrotrophen Phase, die schon mehrere Pflanzenzellen erschlossen hatten, zeigten bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine Chitosan-Markierung mehr. Die Septen der Hyphen waren dagegen intensiv mit WGA markiert.

Weiterhin konnte durch Transmissions-Elektronen-Mikroskopie eine spezifische Chitosan-Markierung der inneren Appressorienwand gezeigt werden. In den Aufnahmen ist gut zu erkennen, dass sich der *penetration peg* aus dieser inneren, chitosanhaltigen Appressorienwand generiert. Dieses Phänomen ist für *M. grisea*, einige *Colletotrichum* ssp. und verschiedene Roste beschrieben (Mendgen & Deising (1993) und Zitate darin). Die unmittelbar an die äußere Appressorienwand angrenzenden extrazellulären Bereiche zeigen ebenfalls eine charakteristische Chitosan-Markierung. Diese Beobachtungen stimmen mit den Befunden überein, dass *CgCda1*-Transkripte in jungen und älteren Appressorien gefunden wurden. Vermutlich gelang der Nachweis des Proteins im Western Blot in den isolierten Appressorien-Extrakten nicht, weil diese Methode eine deutlich höhere Nachweisgrenze als RT-PCR oder Immunmarkierung besitzt. Die Tatsache, dass Chitosan verstärkt für die äußeren Zellwandbereiche der Infektionsvesikel und der intrazellulären Hyphen nachgewiesen werden konnte, spricht für die Theorie, dass Chitosan von extrazellulären Chitinacetylasen durch Modifikation vorhandener Chitinstränge gebildet wird. Bekräftigt wird diese Aussage dadurch, dass aus der diffus über den gesamten Zellwandquerschnitt verteilten WGA-Gold-Markierung von vegetativen Hyphen außerhalb des Blattes eine deutlich auf innere Zellwandabschnitte konzentrierte Markierung der intrazellulären Hyphen wird.

Die Ergebnisse der Immunmarkierung stimmen somit nur teilweise mit der bereits an unterschiedlichen Pilzen nachgewiesenen Veränderung des Kohlenhydratmusters auf den Oberflächen der *in planta*-differenzierten Infektionsstrukturen mit dem Beginn der Penetration des Wirtsgewebes überein (Freytag & Mendgen, 1991a, Nicole, 1991 #79; O'Connell *et al.*, 1992; O'Connell & Ride, 1990). Chitosan ist bei *C. graminicola*-Infektionsstrukturen schon vor der Penetration in das Wirtsgewebe als Bestandteil der Zellwand vorhanden. Es konnte sowohl in den Zellwänden von Keimschläuchen als auch in den Appressorienwänden durch Immunmarkierung nachgewiesen werden. Es konnte lediglich eine Zunahme von Chitosan in den Zellwandbereichen der *in planta*-differenzierten Strukturen festgestellt werden, da bei diesen ein Nachweis des Polymers auch mit Hilfe der weniger empfindlichen Fluoreszenzmikroskopie gelang.

Die für *C. lindemuthianum* getroffene Feststellung, dass Infektionshyphen auf künstlichen Unterlagen verstärkt WGA binden (O'Connell & Bailey, 1991), konnte nicht für *C. graminicola* bestätigt werden.

Vier der untersuchten Transformanten von *C. graminicola*, darunter alle drei *CgCda1*-defizienten Transformanten und T_{ekt} 29 mit ektopisch integriertem knock out-Vektor, zeigen eine mit dem Wildtyp identische Markierung der Infektionsstrukturen mit WGA und Chitosanantikörper. Die Inaktivierung der Chitinacetylase1 hat somit keinen sichtbaren Einfluss auf die Modifikation der Zellwand der Infektionsstrukturen von *C. graminicola*.

5.3 Bedeutung von Chitosan für die *Colletotrichum*-Infektion am Mais

In die Untersuchungen zur Phänotypcharakterisierung der *CgCda1*-defizienten Transformanten wurden zu Kontrollzwecken zwei Transformanten mit ektopisch integriertem knock out-Vektor (T_{ekt} 24 und T_{ekt} 29) einbezogen. Dabei fiel nach den ersten Versuchen zu Wachstum und Differenzierung von Infektionsstrukturen die Transformante T_{ekt} 24 auf. Sie zeigte zum einen Unterschiede in der Pigmentierung der Konidienlager und war zum anderen in der Differenzierung von Infektionsstrukturen gestört. Die Appressoriendifferenzierung trat deutlich verzögert und erst nach langem Keimschlauchwachstum auf. Die Pathogenität der Transformante blieb jedoch erhalten.

Bei den Experimenten zur Fluoreszenzmarkierung mit Chitosanantikörper konnte bei T_{ekt}24 weder bei *in vivo*- noch bei *in vitro*-differenzierten Infektionsvesikeln eine Markierung von Chitosan beobachtet werden. Trotz des Vorhandenseins der Aktivitätsbanden aller drei Chitinacetylase-Isoformen im Substratgel war auf der Oberfläche der Infektionsvesikel kein fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von Chitosan möglich. Trotz chitosanarmer oder sogar möglicherweise chitosanfreier Infektionsvesikel, die somit über keine Modifikation ihrer Oberfläche verfügten, war die Transformante in der Lage, gesunde Maispflanzen zu infizieren. Eine Modifikation der Infektionsstrukturen bei der Penetration durch Umwandlung von Chitin in Chitosan scheint demnach für eine erfolgreiche Infektion nicht notwendig zu sein.

Die Markierung von Chitin durch WGA blieb durch die ektopische Integration des Vektor unbeeinflusst und war mit der Markierung im Wildtyp vergleichbar. Chitin war somit nicht auf der Oberfläche von Infektionsvesikeln und primären Hyphen nachweisbar.

Die biochemischen Zellwandanalysen der vegetativen Hyphen von T_{ekt} 24 zeigten eine dem Wildtyp ähnliche Zellwandzusammensetzung. Da also bezüglich der Zellwandzusammensetzung vegetativer Hyphen keine Unterschiede zum Wildtyp erkennbar sind, könnte eine Beeinträchtigung spezieller Mechanismen der korrekten Differenzierung von Infektionsvesikeln oder spezifischer Abläufe bei der Modifikation der Zellwände der Infektionsvesikel zur Ausprägung dieses charakteristischen Phänotyps von T_{ekt} 24 führen. Mutationen an unterschiedlichen Stellen in Signalwegen, die zu einer Hemmung der Differenzierung von Infektionsstrukturen führen, sind zahlreich beschrieben (Deising *et al.*, 2000 und Zitate darin).

V Zusammenfassung - Summary

1. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der Chitinacetylase1 des Maispathogen *Colletotrichum graminicola* (CESATI) WILSON für eine erfolgreiche Infektion untersucht. Daneben wurden Aussagen über die Notwendigkeit einer Modifikation der Zellwandoberfläche für eine erfolgreiche *Colletotrichum*-Infektion getroffen.

Mit Hilfe einer heterologen Sonde gelang es, das Gen für die Chitinacetylase1 aus *C. graminicola* (*CgCda1*) zu isolieren. Dieses wurde anschließend vollständig sequenziert. Es kodiert für ein sekretiertes Protein, welches nach Abspaltung des Signalpeptides eine Größe von 25,1 kDa besitzt. Untersuchungen im Substrat-SDS-Gel zeigen, dass *CgCda1* ebenfalls für eine zweite, 45 kDa große Isoform kodiert. Sequenzvergleiche ergaben große Ähnlichkeiten zur Chitinacetylase des nahe verwandten Pilzes *C. lindemuthianum*. Übereinstimmungen treten auch zu Chitinacetylasegenen anderer Pilze sowie den Genen für die NodB-Proteine der Rhizobien und einigen bakteriellen Genen auf.

