

"Die Sfp-4'-Phosphopantetheinyltransferase CgPPT1 des Maispathogens
Colletotrichum graminicola (Ces.) Wilson aktiviert Pathogenitätsfaktoren"

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. nat.

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Dipl. Biol. Ralf Horbach

geb. am: 05.11.1977 in: Karl-Marx-Stadt

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Holger B. Deising
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Prof. Dr. Erika Kothe

Halle (Saale), 17.03.2010

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis	XIII
Anmerkungen zur Schreibweise	XIV

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
I	Einleitung	1
I.1	Biologie von <i>Colletotrichum graminicola</i>	1
I.2	Vorkommen, Systematik und katalytische Aktivität der PPTasen	5
I.3	Nichtribosomale Peptidsynthasen	10
I.3.1	Vorkommen, Struktur und katalytische Aktivität der NRPS	10
I.3.2	NRPS als Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze	12
I.4	Polyketidsynthasen	16
I.4.1	Vorkommen, Struktur und katalytische Aktivität der PKS	16
I.4.2	PKS als Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze	19
I.5	PKS/NRPS-Hybride	22
I.6	Ziel der Arbeit	25
II	Material und Methoden	26
II.1	Biologisches Material	26
II.1.1	Pilzisolat	26
II.1.1.1	<i>Colletotrichum graminicola</i>	26
II.1.1.2	<i>Magnaporthe oryzae</i>	26
II.1.2	Pflanzenmaterial	27
II.1.2.1	<i>Zea mays</i>	27
II.1.2.2	<i>Allium cepa</i>	27
II.1.2.3	<i>Oryza sativa</i>	27
II.1.3	Bakterienkultur	28
II.1.3.1	<i>Escherichia coli</i>	28
II.1.3.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	29
II.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	29
II.2.1	Nährmedien, Puffer und Lösungen	30
II.2.1.1	Nährmedien	30
II.2.1.2	Puffer	33
II.2.1.3	Lösungen	39
II.2.2	Vektoren	43
II.2.3	Oligonukleotide	47
II.2.3.1	<i>CgPPT1</i> -Primer	47
II.2.3.2	<i>MoPPT1</i> -Primer	47
II.2.3.3	<i>CgPKS1</i> -Primer	48
II.2.3.4	<i>CgAAR</i> -Primer	48
II.2.3.5	allgemeine Primer	49
II.3	Infektions- und Wachstumsversuche	49
II.3.1	Pflanzeninfektion	49
II.3.1.1	Gewinnung von Konidien	49

II.3.1.2	Einstellen der Konidienkonzentration	50
II.3.1.3	Maisinokulation	50
II.3.1.4	Phytotoxizitätstest	51
II.3.1.5	Zwiebelinokulation	52
II.3.1.6	Reisinokulation	52
II.3.1.7	Cytorrhizie	52
II.3.2	Wachstumsversuche	53
II.4	Molekularbiologische Methoden	53
II.4.1	Präparation von Nukleinsäuren	53
II.4.1.1	Präparation genomischer DNA	53
II.4.1.2	Präparation von Plasmid-DNA	54
II.4.1.3	Präparation von Gesamt-RNA	55
II.4.2	Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	57
II.4.2.1	DNA-Elektrophorese	57
II.4.2.2	RNA-Elektrophorese	57
II.4.3	Southern-Hybridisierung	58
II.4.3.1	Herstellung von Sonden	58
II.4.3.2	Southern-Blot	58
II.4.3.2.1	Restriktion und Gelelektrophorese	58
II.4.3.2.2	Transfer	59
II.4.3.2.3	Hybridisierung	59
II.4.3.2.4	Nachweis der gebundenen Sonde	59
II.4.4	PCR	60
II.4.4.1	Standard-PCR	60
II.4.4.2	DJ-PCR	61
II.4.4.3	RT-PCR	63
II.4.4.4	quantitative PCR	63
II.4.4.5	Genome Walking	65
II.4.5	Klonierung	66
II.4.5.1	Generierung von DNA-Fragmenten	66
II.4.5.2	Restriktionsverdau	66
II.4.5.3	Ligation und Dephosphorylierung	67
II.4.5.4	Transformation von <i>E. coli</i>	67
II.4.5.4.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	67
II.4.5.4.2	Elektroporation	68
II.4.5.4.3	Selektion	68
II.4.5.5	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	69
II.4.5.5.1	Herstellung chemisch kompetenter Zellen	69
II.4.5.5.2	Transformation und Selektion	69
II.4.5.6	Kolonie-PCR	70
II.4.6	Protoplastentransformation	70
II.4.6.1	Gewinnung von Protoplasten	70
II.4.6.2	Transformation und Selektion	71
II.4.6.3	Gewinnung von Einzelsporisolaten	71
II.4.7	<i>A. tumefaciens</i> vermittelte Transformation von <i>M. oryzae</i>	71
II.4.7.1	Gewinnung von Konidien	71
II.4.7.2	Transformation und Selektion	72
II.4.8	Deletionsstrategien	72
II.4.8.1	Inaktivierung und Komplementation von <i>CgPPT1</i>	72
II.4.8.2	Inaktivierung und Komplementation von <i>CgPKSI</i>	73
II.4.8.3	Inaktivierung von <i>CgAAR</i>	74