Die Ergebnisse aus RT-PCR Untersuchungen und Western Blot deuten darauf hin, dass die Chitinacetylase1 in *C. graminicola* in vegetativen Hyphen und in Infektionsstrukturen exprimiert wird. Transkripte finden sich ebenfalls in frühen, nicht aber in älteren Stadien der Infektion. *CgCda1* war in ruhenden Konidien nicht nachweisbar.

Zur Überprüfung, ob *CgCda1* in *C. graminicola* zu einer erfolgreichen Infektion beiträgt und ob sie eine Virulenz- oder Pathogenitätsdeterminante darstellt, wurden Chitinacetylase1-defiziente Mutanten durch *gene disruption* hergestellt und im Infektionstest überprüft. Es konnte keine Funktion von *CgCda1* in Bezug auf Wachstum, Differenzierung von Infektionsstrukturen und Pathogenität festgestellt werden. Die Chitinacetylase1 stellt demnach weder eine Virulenz- noch eine Pathogenitätsdeterminante dar. Rückschlüsse auf die Bedeutung einer Chitinacetylase für eine erfolgreiche Infektion werden erschwert, da eine dritte Chitinacetylase-Isoform auch bei den $\Delta Cgcdal$ Mutanten nachweisbar bleibt.

Mit Hilfe verschiedener mikroskopischer Methoden wurde die Modifikation der Oberflächenkohlenhydrate der Zellwand während der Differenzierung von

Infektionsstrukturen analysiert. Dabei wurden sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-differenzierte Strukturen in die Analyse einbezogen. Eine Modifikation der Zellwand während der Penetration in das Wirtsgewebe kann gezeigt werden. Das Verhältnis von Chitin zu Chitosan ändert sich dabei mit der Penetration ins Wirtsblatt. Auf der Zellwandoberfläche des Keimschlauches konnten beide Kohlenhydrate nachgewiesen werden. In der äußeren Appressorienwand dominiert Chitin, in der inneren Appressorienwand Chitosan. Die Oberfläche von Infektionsvesikel und primären intrazellulären Hyphen wird von Chitosan dominiert. Chitin kann innerhalb des Blattes nur am Apex penetrierender Hyphen nachgewiesen werden.

Bezüglich der Kohlenhydratverteilung konnten keine Unterschiede zwischen Infektionsstrukturen auf künstlichen Keimunterlagen und den auf und in den Pflanzen gebildeten Strukturen festgestellt werden. Die Inaktivierung der Chitindeacetylase1 in *C. graminicola* hat keine Auswirkungen auf die Verteilung von Chitin und Chitosan in der Zellwand der Infektionsstrukturen.

Die Transformante mit ektopisch integriertem knock-out Vektor (T_{ekt} 24) zeigt im Substratgel Aktivitätsbanden aller drei Chitindeacetylase-Isoformen und infizierte erfolgreich Maispflanzen. Mit Hilfe der Fluoreszenzmarkierung konnte Chitosan auf der Oberfläche der Keimschläuche nachgewiesen werden. Auf der Oberfläche der Infektionsvesikel dieser Transformante war dagegen weder Chitosan noch Chitin nachweisbar. Eine Modifikation der Infektionsstrukturen bei der Penetration durch Umwandlung von Chitin in Chitosan scheint demnach für eine erfolgreiche Infektion nicht notwendig zu sein.

Der Schwerpunkt anschließender Arbeiten sollte auf der Untersuchung der zweiten Chitindeacetylase in *C. graminicola* liegen. Die Erzeugung von Doppelmutanten eröffnet neue Möglichkeiten, die Bedeutung Deacetylierung von Chitin in *C. graminicola* zu analysieren.

2. Summary

In this study the role of chitin deacetylase in modification of surface carbohydrates of fungal infection structures of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* (CESATI) WILSON was examined. The necessity of the conversion of chitin to chitosan for successful *Colletotrichum*-infection has been discussed.

A heterologous probe was used to isolate the gene for chitin deacetylase1 (*CgCda1*) of *C. graminicola*. This gene was sequenced subsequently. It encodes a secreted protein with a deduced molecular weight of 25,1 kDa after cleavage of the signal peptide. Investigations using substrate-inclusion SDS-PAGE showed that *CgCda1* encodes a second isozyme with a molecular weight of 45 kDa. The comparison of different sequences shows high similarity to the chitin deacetylase from the related fungus *C. lindemuthianum*. There are also significant similarities to genes of chitin deacetylases from other fungi, the genes of rhizobial NodB proteins and some bacterial genes.

Results from RT-PCR studies and Western Blot indicate that chitin deacetylase1 of *C. graminicola* is expressed in vegetative hyphae and infection structures. Transcripts were found in early but not in older states of infection. There was no evidence of *CgCda1* transcripts in dormant conidia

To check whether *CgCda1* is necessary for successful infection and whether it represents an important virulence or pathogenity determinant, mutants with an inactivated *CgCda1* gene were generated by gene disruption and tested in infection studies. No evidence for a role of *CgCda1* in growth, differentiation of infection structures and pathogenity was found. The chitin deacetylase1 does not represent a virulence or pathogenity determinant. It was difficult to assess the importance of chitin deacetylation for successful infection because a third chitin deacetylase isozyme is still active in the $\Delta Cgcdc1$ mutants.

The modification of carbohydrates of the cell wall during the differentiation of infection structures was analysed by different microscopical techniques. *In vivo*- and *in vitro*-differentiated infection structures were analysed. The relation of chitin and chitosan changed during the penetration of host tissue. Chitosan and chitin are cell wall components of germ tubes. Chitin was detectable in the outer appressorial wall and chitosan was prominent in the inner appressorial wall. Importantly, Chitosan but not chitin is the surface carbohydrate in infection vesicles. Consequently a modification of cell wall during penetration of host tissue can be shown.

There were no differences between infection structures on artificial or natural surfaces. Inactivation of chitin deacetylase1 in *C. graminicola* had no effect on the specific distribution of chitin and chitosan in the cell wall of infection structures.

A Transformant with ectopically integrated knock out vector (T_{ekt} 24) showed activity of all three chitin deacetylase-isozymes in substrate-inclusion SDS-PAGE. Although Chitosan was detectable on the surface of germ tubes, neither chitosan nor chitin were detectable on the surface of infection vesicles by fluorescence labelling. Transformant infected maize plants successfully. A modification of infection structures during penetration by conversion of chitin to chitosan thus appears not to be required for successful infection.

Future studies should concentrate on the second chitin deacetylase in *C. graminicola*. Generation of double mutants should offer new opportunities to analyse the importance of chitin deacetylation in *C. graminicola* more conclusively.