II.4.8.4	Inaktivierung von <i>MoPPT1</i>	75
II.4.9	<i>eGFP</i> -Fusionen	75
II.4.9.1	<i>CgPPT1:eGFP</i>	75
II.4.9.2	<i>CgPKSI:eGFP</i>	76
II.4.10	Sequenzierung und Sequenzanalyse	76
II.4.10.1	Sequenzierreaktion und Probenvorbereitung	76
II.4.10.2	Sequenzierung und Analyse der Daten	77
II.4.11	Expression rekombinanter Proteine	78
II.4.11.1	Expressionsstrategie	78
II.4.11.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	78
II.4.11.3	Zellaufschluss	79
II.4.11.4	Proteinreinigung	79
II.4.12	<i>in vitro</i> 4'-Phosphopantetheinylierung	80
II.4.12.1	Phosphopantetheinylierungsreaktion	80
II.4.12.2	SDS-Gelelektrophorese	80
II.4.12.3	Detektion markierter Reaktionsprodukte	80
II.5	Metabolitanalytik	81
II.5.1	Fermentation und Extraktion	81
II.5.1.1	Fermentation von <i>C. graminicola</i>	81
II.5.1.2	Herstellung von Extrakten aus Kulturüberständen	81
II.5.2	Chromatographie und Strukturaufklärung	82
II.5.2.1	Adsorptionchromatographie	82
II.5.2.2	Präparative HPLC	82
II.5.2.3	Analytische HPLC und HPLC/MS	83
II.5.2.4	Identifizierung von Metaboliten	84
II.6	Dokumentation	84
II.6.1	Mikroskopie	84
II.6.1.1	Lichtmikroskopie	84
II.6.1.2	Fluoreszenzmikroskopie	85
II.6.1.3	Färbetechniken	85
II.6.2	Photographie und Bildbearbeitung	86
II.6.3	Statistik	86
III	Ergebnisse	87
III.1	Charakterisierung von <i>CgPPT1</i>	87
III.1.1	Expression von <i>CgPPT1</i>	87
III.1.2	<i>in vitro</i> 4'-Phosphopantetheinylierung	90
III.1.3	Inaktivierung von <i>CgPPT1</i>	92
III.1.3.1	Deletionsmutagenese	92
III.1.3.2	Wachstumsversuche und Siderophorproduktion	93
III.1.3.3	Konidienmorphologie und Keimraten	95
III.1.3.4	Appressoriendifferenzierung	97
III.1.3.5	Pflanzeninfektion und <i>in vivo</i> Sporulation	98
III.1.4	Metabolitanalyse	103
III.2	Untersuchungen zur Bedeutung der <i>Magnaporthe oryzae</i> Sfp-PPTase-Gens <i>MoPPT1</i>	105
III.3	Charakterisierung des <i>Colletotrichum graminicola</i> α -Aminoacidipat-Reduktase-Gens <i>CgAAR</i>	107
III.4	Charakterisierung des <i>Colletotrichum graminicola</i> Melaninsynthase-Gens <i>CgPKSI</i>	110