VI Literatur

- Akiyama, K., Kawazu, K. & Kobayashi, A.** (1994) Partially N-deacetylated chitin elicitor induces antimicrobial flavonoids in pea epicotyls. *Zeitschrift für Naturforschung*, **49c**, 811-818.
- Alfonso, C., Nuero, O.M., Santamaria, F. & Reyes, F.** (1995) Purification of a heat-stable chitin deacetylase from *Aspergillus nidulans* and its role in cell wall degradation. *Current Microbiology*, **30**, 49-54.
- Allan, C. & Hadwiger, L.A.** (1979) The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, **3**, 285-287.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, 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**, 3389-402.
- Anderson, D.W. & Nicholson, R.L.** (1996) Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, **88**, 996-1002.
- Araki, Y. & Ito, E.** (1975) A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. Enzymatic deacetylation of chitin. *European Journal of Biochemistry*, **53**, 71-78.
- Arpin, N. & Bouillant, M.L.** (1981) Light and mycosporines. In Turian, G. and Hohl, H.R. (eds.), *The fungal spore, morphogenetic controls*. Academic Press, London, pp. 435-454.
- Bailey, J.A., O'Connell, R.J., Pring, R.J. & Nash, C.** (1992) Infection strategies of *Colletotrichum* species. In Bailey and Jeger (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, pp. 88-120.
- Barber, M.S., Bertram, R.E. & Ride, J.P.** (1989) Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **34**, 3-12.
- Bartholomae, S.** (1994) Induzierte Resistenz gegen den Ackerbohnenrost (*Uromyces fabae*). *Fakultät für Biologie*. Universität Konstanz, Konstanz.
- Bartinicki-Garcia, S.** (1989) In Skjark-Braek, G., Anthonsen, T. and Sandford, P. (eds.), *Chitin and Chitosan, Sources, Chemistry, Biochemistry, Physical Properties and Applications*. Elsevier, Essex, pp. 23-35.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1999) Glucans, walls, and morphogenesis: On the contributions of J. G. H. Wessels to the golden decades of fungal physiology and beyond. *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 119-27.

- Bartnicki-Garcia, S., Bartnicki, D.D. & Gierz, G.** (1995) Determinants of fungal cell wall morphology: the vesicle supply center. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 372-378.
- Baureithel, K., Felix, G. & Boller, T.** (1994) Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**, 17931-17938.
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H.B. & Bastmeyer, M.** (1999) Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science*, **285**, 1896-9.
- Bennett, R. & Wallsgrove, R.M.** (1994) Secondary metabolism in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, **127**, 617-633.
- Bergstrom, G.C. & Nicholson, R.L.** (1999) The Biology of Corn Anthracnose. *Plant Disease*, **83**, 596-608.
- Bergstrom, G.C. & Nicholson, R.L.** (2000) The biology of *Colletotrichum graminicola* and maize anthracnose. In Prusky, Freeman and Dickman (eds.), *Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction*. APS Press, St. Paul, pp. 374-393.
- Bol, J.F., Linthorst, J.M. & Cornelissen, B.J.C.** (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, **28**, 113-138.
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 189-214.
- Borgia, P.T., Iartchouk, N., Riggle, P.J., Winter, K.R., Koltin, Y. & Bulawa, C.E.** (1996) The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development [published erratum appears in *Fungal Genet Biol* 1996 Dec;20(4):314]. *Fungal Genetics and Biology*, **20**, 193-203.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-54.
- Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G. & Breitenbach, M.** (1988) Chemical composition of the yeast ascospore wall: the second outer layer consists of chitosan. *The Journal of Biological Chemistry*, **263**, 11569-11574.
- Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C.J. & Broglie, R.** (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, **254**, 1194-1197.

- Brown, T.** (1999) Southern Blotting. In Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 2.9.1-2.9.15.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T. & Hirt, H.** (2000) Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 36734-36740.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, **162**, 156-9.
- Chong, J., Harder, D.E. & Rohringer, R.** (1986) Cytochemical studies on *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in a compatible wheat host. II. Haustorium mother cell walls at the host cell penetration site, haustorial walls, and the extrahaustorial matrix. *Canadian Journal of Botany*, **64**, 2561-2575.
- Christodoulidou, A., Bouriotis, V. & Thireos, G.** (1996) Two sporulation-specific chitin deacetylase-encoding genes are required for the ascospore wall rigidity of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 31420-31425.
- Christodoulidou, A., Briza, P., Ellinger, A. & Bouriotis, V.** (1999) Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isoenzymes. *FEBS Letters*, **460**, 275-279.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. & Miller, R.H.** (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **86**, 2172-5.
- Clark, J.M.** (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Research*, **16**, 9677-86.
- Clarke, J.H., Davidson, K., Gilbert, H.J., Fontes, C.M. & Hazlewood, G.P.** (1996) A modular xylanase from mesophilic *Cellulomonas fimi* contains the same cellulose-binding and thermostabilizing domains as xylanases from thermophilic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **15**, 27-35.
- Cuero, R.G. & Osuji, G.O.** (1993) Chitosanase induction in maize and peanuts: enzyme-induction factors. In Muzzarelli, R.A.A. (ed.) *Chitin enzymology*. Alda Tecnografica, Ancona, p. 277 ff.
- Cuero, R.G. & Osuji, G.O.** (1995) *Aspergillus flavus*-induced chitosanase in germinating corn and peanut seeds: *A. flavus* mechanism for growth dominance over associated fungi and concomitant aflatoxin production. *Food Addit Contam*, **12**, 479-483.

- Dangl, J.L., Dietrich, R.A. & Richberg, M.H.** (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell*, **8**, 1793-1801.
- Davis, L.L. & Bartnicki-Garcia, S.** (1984 a) Chitosan synthesis by the tandem action of chitin synthetase and chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Biochemistry*, **23**, 1065-1073.
- Davis, L.L. & Bartnicki-Garcia, S.** (1984 b) The co-ordination of chitosan and chitin synthesis in *Mucor rouxii*. *Journal of Genetic Microbiology*, **130**, 2095-2102.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N. & Talbot, N.J.** (1997) Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, **389**, 244-245.
- Deising, H., Heiler, S., Rauscher, M., Xu, H. & Mendgen, K.** (1996) Cellular aspects of rust infection structure differentiation. Spore adhesion and fungal morphogenesis. In Nicole, M. and Gianinazzi-Pearson, V. (eds.), *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions*. Kluwer Academic Publishers, pp. 135-156.
- Deising, H. & Siegrist, J.** (1995) Chitin deacetylase activity of the rust *Uromyces viciae-fabae* is controlled by fungal morphogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, **127**, 207-212.
- Deising, H.B., Werner, S. & Wernitz, M.** (2000) The role of fungal appressoria in plant infection [In Process Citation]. *Microbes and Infection*, **2**, 1631-41.
- Denarie, J., Debelle, F. & Prome, J.C.** (1996) Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry*, **65**, 503-535.
- Denison, S.H.** (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, **29**, 61-71.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R. & Burg, G.** (1997) Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and bacteria. *BioTechniques*, **22**, 88-90.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K. & Mattick, J.S.** (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, **19**, 4008.
- Dutton, J.R., Johns, S. & Miller, B.L.** (1997) StuAp is a sequence-specific transcription factor that regulates developmental complexity in *Aspergillus nidulans*. *Embo Journal*, **16**, 5710-21.

- Ebel, J.** (1986) Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology*, **24**, 235-264.
- Epstein, L., Lusnak, K. & Kaur, S.** (1998) Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, **23**, 189-203.
- Felix, G., Baureithel, K. & Boller, T.** (1998) Desensitization of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiology*, **117**, 643-650.
- Felix, G., Regenass, M. & Boller, T.** (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal*, **4**, 307-316.
- Fernandes, A.C., Fontes, C.M., Gilbert, H.J., Hazlewood, G.P., Fernandes, T.H. & Ferreira, L.M.** (1999) Homologous xylanases from *Clostridium thermocellum*: evidence for bi-functional activity, synergism between xylanase catalytic modules and the presence of xylan-binding domains in enzyme complexes. *Biochemistry Journal*, **15**, 105-110.
- Flor, H.H.** (1971) Current status of the gene for gene-concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275-296.
- Freytag, S.** (1990) Oberflächenkohlenhydrate und Zellwandaufbau von in Vitro-induzierten Infektionsstrukturen von Rosten. *Fakultät für Biologie*. Universität Konstanz, Konstanz.
- Freytag, S. & Mendgen, K.** (1991 a) Carbohydrates on the surface of urediniospore- and basidiospore-derived infection structures of heteroecious and autoecious rust fungi. *The New Phytologist*, **119**, 527-534.
- Freytag, S. & Mendgen, K.** (1991 b) Surface carbohydrates and cell wall structure of in vitro-induced uredospore infection structures of *Uromyces viciae-fabae* before and after treatment with enzymes and alkali. *Protoplasma*, **161**, 94-1003.
- Fu, Y.H. & Marzluf, G.A.** (1990) nit-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **87**, 5331-5.
- Gao, X.D., Katsumoto, T. & Onodera, K.** (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Absidia coerulea*. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, **117**, 257-63.
- Goldstein, I.J. & Poretz, R.D.** (1986) Isolation, physiochemical characterization and carbohydrate-binding specificity of lectins. In Leiner, I.E., Sharon, N. and Goldstein,

- I.J. (eds.), *The lectins: properties, functions, and applications in biology and medicine*. Academic Press, New York, pp. 33-243.
- Goutte, C. & Johnson, A.D.** (1994) Recognition of a DNA operator by a dimer composed of two different homeodomain proteins. *Embo Journal*, **13**, 1434-42.
- Green, J.R., Pain, N.A., Cannell, M.E., Jones, G.L., Leckie, C.P., McCready, S., Mendgen, K., Mitchell, A.J., Callow, J.A. & O'Connell, R.J.** (1995) Analysis of differentiation and development of the specialized infection structures formed by biotrophic fungal plant pathogens using monoclonal antibodies. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 408-417.
- Grenier, J. & Asselin, A.** (1990) Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **3**, 401-407.
- Grenier, J., Benhamou, N. & Asselin, A.** (1991) Colloidal gold-complexed chitosanase: a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi. *Journal of General Microbiology*, **137**, 2007-2015.
- Grenier, J., Potvin, C. & Asselin, A.** (1993) Barley pathogenesis-related proteins with fungal cell wall lytic activity inhibit the growth of yeasts. *Plant Physiology*, **103**, 1277-1283.
- Hadwiger, L.A.** (1999) Host-parasite interactions: elicitation of defense responses in plants with chitosan. In Jollès, P. and Muzzarelli, R.A.A. (eds.), *Chitin and Chitinases*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 185-200.
- Hadwiger, L.A., Kendra, D.F., Fristenski, B.W. & Wagoner, W.** (1986) Chitosan both activated genes in plants and inhibits RNA synthesis in fungi. In Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W. (eds.), *Chitin in nature and technology*, New York, pp. 209-214.
- Hadwiger, L.A., Klosterman, S., Chang, M.-M., Friel, P. & Hosick, H.L.** (1997) Chitosan heptamer alters DNA induces defense genes in plants and induces the accumulation of gene p53 product in animal cells. In Domard, A., Roberts, G.A.F. and Varum, K.M. (eds.), *Advances in chitin sciences*. Jaques André, Lyon, Vol. 2, pp. 102-109.
- Hadwiger, L.A., Ogawa, T. & Kuyama, H.** (1994) Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**, 531-533.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R. & Schmelzer, E.** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene

- activation in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **92**, 4150-4157.
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Gottfert, M. & Mendgen, K.** (1997) A putative amino acid transporter is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**, 438-45.
- Hammerschmidt, R.** (1999) Phytoalexins: what have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, **37**, 285-306.
- Heath, I.B.** (1994) The cytoskeleton in hyphal growth, organelle movements, and mitosis. In J.G.H., W. and Meinhardt, F. (eds.), *Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. I, pp. 43-65.
- Heath, I.B.** (1995) Integration and regulation of hyphal tip growth. *Canadian Journal of Botany*, **73**, S131-S139.
- Henson, J.M., Butler, M.J. & Day, A.W.** (1999) The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. *Annual Reviews of Phytopathology*, **37**, 447-471.
- Hirsch, A.M.** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist*, **122**, 211-237.
- Howard, R.J., Bourette, T.M. & Ferrari, M.A.** (1991 a) Infection by *Magnaporthe*: an *in vitro* analysis. In Mendgen, K. and Lesemann, D.-E. (eds.), *Electron Microscopy of Plant Pathogens*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 251-264.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. & Money, N.P.** (1991 b) Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **88**, 11281-4.
- Huie, M.A., Scott, E.W., Drazinic, C.M., Lopez, M.C., Hornstra, I.K., Yang, T.P. & Baker, H.V.** (1992) Characterization of the DNA-binding activity of GCR1: *in vivo* evidence for two GCR1-binding sites in the upstream activating sequence of TPI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cell Biology*, **12**, 2690-700.
- Huynh, Q.K., Hironaka, C.M., Levine, E.B., Smith, C.E., Borgmeyer, J.R. & Shah, D.M.** (1992) Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 6635-40.
- Jach, G., Grönhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J. & Maas, C.** (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, **8**, 97-109.

- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. & Schell, J.** (1993) *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **90**, 625-629.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A. & Bouriotis, V.** (1993 a) Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **90**, 2564-8.
- Kafetzopoulos, D., Martinou, A. & Bouriotis, V.** (1993 b) Purification and properties of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. In Muzzarelli, R.A.A. (ed.) *Chitin Enzymology*. Alda Tecnografica, Italy, pp. 147-154.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J. & Bouriotis, V.** (1993 c) cDNA cloning of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. In Muzzarelli, R.A.A. (ed.) *Chitin Enzymology*. Alda Tecnografica, Italy, pp. 431-436.
- Kafetzopoulos, D., Thireos, G., Vournakis, J.N. & Bouriotis, V.** (1993 d) The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for two bacterial gene products. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A.*, **90**, 8005-8.
- Kaster, K.R., Burgett, S.G. & Ingolia, T.D.** (1984) Hygromycin B resistance as a dominant selectable marker in yeast. *Current Genetics*, **8**, 353-358.
- Kauss, H. & Bauch, B.** (1988) Chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Methods in Enzymology*, **161B**, 518-523.
- Kauss, H., Jeblick, W. & Domard, A.** (1989) The degrees of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta*, **178**, 385-392.
- Kauss, H., Jeblick, W., Domard, A. & Siegrist, A.J.** (1997) Partial acetylation of chitosan and a conditioning period are essential for elicitation of H₂O₂ in surface-abraded tissues from various plants. In Domard, A. and Roberts, G.A.F. (eds.), *Advances in chitin sciences*. Jacques André, Lyon, Vol. 2, pp. 94-101.
- Kauss, H., Jeblick, W. & Young, D.H.** (1982) Chitin deacetylase from the Plant Pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Plant Science Letters*, **28**, 231-236.
- Kauss, H., Waldmann, T. & Quader, H.** (1990) Ca⁺⁺ as a signal in the induction of callose synthesis. In Ranjeva, R. and Boudet, A.M. (eds.), *Signal perception and transduction in higher plants*. Springer, Berlin, pp. 117-131.
- Kendra, D.F. & Hadwiger, L.A.** (1984) Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation in *Pisum sativum*. *Experimental Mycology*, **8**, 276-281.