III.4.1	Struktur von <i>CgPKS1</i>	110
III.4.2	Expression des <i>CgPKS1:eGFP</i> -Reporterkonstrukts	111
III.4.3	Inaktivierung von <i>CgPKS1</i>	114
III.4.3.1	Insertionsmutagenese	114
III.4.3.2	phänotypische Charakterisierung von $\Delta Cgpksl$	115
III.5	Cytorrhizie	122
IV	Diskussion	124
IV.1	<i>Colletotrichum graminicola</i> als Modellorganismus	124
IV.2	<i>C. graminicola</i> ist ein landwirtschaftlicher Schaderreger mit erheblicher ökonomischer Bedeutung	125
IV.3	Sfp-Typ 4'-Phosphopantetheinyltransferasen als Pathogenitätsdeterminanten filamentöser Ascomyceten	126
IV.3.1	PPTasen aktivieren Enzyme des Sekundärmetabolismus	126
IV.3.2	Charakterisierung von <i>CgPPT1</i>	127
IV.3.2.1	Isolierung, Expressionsanalyse und <i>in vitro</i> 4'-Phosphopantetheinylierung	127
IV.3.2.2	Deletionsmutagenese und phänotypische Charakterisierung	129
IV.3.3	Deletion der <i>M. oryzae</i> Sfp-PPTase	132
IV.4	Metabolitanalyse	133
IV.4.1	Metabolite aus Ascomyceten der Gattung <i>Colletotrichum</i>	133
IV.4.2	Metabolite aus <i>Colletotrichum graminicola</i>	134
IV.4.3	Phytotoxizitätstests	141
IV.5	Untersuchungen zur Funktion PP-abhängiger Enzyme	142
IV.5.1	Untersuchungen zur Bedeutung von CgAAR	142
IV.5.2	Untersuchungen zur Bedeutung von CgPKS1	144
IV.6	PPTasen als Wirkort fungizider Verbindungen und Entwicklung eines Inhibitor-Assays	148
V	Zusammenfassung	152
VI	Literatur	154
VII	Anhang	180

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenylierungsdomäne, Acyltransferasedomäne
AAL-Toxin	<i>Alternaria alternata</i> -Toxin
AAR	Aminoacidat-Reduktase
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
ACE1	Avirulence Conferring Enzyme1 aus <i>M. grisea</i>
<i>A. cepa</i>	<i>Allium cepa</i>
AcN	Acetonitril
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AcpS	Acyl-Carrier-Protein-Synthase
ad	lat.: zu
AD	Adenylierungsdomäne
ADP	Adenosindiphosphat
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. gambiae</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
AgeI	Restriktionsendonuklease aus <i>Ruegeria gelatinovorans</i>
AIM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Induktionsmedium
α -LacZ	Fragment der β -Galaktosidase
ALT1	PKS für AAL-Toxinsynthese
AM	<i>Alternaria mali</i>
amp	Ampicillin
AMT	Gen für AM-Toxin-Sythese in <i>Alternaria alternata</i>
<i>amyB</i>	AmylaseA-Gen aus <i>Aspergillus oryzae</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
ANOVA	Analysis of Variance
<i>argB</i>	Argininsynthesegen aus <i>Aspergillus nidulans</i>
As	Aminosäure(n)
AT	Acyl-/Aryltransferasedomäne
ATG	Startcodon für Translation
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> mediated transformation
ATP	Adenosintriphosphat
BASF	Badische Anilin- und Sodafabrik
BD	Becton Dickinson
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BM	Beladungsmodul
bp	Basenpaare
BPS	Bathophenanthrolindisulfonat
BSA	Bovine Serum Albumine
<i>Bsp119I</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus spec.</i> RFL119
<i>BsuI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
C	Kondensationsdomäne

°C	Grad Celsius
CA	Celluloseacetat
CaCl ₂	Calciumchlorid
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
Ca(NO ₃) ₂	Calciumnitrat
cDNA	copy/complementary DNA
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>CgCHSII</i>	Chitinsynthase II-Gen aus <i>C. graminicola</i>
<i>CgGpd</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gen aus <i>C. graminicola</i>
CgM2	<i>Colletotrichum graminicola</i> Isolat M2
CgPKS1	Polyketidsynthase 1 aus <i>Colletotrichum graminicola</i> (Protein)
<i>CgPKS1</i>	Polyketidsynthase 1 aus <i>Colletotrichum graminicola</i> (Gen)
CgPPT1	Sfp-PPTase aus <i>Colletotrichum graminicola</i> (Protein)
<i>CgPPT1</i>	Sfp-PPTase aus <i>Colletotrichum graminicola</i> (Gen)
CM	Complete Medium
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CMM	Complete Medium Magnaporthe
CoA	Coenzym A
CoA-Biotin	biotinyliertes CoA
CoA-488	CoA mit Fluorophore Atto-488
CoCl ₂	Kobaltchlorid
cop	Coprogen
CSPD	Dinatriummethoxy Spirotriccyclophenylphosphat
C _T	Threshold Cycle, qPCR
CTB1	PKS für Cercosporinsynthese in <i>Cercospora nicotianae</i>
CuSO ₄	Kupfersulfat
d	Tag(e)
$\Delta Cgaar$	<i>CgAAR</i> -Deletionsmutante
$\Delta CgpkS1$	<i>CgPKS1</i> -Deletionsmutante
$\Delta Cgppt1$	<i>CgPPT1</i> -Deletionsmutante
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEBS	6-Deoxyerythronolid B-Synthase
DEC1	Decarboxylase1, Enzym der T-Toxinsynthese
DHN	1,8-Dihydroxynaphtalen
DH	Dehydratasedomäne
d. h.	dass heißt
DIG-dUTP	Digoxigenin-desoxyuridinyltriphosphat
DHN	1,8-Dihydroxynaphtalen
DJ-PCR	Double-Joint PCR
$\Delta lys5$	<i>S. cerevisiae Lys5</i> -Deletionsmutante
$\Delta Moppt1$	<i>MoPPT1</i> -Deletionsmutante
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