- Kobayashi, A., Akiyama, K. & Kawazu, K.** (1994) Partially N-deacetylated chitin fragments are strong elicitors for (+)-pisatin induction in epicotyls of pea. *Zeitschrift für Naturforschung*, **49c**, 302-308.
- Köhle, H., Young, D.H. & Kauss, H.** (1984) Physiological changes in suspension-cultured soybean cells elicited by treatment with chitosan. *Plant Science Letters*, **33**, 221-230.
- Kolattukudy, P.E.** (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, **208**, 990-1000.
- Kolattukudy, P.E.** (1985) Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, **23**, 223-250.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I. & Yamamoto, M.** (1982) Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology*, **72**, 1198-1200.
- Kuchitsu, K., Kikuyama, M. & Shibuya, N.** (1993) N-Acetylchitoooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma*, **174**, 79-81.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of Biochemical & Biophysical Methods*, **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lasso-Agredo, M.D.** (1998) Untersuchung der Oberflächenkohlenhydrate von pilzlichen Infektionsstrukturen. *Fakultät der Biologie*. Universität Konstanz, Konstanz, p. 60 pp.
- Leach, J., Lang, B.R. & Yoder, O.C.** (1982) Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Journal of General Microbiology*, **128**, 1719-1729.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. & Ward, E.** (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal*, **16**, 223-233.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.-S., Oh, K.-Y., Choi, E.J., Schroeder Taylor, A.T., Low, P.S. & Lee, Y.** (1999) Oligogalacturonic Acid and Chitosan Reduce Stomatal Aperture by Inducing the Evolution of Reactive Oxygen Species from Guard Cells of Tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology*, **121**, 147-152.

- LeGendre, N. & Matsudaira, P.T.** (1989) Purification of proteins and peptides by SDS-PAGE. In Matsudaira (ed.) *A practical guide to protein and peptide purification for microsequencing*. Academic Press, San Diego, pp. 52-69.
- Leite, B. & Nicholson, R.L.** (1992) Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*, **16**, 76-86.
- Leite, B. & Nicholson, R.L.** (1993) A volatile self-inhibitor from *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, **85**, 945-951.
- Lienart, Y., Gautier, C., Dubois-Dauphin, R. & Domard, A.** (1993) Tetramers of chitin (chitosan) as elicitors in *Rubus* protoplasts. In Muzzarelli, R.A.A. (ed.) *Chitin Enzymology*. Alda Tecnografica, Ancona, pp. 271-276.
- Loschke, D.C., Hadwiger, L.A. & Wagoner, W.** (1983) Comparison of mRNA populations coding for phenylalanine ammonia lyase and other peptides from pea tissue treated with biotic and abiotic phytoalexin inducers. *Physiological Plant Pathology*, **23**, 163-173.
- Lu, S., Lyngholm, L., Yang, g., Bronson, C., Yoder, O.C. & Turgeon, B.G.** (1994) Tagged mutations at the Tox1 locus of *Cochliobolus heterostrophus* by restriction enzyme-mediated integration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **91**, 12649-12653.
- Lundin, M., Nehlin, J.O. & Ronne, H.** (1994) Importance of a flanking At-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Molecular and Cell Biology*, **14**, 1979-1985.
- Luttrell, E.S.** (1974) Parasitism of fungi on vascular plants. *Mycologia*, **66**, 1-15.
- Maor, R., Puyesky, M., Horwitz, B.A. & Sharon, A.** (1998) Use of the green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*, **102**, 491-496.
- Marzluf, G.A.** (1997) Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 17-32.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. & Boller, T.** (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology*, **88**, 936-942.
- Mellersh, D.G. & Heath, M.C.** (2001) Plasma membrane-cell wall adhesion is required for expression of plant defense responses during fungal penetration. *Plant Cell*, **13**, 413-424.

- Mendgen, K. & Deising, H.B.** (1993) Infection structures of fungal plant pathogens—a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, **124**, 193-213.
- Mendgen, K., Hahn, M. & Deising, H.** (1996) Morphogenesis and Mechanism of Penetration by Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, **34**, 367-386.
- Mercure, E.W., Kunoh, H. & Nicholson, R.L.** (1994a) Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **45**, 407-420.
- Mercure, E.W., Leite, B. & Nicholson, R.L.** (1994b) Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **45**, 421-440.
- Merz, R.A., Horsch, M., Nyhlen, L.E. & Rast, D.M.** (1999) Biochemistry of chitin synthase. *Exs*, **87**, 9-37.
- Millward-Sadler, S.J., Poole, D.M., Henrissat, B., Hazlewood, G.P., Clarke, J.H. & Gilbert, H.J.** (1994) Evidence for a general role for high-affinity non-catalytic cellulose binding domains in microbial plant cell wall hydrolases. *Molecular Microbiology*, **11**, 375-382.
- Money, N.P.** (1990) Measurement of pore size in the hyphal cell wall of *Achlya bisexualis*. *Experimental Mycology*, **14**, 234-242.
- Mülhardt, C.** (1999) *Der Experimentator: Molekularbiologie*. G. Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Nennstiel, D., Scheel, D. & Nürnberger, T.** (1998) Characterisation and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Letters*, **431**, 405-410.
- Nicholson, R.L.** (1992) *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and *Sorghum*. In Bailey and Jeger (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB international, Wallingford, pp. 186-202.
- Nicholson, R.L., Butler, L.G. & Asquith, T.N.** (1986) Glycoproteins from *Colletotrichum graminicola* that bind phenols: implications for survival and virulence of phytopathogenic fungi. *Phytopathology*, **76**, 1315-1318.
- Nicholson, R.L. & Epstein, L.** (1991) Adhesion of fungi to the plant surface. In Cole and Hoch (eds.), *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Plenum Press, New York, pp. 3-23.

- Nicholson, R.L. & Moraes, W.B.C.** (1980) Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. *Phytopathology*, **70**, 255-261.
- Nicole, M. & Benhamou, N.** (1991) Ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Rigidoporus lignosus*, the white-rot fungus of rubber tree roots. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **39**, 415-431.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **78**, 449-460.
- Nürnbergger, T., Wirtz, W., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., Jabs, T., Zimmermann, S. & Scheel, D.** (1997) Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *Journal of Recept Signal Transduction Research*, **17**, 127-136.
- O'Connell, R.J. & Bailey, J.A.** (1991) Hemibiotrophy in *Colletotrichum lindemuthianum*. In Mendgen and Sesemann (eds.), *Electron Microscopy of Plant Pathogens*. Springer-Verlag, Berlin, pp. 211-222.
- O'Connell, R.J., Nash, C. & Baily, J.A.** (1992) Lectin cytochemistry: a new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In Bailey and Jeger (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, Wallingford, pp. 67-87.
- O'Connell, R.J. & Ride, J.P.** (1990) Chemical detection and ultrastructural localization of chitin in cell walls of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **37**, 39-53.
- Osbourn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.
- Pain, N.A., Green, J.R., Gammie, F. & O'Connell, R.J.** (1994) Immunomagnetic isolation of viable intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. from infected bean leaves using a monoclonal antibody. *The New Phytologist*, **127**, 223-232.
- Panaccione, D.G., McKiernan, M. & Hanau, R.M.** (1988) *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous Benomyl-resistance genes retains expected pathogenicity to corn. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **1**, 113-120.
- Pascholati, S.F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D. & Nicholson, R.L.** (1993) Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **42**, 37-51.