DOPA	<i>L</i> -3,4-Dihydroxyphenylalanin
DTT	Dithiothreitol
E	Epimerisierungsdomäne
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco47IR</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>E. coli</i>
<i>Eco8II</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>E. coli</i>
<i>EcoRI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>E. coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
efPKS1	PKS für Elsinochromsynthese in <i>Elsinoë fawcettii</i>
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ekt	Isolat mit ektopischer Integration
ER	Enoylreduktasedomäne
et al.	<i>et alii</i> , lat.: und andere
e. V.	eingetragener Verein
Fab	Fragment antigen-binding
FAS	Fatty Acid Synthase
FeSO ₄	Eisensulfat
FS	Fettsäure
FUM1	PKS für Fumonisin synthese
fw	forward
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
gDNA	genomische DNA
GE	General Electric
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Stunde(n)
H ₃ BO ₃	Borsäure
H ₃ BO ₄	Perborsäure
HC	<i>Helminthosporium carbonum</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
Hess.	hessisch
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
(His) ₆	Histidin-Tag
HL	Hiload
Hm1	HC-Reduktase aus <i>Z. mays</i>
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{bidest}	entionisiertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HP	High Performance
<i>hph</i>	Hygromycin-Phosphotransferase-Gen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HT	HisTrap
Hyg	Hygromycin

IBWF	Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung
IES	Indol-3-essigsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K	Kalium
kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar(e)
KCL	Kaliumchlorid
KD	Kondensationsdomäne
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₃	Kaliumdihydrogenphosphit
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KO	Knock-out
KOH	Kaliumhydroxid
KOM	genetisch komplementiertes Isolat
KR	Ketoreduktasedomäne
KS	Ketosynthesedomäne
KWS	Kleinwanzlebener Saatzucht
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
λ_{Em}	Emissionswellenlänge
LiCl	Lithiumchlorid
LinReg	Software zur Durchführung Linearer Regression
Lsg.	Lösung
Lys	L-Lysin
M	Molarität
μ A	Mikroampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
mAU	milli-Absorption Units
Mb	Megabasenpaare
<i>M. barkeri</i>	<i>Methanococcus barkeri</i>
μ E	Mikroevinstein
<i>M. mazei</i>	<i>Methanococcus mazei</i>
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MnCl ₂	Manganchlorid
MN-Lsg.	Magnesiumsulfat-/Natriumchlorid-Lösung

MoPPT1	Sfp-PPTase aus <i>Magnaporthe oryzae</i> (Protein)
MoPPT1	Sfp-PPTase aus <i>Magnaporthe oryzae</i> (Gen)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
<i>M. oryzae</i>	<i>Magnaporthe oryzae</i>
MPa	Megapascal
mRNA	Messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
N	Stickstoff
N. A.	numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ EDTA	Dinatrium-EDTA
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₂ MO ₄	Natriumpermanganat
NaNO ₃	Natriumnitrat
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>NdeI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Neisseria denitrificans</i>
NEB	New England Biolabs
nes	nested
ng	Nanogramm
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
<i>NlaIII</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Neisseria lactamica</i>
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
<i>NotI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Nocardia otitidiscaviarum</i>
NRP	nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthase
NUV	<i>Near Ultraviolet</i>
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
<i>oliC</i>	Oligomycin-Resistenzgen
OMA	Oat Meal Agar
OMO1	<i>L</i> -Ornithin-N5-Monooxygenase aus <i>M. oryzae</i>
ORF	Open Reading Frame
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
P	Phosphopantetheinylierungsstelle
p	Signifikanzschwelle
Pa	Pascal
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<i>P. anserina</i>	<i>Podospira anserina</i>
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	Polyethylenglycol

<i>PgpdA</i>	Promoter des Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens aus <i>Aspergillus nidulans</i>
pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i> , Wasserstoffionenkonzentration
<i>Pi33</i>	Resistenzgen aus <i>O. sativa</i>
PKS	Polyketidsynthase
PKS1	Polyketidsynthase1 aus <i>Colletotrichum lagenarium</i>
PL	<i>Phoma lingam</i>
Pos.	Position
PP	Phosphopantetheinyl
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
<i>PstI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Providencia stuartii</i>
pUC-18	artifizielles Plasmid, hergestellt an der Universität von Californien
<i>pv.</i>	Pathovar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
rev	reverse
rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>R. norvegicus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
ROS	Reactive Oxygen Species
RP-18	Reversed Phase, stationäre Phase mit C-18 Material
rpm	Rotations per Minute
RT	Reverse Transkriptase
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
S	Schwefel
18S/28S	Sedimentationskoeffizienten ribosomaler RNA
s	Sekunde
s.	siehe
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SAP	Selective Anchor Primer
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCM	Synthetic Complete Medium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sfp	Surfactin-producing
<i>sid1</i>	<i>L</i> -Ornithin-N5-Monooxygenasegen aus <i>Ustilago maydis</i>
<i>SirP</i>	Sirodesminsynthasegen
SMM	Synthetic Minimal Medium
sp.	<i>species</i>
SP6	Bacteriophage
<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces pombe</i>
SrfABC	Surfactinsynthesen ABC
SSC	Standard Saline Citrat
St.	Sankt
STC	Sorbitol/Tris/Calciumchlorid
<i>StuI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Streptomyces tubercidicus</i>
<i>S. venezuelae</i>	<i>Streptomyces venezuelae</i>

T7	Bacteriophage
TAA	Stoppcodon für Translation
Tab.	Tabelle
tac	synthetischer Promoter, IPTG induzierbar
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TAG	Stoppcodon für Translation
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
TE	Tris/EDTA
TE	Terminations-/Thioesterasedomäne
TES	Tris/EDTA/SDS
TGA	Stoppcodon für Translation
T4HN	1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalen
T _m	Schmelztemperatur (Primer)
TM	Terminationsmodul
tms	Texas Male Sterile Cytoplasm
TOF	Time-of-Flight
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
<i>TtrpC</i>	Terminator des Tryptophan-Synthasegens C aus <i>Aspergillus nidulans</i>
tub1	Gen für Tubulin α aus <i>Botrytis cinerea</i>
u. a.	unter anderen(m)
UAP	Universal Amplification Primer
URF13	13 kDa Protein in Mitochondrien von tms-Mais
USA	United States of America
u. U.	unter Umständen
UV	ultraviolett
UV/VIS	ultraviolett/visible
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
x	Multiplikationszeichen
<i>XbaI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas campestris pv. badrii</i>
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl-beta-D-Galaktopyranosid
<i>XhoI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas campestris pv. holcicola</i>
YNB	Yeast Nitrogen Base
z. B.	zum Beispiel
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>
ZnSO ₄	Zinksulfat
z. T.	zum Teil
∅	Durchschnitt

Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1	Infektion von <i>Zea mays</i> durch <i>Colletotrichum graminicola</i> 1
Abb. 2	Reaktionsschema der PP-Übertragung durch 4'-Phosphopantetheinyltransferasen 5
Abb. 3	Dendrogramm zur phylogenetischen Klassifizierung von PPTasen 8
Abb. 4	Synthese komplexer Peptide: Surfactin 11
Abb. 5	fungale Siderophore 13
Abb. 6	fungale Toxine mit Peptidgrundgerüst 15
Abb. 7	Synthese komplexer Polyketide: Erythronolid 19
Abb. 8	Toxine mit Ketidgrundgerüst 21
Abb. 9	Metabolite mit Peptid/Ketid-Grundgerüst 23
Abb. 10	Struktur von <i>CgPPT1</i> 87
Abb. 11	Isolierung des <i>CgPPT1</i> -Promoters 88
Abb. 12	Expression des <i>CgPPT1:eGFP</i> -Reporterkonstrukts 89
Abb. 13	<i>in vitro</i> 4'-Phosphopantetheinylierungsreaktion 90
Abb. 14	MALDI-TOF/MS-Analyse tryptischer GST-CgPKS100-Fragmente 91
Abb. 15	<i>CgPPT1</i> -Deletionsmutagenese 92
Abb. 16	Wachstumsversuche und Synthese von Siderophoren 94
Abb. 17	Konidienmorphologie 95
Abb. 18	Konidienkeimung auf unterschiedlichen Oberflächen 96
Abb. 19	Appressorienmorphologie und Appressoriendifferenzierung 97
Abb. 20	Infektion intakter Maisblätter und genetische Komplementation 99
Abb. 21	Infektion verletzter Maisblätter 100
Abb. 22	Quantifizierung der fungalen Biomasse und Konidienbildung 101
Abb. 23	HPLC-Profile von Extrakten aus <i>CgM2</i> - und $\Delta Cgppt1$ -Kulturüberständen 103