- Pérez-García, A., Snoeijers, S.S., Joosten, M.H.A.J., Goosen, T. & De Witt, 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.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J. & Green, J.R.** (1999) *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 186-98.
- Politis, D.J. & Wheeler, H.** (1973) Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. *Physiological Plant Pathology*, **3**, 465-471.
- Rasmussen, J.B. & Hanau, R.M.** (1989) Exogenous scytalone restores appressorial melanization and pathogenicity in albino mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **11**, 349-352.
- Rasmussen, J.B., Panaccione, D.G., Fang, G.C. & Hanau, R.M.** (1992) The PYR1 gene of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*: selection by intraspecific complementation and sequence analysis. *Molecular and General Genetics*, **235**, 74-80.
- Redman, R.S. & Rodriguez, R.J.** (1994) Factors affecting the efficient transformation of *Colletotrichum* species. *Experimental Mycology*, **18**, 230-246.
- Reese, M.G. & Eeckman, F.H.** (1995) Novel Neural Network Algorithms for Improved Eukaryotic Promoter Site Recognition. In Regency, H. (ed.) *The seventh international Genome sequencing and analysis conference*, Hilton Head Island, South Carolina.
- Ren, Y.-Y. & West, C.A.** (1992) Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology*, **99**, 1169-1178.
- Ride, J.P. & Barber, M.S.** (1990) Purification and characterization of multiple forms of endochitinase from wheat leaves. *Plant Science*, **71**, 185-197.
- Roby, D., Gadelle, A. & Toppan, A.** (1987) Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants. *Biochem Biophys Res Commun*, **143**, 885-92.
- Rodriguez, R.J. & Redman, R.S.** (1992) Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum*. In Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (eds.), *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. CAB International, pp. 47-66.
- Rodriguez, R.J. & Yoder, O.C.** (1987) Selectable genes for transformation of the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Gene*, **54**, 73-81.

- Rohringer, R., Kim, W.K., Samborski, D.J. & Howes, N.K.** (1977) Calcofluor: An optical brightener for fluorescence microscopy of fungal plant parasites in leaves. *Phytopathology*, **67**, 808-810.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the U.S.A* **74**, 5463-5467.
- Schoffemeer, E.A.M., Klis, F.M., Sietsma, J.H. & Cornelissen, B.J.C.** (1999) The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, **27**, 275-282.
- Schuller, C., Brewster, J.L., Alexander, M.R., Gustin, M.C. & Ruis, H.** (1994) The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *Embo Journal*, **13**, 4382-9.
- Schüßler, A., Schnepf, E., Mollenhauer, D. & Kluge, M.** (1995) The fungus bladders of the endocyanosis *Geosiphon pyriforme*, a *Glomus*-related fungus: cell wall permeability indicates a limiting pore radius of only 0,5 nm. *Protoplasma*, **185**, 131-139.
- Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Vloemans, S.A., Melchers, L.S., Van den Elzen, P.J.M. & Cornelissen, B.J.C.** (1993) Only specific tobacco chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology*, **101**, 857-863.
- Sentandreu, R., Mormeneo, S. & Ruiz-Herrera, J.** (1994) Biogenesis of the fungal cell wall. In Wessels, J.G.H. and Meinhardt, F. (eds.), *Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. I, pp. 111-124.
- Siegrist, J. & Kauss, H.** (1990) Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **36**, 267-275.
- Siegrist, J. & Kauss, H.** (1993) Purification and immunological characterization of chitin deacetylase from the cucumber pathogen *Colletotrichum lagenarium*. In Fritig, B. and Legrand, M. (eds.), *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 83.
- Sietsma, J.H. & Wessels, J.G.H.** (1994) Apical wall biogenesis. In Wessels, J.G.H. and Meinhardt, F. (eds.), *Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. I, pp. 125-141.
- Stephenson, S.-A., Hatfield, J., Rusu, A.G., Maclean, D.J. & Manners, J.M.** (2000) *CgDN3*: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary

- to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **13**, 929-941.
- Talbot, N.J., McCafferty, H.R.K., Ma, M., Moore, K. & Hamer, J.E.** (1997) Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**, 179-195.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., Penalva, M.A. & Arst, H.N.J.** (1995) The Aspergillus PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *Embo Journal*, **14**, 779-790.
- Tokuyasu, K., Kaneko, S., Hayashi, K. & Mori, Y.** (1999 a) Production of a recombinant chitin deacetylase in the culture medium of *Escherichia coli* cells. *FEBS Letters*, **458**, 23-26.
- Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M. & Hayashi, K.** (1996) Purification and characterization of extracellular chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **60**, 1598-1603.
- Tokuyasu, K., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K. & Mori, Y.** (1999 b) Cloning and Expression of Chitin Deacetylase Gene from a Deuteromycete, *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **87**, 418-423.
- Tokuyasu, K., Ono, H., Ohnishi-Kameyama, M., Hayashi, K. & Mori, Y.** (1997) Deacetylation of chitin oligosaccharides of dp 2-4 by chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Carbohydrate Research*, **303**, 353-358.
- Trudel, J. & Asselin, A.** (1989) Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **178**, 362-6.
- Trudel, J. & Asselin, A.** (1990) Detection of chitin deacetylase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, **189**, 249-53.
- Tsigos, I. & Bouriotis, V.** (1995) Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 26286-91.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D. & Bouriotis, V.** (2000) Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Tibtech*, **18**, 305-312.
- Tsigos, I., Zydowicz, N., Martinou, A., Domard, A. & Bouriotis, V.** (1999) Mode of action of chitin deacetylase from *Mucor rouxii* on N-acetylchitooligosaccharides. *European Journal of Biochemistry*, **261**, 698-705.

- Vaillancourt, L.J. & Hanau, R.M.** (1994) Cotransformation and targeted gene inactivation in the maize anthracnose fungus, *Glomerella graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 3890-3893.
- Van den Ackerveken, G.F., Dunn, R.M., Cozijnsen, A.J., Vossen, J.P., Van den Broek, H.W. & De Wit, P.J.D.M.** (1994) Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene *Avr9* in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular and General Genetics*, **243**, 277-285.
- Van Lammeren, A.A.M., Keijzer, C.J., Willemse, M.T.M. & Kieft, H.** (1985) Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria verrucosa* (Mill.) H Duval. *Planta*, **165**, 1-11.
- Vander, P. & Moerschbacher, B.M.** (1993) Chitin oligomers produced by HF-solvolysis induce resistance reactions in higher plants. In Muzarelli, R.A.A. (ed.) *Chitin Enzymology*. Alda Tecnografica, Italy, pp. 437-440.
- Vander, P., Varum, K.M., Domard, A., El Gueddari, N.E. & Moerschbacher, B.M.** (1998) Comparison of the Ability of Partially N-Acetylated Chitosans and Chitooligosaccharides to Elicit Resistance Reactions in Wheat Leaves. *Plant Physiology*, **118**, 1353-1359.
- Werner, S.** (1997) Biochemische Untersuchungen an Chitin Deacetylase des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* (Teleomorph: *Glomerella graminicola*). *Fakultät für Biologie*. Universität Konstanz, Konstanz.
- Werner, S.** (2001) Untersuchungen zur Regulation und Bedeutung der Chitin-Synthese beim Maispathogen *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS. (Teleomorph: *Glomerella graminicola* POLITIS). *Fakultät Biologie*. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale, p. 124.
- Wessels, J.G.H.** (1993) Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *New Phytologist*, **123**, 397-413.
- Wessels, J.G.H.** (1994) Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 413-437.
- Wessels, J.G.H. & Sietsma, J.H.** (1981) Fungal cell walls: a survey. In Tanner, W. and Loewus, F.A. (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series*. Springer-Verlag, Berlin, Vol. 13 B, pp. 352-394.
- White, R.F., Rybicki, E.P., von Wechmar, M.B., Dekker, J.L. & Antoniw, J.F.** (1987) Detection of PR-1 type proteins in Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Gramineae, and Solanaceae by immunoblotting. *Journal Genetic Virology*, **68**, 2043-2048.