Abb. 24	Strukturen isolierter <i>C. graminicola</i> -Metabolite	104
Abb. 25	<i>MoPPT1</i> -Deletionsmutagenese und phänotypische Charakterisierung	106
Abb. 26	<i>CgAAR</i> -Deletionsmutagenese und Maisinfektion	108
Abb. 27	Charakterisierung des $\Delta Cgaar$ -Infektionsphänotyps	109
Abb. 28	Struktur von <i>CgPKS1</i>	111
Abb. 29	Expression des <i>CgPKS1:eGFP</i> -Reporterkonstrukts	112
Abb. 30	<i>CgPKS1</i> -Deletionsmutagenese	114
Abb. 31	Charakterisierung des $\Delta CgpkS1$ -Phänotyps	116
Abb. 32	Einfluss von Melanin auf die Appressorienmorphologie	117
Abb. 33	Bedeutung von Melanin für die Penetrationskompetenz von Appressorien	119
Abb. 34	Melanisierung erhöht die Widerstandsfähigkeit der Zellwand gegenüber hydrolytischen Enzymen	120
Abb. 35	Cytorrhizie	122
Abb. 36	<i>CgPPT1</i> ist ein zentraler Regulator der Pathogenität	149
Abb. 37	AlphaScreen-Assay	150

Tabellenverzeichnis

		Seite
Tab. 1	konservierte Sequenzmotive von Sfp-PPTasen unterschiedlicher Arten	7

Anmerkungen zur Schreibweise

Fremdsprachige Fachbegriffe wurden, wann immer es sinnvoll erschien, ins Deutsche übersetzt. Gebräuchliche Fachtermini aus dem englischen Sprachraum wurden jedoch übernommen ohne dies besonders zu kennzeichnen. Für Wörter anderer Fremdsprachen, Art- und Gattungsnamen erfolgte die Wiedergabe in Kursivschrift. Genbezeichnungen wurden mit Großbuchstaben in Kursivschrift angegeben und Gendelationen mit kursiven Kleinbuchstaben, sofern eine bereits vorgegebene Nomenklatur dies nicht verhinderte. Proteine wurden mit Großbuchstaben gekennzeichnet.

Auf die Abbildungsnummer wird im Begleittext jeweils nur am Anfang des entsprechenden Abschnitts verwiesen. Alle folgenden Angaben zu Bildern, Diagrammen etc. beziehen sich auf die genannte Abbildung.

I Einleitung

I.1 Biologie von *Colletotrichum graminicola*

Colletotrichum graminicola (Cesati) G. W. Wilson, Teleomorph *Glomerella graminicola* Politis, ein Vertreter der filamentösen Ascomyceten (Klasse *Sordariomycetes*, Unterklasse *Hypocreomycetidae*, Familie *incertae setis Glomerellaceae*; Lumbsch & Huhndorf, 2007), ist der Verursacher von Anthraknose-Blattflecken und Stängelfäule an Mais. Das Wirtsspektrum des phytopathogenen Pilzes umfasst eine Reihe weiterer Gräser aus der Familie *Poaceae*, darunter das Einjährige Rispengras *Poa annua* und Wiesen-Lieschgras *Phleum pratense*. Blattspreiten dieser Wirtspflanzen weisen nach einer Infektion durch *C. graminicola* die charakteristischen Anthraknose-Symptome auf (Wilson, 1914; Brehl & Dickinson, 1950).



Abb. 1: Infektion von *Zea mays* durch *Colletotrichum graminicola*

Von *C. graminicola* verursachte Anthraknose-Blattflecken bestehen aus einer zentralen Nekrose, die durch eine schmale Zone chlorotischen Blattgewebes begrenzt wird (A, B). Stängelinfektionen führen zur Besiedlung von Leitgeweben und damit zum Absterben der gesamten Pflanze (C, D).

Aktuelle Daten taxonomischer Analysen belegen jedoch eine deutliche phylogenetische Distanz zwischen Isolaten, die Mais infizieren und Isolaten, die Süßgräser der Unterfamilie *Pooideae* befallen. Crouch *et al.* (2006) empfehlen daher die Bezeichnung *C. cereale* für Isolate von C3-Gräsern bzw. *C. graminicola* (Ces.) G. W. Wilson *sensu stricto* Sutton für Maispathogene (Sutton, 1980).

Als fakultativer Saprophyt ist *C. graminicola* optimal an die Umweltbedingungen mais-basierter Agroökosysteme angepasst. Ein kurzer Reproduktionszyklus während der Hauptvegetationsperiode von lediglich 3-4 Tagen, verbunden mit der Produktion großer Sporenmengen, ermöglicht dem Pathogen eine effiziente Ausbreitung in landwirtschaftlichen Intensivkulturen (Bergstrom & Nicholson, 1999).

Für die Überwinterung und Bildung des primären Inokulums ist die saprophytische Lebensweise auf abgestorbenem Pflanzenmaterial von entscheidender Bedeutung. Sie ermöglicht dem Pilz die Versorgung mit Nährstoffen, unabhängig von der Verfügbarkeit intakter Wirtspflanzen. Metabolisch aktives Myzel kann dadurch die Wintermonate überdauern und steht zu Beginn der nächsten Vegetationsperiode als Reservoir für die Neubildung von Konidien zur Verfügung (Bergstrom & Nicholson, 1999).

Die sichelförmigen Konidien werden in speziellen Sporenlagern, den Acervuli, gebildet und dienen der asexuellen Reproduktion sowie der Verbreitung im natürlichen Lebensraum. Eine extrazelluläre Matrix aus verschiedenen Komponenten umgibt die Konidien im Acervulus. Hochmolekulare Glykoproteine mit einem hohen Prolinanteil schützen die Sporen vor dem Austrocknen und binden toxische Polyphenole, welche von der Pflanze zur Abwehr mikrobieller Pathogene synthetisiert werden (Nicholson & Moraes, 1980; Nicholson *et al.*, 1986). Mycosporin-Alanin inhibiert die Bildung von Keimschläuchen im Acervulus (Leite & Nicholson, 1992). Wassertropfen bewirken eine starke Verdünnung dieses Inhibitors und ermöglichen damit die Keimung der Konidien. Weitere Bestandteile der Matrix sind sekretierte Enzyme aus der Gruppe der Laccasen, Glucosidasen, Esterasen und Cutinasen (Anderson & Nicholson, 1996). Ein Teil dieser Proteine ist vermutlich für eine kompatible Interaktion mit der Wirtspflanze von Bedeutung (Pascholati *et al.*, 1993).

Sobald Konidien durch Wassertropfen aus dem Acervulus freigesetzt werden und auf die hydrophobe Blattoberfläche einer Wirtspflanze gelangen, aktivieren Signaltransduktionsprozesse die Expression von Genen, welche für eine stabile Etablierung der Wirt-Parasit-Interaktion notwendig sind. Schon 30 Minuten nach dem Auftreffen des Konidiums auf der Blattoberfläche bilden sekretierte Glykoproteine ein Adhäsions-

kissen, das einen festen Kontakt zwischen Konidium und Pflanzencuticula herstellt (Mercure *et al.*, 1994a, 1994b; Chaky *et al.*, 2001). Fünf bis sechs Stunden später entwickelt sich ein Keimschlauch aus dem einfach septierten Konidium. In seltenen Fällen bilden beide Zellen des Konidiums Keimschlauch und Infektionsstrukturen.

Die Differenzierung des Appressoriums erfolgt häufig unmittelbar neben dem Konidium, wobei lediglich ein extrem kurzer Keimschlauch angelegt wird (Bergstrom & Nicholson, 1999). Appressorien sind spezialisierte Infektionsstrukturen zur Erzeugung eines hohen Zellinnendruckes, der es Pathogenen ermöglicht, die Wirtsepidermis direkt zu penetrieren. Treibende Kraft dabei ist ein gewaltiger hydrostatischer Turgor, der durch die Synthese und Akkumulation osmotisch aktiver Substanzen hervorgerufen wird (Bechinger *et al.*, 1999). Vollständig differenzierte Appressorien sind etwa 15-18 Stunden nach Adhäsion der Konidien als sphärische Objekte von etwa 7 µm Durchmesser im Lichtmikroskop erkennbar. Charakteristisch ist die dunkle Färbung der Appressorien, welche auf den Einbau von Melanin in die Zellwand zurückzuführen ist. Die Folge ist eine drastische Reduktion der Porengröße, was bewirkt, dass in den Appressorien gebildete Osmolyte nicht entweichen, Wasser jedoch in die Zelle eindringen kann (Deising *et al.*, 2000). In Appressorien des Reispathogens *Magnaporthe grisea* wurden sehr hohe Glycerolkonzentrationen nachgewiesen. Das daraus resultierende osmotische Potential ist wahrscheinlich für den experimentell ermittelten Turgor von bis zu 8 MPa verantwortlich (De Jong *et al.*, 1997).