-
- Wilson, G.W.** (1914) The identity of the anthracnose of grasses in the United States. *Phytopathology*, **4**, 106-112.
- Wolkow, P.M., Sisler, H.D. & Vigil, E.L.** (1983) Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, **23**, 55-71.
- Wu, S., Kriz, A.L. & Widholm, J.M.** (1994) Molecular analysis of two cDNA clones encoding acidic class I chitinase in maize. *Plant Physiology*, **105**, 1097-1105.
- Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. & Akatsuka, T.** (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **57**, 405-409.
- Zaragoza, O., Rodríguez, C. & Gancedo, C.** (2000) Isolation of MIG1 gene from *Candida albicans* and effects of its disruption on catabolite repression. *Journal of Bacteriology*, **2000**, 320-326.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. & Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **94**, 2751-2755.

VII Anhang

1. Zusammensetzung von *Colletotrichum*-Nährmedien

Haferflockenagar

50 g Haferflocken werden mit 500 ml H₂O_{dest} in einem Mixer sechsmal für 20 sec auf höchster Stufe zerkleinert. 12 g Agar-Agar werden mit 500 ml H₂O_{dest} in der Mikrowelle erhitzt, bis der Agar komplett gelöst ist. Beides wird gemischt und mindestens 30 min autoklaviert.

Komplettmedium

Für die Stammlösung A werden 50 g Ca(NO₃)₂ in 500 ml H₂O_{dest} gelöst. Für die Stammlösung B werden 10 g KH₂PO₄, 12,5 g MgSO₄ und 2,7 g NaCl in 500 ml H₂O_{dest} gelöst. Beide Lösungen werden nicht autoklaviert.

Für das Komplettmedium werden je 10 ml der Lösungen A und B, 10 g Glucose, 1 g Hefeextrakt und 1 g Caseinhydrolysat (Difco Laboratories, Augsburg) in H₂O_{dest} in einem Gesamtvolumen von 1 Liter gelöst und autoklaviert.

Zum Gießen von festen Nährböden wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugegeben.

Regenerations- und Selektionsmedium für Transformation

Das Regenerationsmedium enthält 1 M Saccharose, 0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,1 % (w/v) Caseinhydrolysat und 1,5 % (w/v) Agar-Agar. Zur Selektion im Anschluss an die Transformation werden 400 µg/ml, für die weitere Kultivierung der Transformanten 100 µg/ml Hygromycin B als sterile Lösung (Roche Diagnostics, Mannheim) nach dem Autoklavieren bei 40°C zugegeben.

2. Primer

Nachfolgend aufgeführt sind die Sequenzen aller Oligonukleotide, die bei PCR-Reaktionen oder Sequenzierungen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Die Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert.

A, G, C und T stehen für die Basen Adenin, Guanidin, Cytosin und Thymidin. I steht für Inositol. Einige Primer sind an mehreren Stellen degeneriert. Dabei gilt: R = A oder G; Y = C oder T; M = A oder C; D = A, G oder T und N = A, G, C oder T.

Standardprimer

M13 (-21)	5' - GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3'
M13 reverse	5' - CAG GAA ACA GCT ATG AC - 3'
T7	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'
pUC18	5' - GTC GAC CTG CAG GCA TGC AAG - 3'
Ptrp	5' - AAT GTC CTC GTT CCT GTC TGC - 3'

Primer der Hygromycin B - Resistenzkassette

hph1	5' - AGC TGC GCC GAT GGT TTC TAC AA - 3'
hph2	5' - GCG CGT CTG CTG CTC CAT ACA A - 3'
hph3	5' - AGC TGC GCC GAT GGT TTC TAC - 3'
hph4	5' - GCT TCT GCG GGC GAT TTG TG - 3'

degenerierte Primer der ersten Klonierungsversuche

CDA-SM-1A	5' - AC I T (AT) (CT) GA (CT) GA (CT) GG (AGCT) CC - 3'
CDA-SM-3A	5' - (AT) (GC) I CA (CT) AC I TGG (AT) (GC) (AGCT) CA (CT) - 3'
CDA-SM-4A	5' - CC (AG) TA (ACGT) GGI GGI C (GT) (AGC) (AC) - 3'
CDA-SM-5A	5' - CCA (AG) TC (AG) (AT) (AC) IGT (AG) TC I (AT) (AG) (AG) - 3'

Primer für die Chitindeacetylase von *C. lindemuthianum*

CDA-C.lind.-1	5' - CAG GTT CCC GTG GGC ACA CC - 3'
CDA-C.lind.-2	5' - CGC CTT GTA CCA GTT CTC C - 3'
CDA-C.lind.-3	5' - CTG ACC TAC GAC GAC GGT CC - 3'
CDA-C.lind.-4	5' - GTC CTT GGT GTC GAG GTT GG - 3'

Primer für die Chitinacetylase1 von *C. graminicola*

CDA-C.gr.-1	5' - CGC GCT CCA TCA CAG CAG CC - 3'
CDA-C.gr.-2	5' - GGA CTT GTA CCA GTT CTC GGG GGC - 3'
CDA-C.gr.-3	5' - CTC ACT TAC TAC CAA GAC TTC GCC G - 3'
CDA-C.gr.-4	5' - TCC GGC CGG GCT TAG GAC TTG TAC C - 3'
CDA-C.gr.-R1	5' - CAG TGA CCG GGA AAG TCA GTG GG - 3'
CDA-C.gr.-R2	5' - TCG ACA CCC ZCA AGG CTA GGG G - 3'
CDA-C.gr.-R3	5' - GTA CGG CGA AAG GGC ATG GC - 3'
CDA-C.gr.-R4	5' - GGC GTC ATG ATG TCT TGG C - 3'
CDA-C.gr.-R5	5' - CGT CGA CGG AAA TCG ACT CTC G - 3'
CDA-C.gr.-S1	5' - CTG CGT CAT CTG AGC GAT GCG - 3'
CDA-C.gr.-S2	5' - CGG TAC ATG CGC ACG CCC TAC C - 3'
CDA-P-Age	5' - GTA CGT GTG GGA ACC GGT GAG ATG - 3'
CDA-P-EcoRI	5' - AGA ATT CTT CCA GTC AGC TGT CAG C - 3'
CDA-P-XbaI	5' - CCG TTT TAT CTA GAG TCG TTC GC - 3'
CDA-P-NcoI	5' - GAC GCC ATG GCC TCG TCC TTC ATG - 3'

3. Anmerkungen zur Schreibweise

Englische Begriffe wurden, wo immer es möglich und sinnvoll erschien, übersetzt. Zum Teil wurden jedoch Ausdrücke aus dem Englischen übernommen, wenn diese treffender erschienen oder dem Verständnis der Abkürzungen dienten. Fremdsprachige Begriffe wurden in der Regel in kursiver Schrift dargestellt.

Bezeichnungen für Gene wurden groß und kursiv geschrieben (z. B. *CgCda1*), die dazugehörigen Proteine groß und nicht-kursiv (z. B. CgCda1). Mutierte oder inaktivierte Gene erscheinen klein und kursiv, wobei Deletionen durch ein vorgestelltes Δ zum Ausdruck gebracht wurden (z. B. $\Delta Cgcdal$).

Um eine bessere Lesbarkeit zu erreichen, wurden zahlreiche Abkürzungen verwendet. Die wichtigsten sind im folgenden Kapitel zusammengefasst.

4. Abkürzungsverzeichnis

as	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ap	Appressorium
BCIP	5-bromo-4-chlooro-3-indolyl-phosphate
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CaCl ₂	Calciumchlorid
CDA	Chitindeacetylase
cDNA	komplementäre DNA
CgCda1	Chitindeacetylase1 von <i>Colletotrichum graminicola</i>
CSPD	Dinatriummethoxyspirotricyclophenylphosphat
C-terminal	Carboxyterminal
CuCl ₂	Kupfer(II)chlorid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DIG-dUTP	DIG-desoxyUridintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxyNukleotidtriphosphat
dATP	desoxyAdenosintriphosphat
dCTP	desoxyCytidintriphosphat
dGTP	desoxyGuanosintriphosphat
dTTP	desoxyThymidintriphosphat
DP	Polymerisationsgrad
Dpi	Tage nach Inokulation
E	Epidermiszelle
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FITC	Fluorescein-5(6)-isothiocyanat
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GAR-FITC	<i>goat anti rabbit</i> FITC
GFP	grünes fluoreszierendes Protein
GlcA	Acetylglucosamin

GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Gldpkt.	Gliederungspunkt
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
H ₂ O _{bide}	doppelt destilliertes Wasser
Hy	intrazelluläre Hyphe
Hyg ^R / Hygr	Hygromycin-Resistenz(kassette)
IPTG	Isopropyl β-D-thiogalacto-pyranosid
Iv	Infektionsvesikel
kb	kiloBasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
Ko	Konidie
KS	Keimschlauch
LB / LB _{amp}	Luria-Bertani-Medium / mit Ampicillin
LRW	LR White
M / mM	Molar / Millimolar
mA	Milliampere
max.	maximal
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpho-lino)ethane-sulfonsäure
mg	Milligramm
μg	Mikrogramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
MPa	Megapascal
Mr	Molekulargewicht
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N-acetyliert	Aminoacetyliert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitro blue tetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	Aminoterminal
OD ₆₀₀	optische Dichte bei λ = 600 nm
ORF	<i>open reading frame</i>

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniumlyase
PBS	<i>phosphat buffer saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG X000	Polyethylenglykol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von X000 g mol ⁻¹
PR	<i>pathogenesis related</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR (s.o.) mit vorhergehender reverser Transkription
s.	siehe
SAP	Shrimps Alkalische Phosphatase
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Sp	Spore
STC	Sorbitol-Tris-CaCl ₂ -Puffer
TBS	<i>tris buffer saline</i>
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR-Puffer	<i>template suppression reagent</i>
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
TxRed	Texas-Red
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VSC	<i>vesicle supply center</i>
v/v	Volumenprozent
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
WF	extrazelluläre Waschflüssigkeit
Wt	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galacto-pyranosid
z. B.	zum Beispiel
ZW	Zellwand

5. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung I.1:</i> Katalytische Wirkung der Chitindeacetylase; verändert nach (Tsigos <i>et al.</i> , 2000).....	6
<i>Abbildung II.1:</i> Aufbau der Transfereinheit (nach Brown (1999)).....	21
<i>Abbildung II.2:</i> Aufbau des Transfersystems (nach (Kyhse-Andersen, 1984)).....	36
<i>Abbildung III.1:</i> Promotor-GFP-Konstrukt des Chitindeacetylase1-Gens von <i>C. graminicola</i>	44
<i>Abbildung III.2:</i> Knock-out Konstrukt des Chitindeacetylase1-Gens von <i>C. graminicola</i>	45
<i>Abbildung III.3:</i> Nukleotidsequenz des Chitindeacetylase1-Gens (<i>CgCda1</i>) aus <i>C. graminicola</i> und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz.....	49
<i>Abbildung III.4:</i> Phylogenetischer Baum der Chitindeacetylasen unter Einordnung der sequenzierten Chitindeacetylase1 von <i>C. graminicola</i>	50
<i>Abbildung III.5:</i> Schematische Darstellung der Proteinstruktur und der Polysaccharid Deacetylase Strukturdomäne der Chitindeacetylase1 in <i>C. graminicola</i>	51
<i>Abbildung III.6:</i> RT-PCR mit spezifischen Primern für das Chitindeacetylase1-Gen unterschiedlicher Differenzierungsstadien von <i>C. graminicola</i>	52
<i>Abbildung III.7:</i> RT-PCR mit spezifischen Primern für das Chitindeacetylase1-Gen von <i>C. graminicola</i> auf inokuliertem Blattmaterial.....	52
<i>Abbildung III.8:</i> Nachweis der Chitindeacetylase1 von <i>C. graminicola</i> im Western Blot.....	53
<i>Abbildung III.9:</i> GFP-Expression in primären Hyphen von <i>C. graminicola</i> unter Kontrolle des GAPDH-Promotors auf der Cuticula inokulierter Maisblätter.....	54
<i>Abbildung III.10:</i> RT-PCR mit spezifischen Primern für das Chitindeacetylase1-Gen von <i>C. graminicola</i>	55
<i>Abbildung III.11:</i> Genomischer Southern-Blot der verschiedenen PilzTransformanten.....	56
<i>Abbildung III.12:</i> Chitindeacetylase-Isoformen im Substrat-SDS-PAGE.....	57

<i>Abbildung III.13:</i> Morphologie der Transformanten auf Haferflockenmedium.....	58
<i>Abbildung III.14:</i> Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i>	59
<i>Abbildung III.15:</i> Virulenztest mit $\Delta Cgcdal$ -Transformanten unter Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen.....	59
<i>Abbildung III.16:</i> Virulenztest mit $\Delta Cgcdal$ -Transformanten auf unterschiedlichen Maiskultivaren.....	60
<i>Abbildung III.17:</i> Immunmarkierung der <i>in vivo</i> -differenzierten Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i> mit Chitosan-Gold.....	63
<i>Abbildung III.18:</i> Immunmarkierung der <i>in vivo</i> -differenzierten Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i> mit Gold-markiertem WGA	64
<i>Abbildung III.19:</i> Immunmarkierung der <i>in vivo</i> –differenzierten Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i> mit Chitosan-Gold und Gold-markiertem WGA.....	65
<i>Abbildung III.20:</i> Fluoreszenzmarkierung der <i>in vivo</i> -differenzierten Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i>	66
<i>Abbildung III.21:</i> Spezifische Fluoreszenzmarkierung der <i>in vitro</i> -differenzierten Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i>	68
<i>Abbildung IV.1:</i> Sequenzhomologien auf Aminosäureebene verschiedener Organismen; nach Tsigos (2000) verändert.....	77

6. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle III.1:</i> Promotorelemente im 5'-untranslatierten Bereich des Chitinacetylase1-Gens von <i>C. graminicola</i>	47
<i>Tabelle III.2:</i> Gehalt an Zuckermonomeren in den Zellwänden verschiedener <i>CgCda1</i> -Transformanten und des Wildtyps.....	70
<i>Tabelle VI.1:</i> Biochemische Charakteristik der Chitinacetylase verschiedener Pilze; nach (Tsigos <i>et al.</i> , 2000) verändert und ergänzt.....	75
<i>Tabelle IV.2:</i> Vergleich der Anzahl möglicher Bindestellen für regulatorische Promotorelemente verschiedener Chitinacetylase.....	80
<i>Tabelle IV.3:</i> Vorhandensein von Chitin und Chitosan in Infektionsstrukturen von <i>C. graminicola</i>	91