Vom hydrostatischen Turgor angetrieben schiebt sich die Penetrationshyphe durch eine Pore des Appressoriums in die pflanzliche Epidermiszelle. Die anschließende Ausbildung eines Infektionsvesikels unterhalb der penetrierten Zellwand terminiert die primäre Infektionsphase. Welche Rolle hydrolytische Enzyme, wie z. B. Cutinasen, Cellulasen, Polygalacturonasen und Pectinasen, beim Eindringen in die Pflanze spielen, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen und bedarf weiterer Untersuchungen (Nicholson *et al.*, 1976; Wattad *et al.*, 1995; Krijger *et al.*, 2008).

Ausgehend vom Infektionsvesikel entstehen zunächst kurze Primärhyphen. In dieser Phase der Infektion ernährt sich *C. graminicola* ausschließlich biotroph, das heißt, Pilzhypen und pflanzliche Plasmamembran stehen in engem Kontakt zueinander, ohne dass die Integrität der infizierten Epidermiszelle verletzt wird. Etwa 24-36 Stunden nach der erfolgreichen Penetration ändert der Pilz sein Verhalten drastisch. Zellwanddegradierende Enzyme werden sekretiert und sekundäre Hyphen durchstoßen die Zellwände und Membranen benachbarter Zellen (Bergstrom & Nicholson 1999). Der

Eintritt in die nekrotrophe Phase korreliert mit dem Auftreten chlorotischer und nekrotischer Blattbereiche an der Infektionsstelle. Wenige Tage später erscheinen auf nekrotischem Blattgewebe Acervuli mit Konidien und schließen damit den asexuellen Reproduktionszyklus ab (Münch *et al.*, 2008).

Die Infektion des Stängels erfolgt grundsätzlich nach dem gleichen Muster. Tiefere Gewebeschichten werden jedoch nur nach vorheriger Verletzung befallen (Venard & Vaillancourt, 2007). Dementsprechend spielen die Larven des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* und andere stängelbohrende Insekten eine entscheidende Rolle als Wegbereiter und Vektoren systemischer Infektionen. Über die Xylemgefäße gelangt das infektiöse Myzel in sämtliche Pflanzenteile und verursacht durch eine massive Störung des Wassertransportsystems das Absterben der oberen Pflanzenteile (Panaccione *et al.*, 1989; Bergstrom & Nicholson 1999; Sukno *et al.*, 2008).

Zahlreiche Umweltfaktoren beeinflussen die Entwicklung von *C. graminicola* in den einzelnen Entwicklungsstadien und wirken damit direkt auf den Infektionsverlauf. So vermindert eine hohe Lichtintensität die relative Suszeptibilität der Wirtspflanzen durch die lichtinduzierte Produktion phenolischer Substanzen (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Dixon & Paiva, 1995; Holton & Cornish, 1995). Konidien benötigen für ihre Verbreitung eine feuchte Witterung. Ebenso erfolgt die Differenzierung des Keimschlauchs in Wassertropfen. Obwohl Konidienkeimung und Appressoriendifferenzierung innerhalb eines breiten Temperaturintervalls von etwa 15-35°C uneingeschränkt stattfinden, erfolgt die effiziente Penetration des Wirtsgewebes ausschließlich bei einer Umgebungstemperatur von 25-30°C (Skoropad, 1967; Kollo, 1988). Im Allgemeinen erhöht sich also die Wahrscheinlichkeit für den Ausbruch einer Epidemie bei anhaltenden Nässeperioden und hohen Temperaturen während der Hauptvegetationszeit (Bergstrom & Nicholson 1999).

Darüber hinaus können biotische Stressoren die Suszeptibilität des Wirtes deutlich erhöhen. So führt eine gleichzeitige Infektion der Maispflanze durch *C. graminicola* und den Wurzelnematoden *Pratylenchus hexincisus* zur verstärkten Ausprägung von Anthraknose-Symptomen (Nicholson, 1996).

I.2 Vorkommen, Systematik und katalytische Aktivität der PPTasen

Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) katalysieren die posttranslationale Modifikation von Proteinen durch die Übertragung der 4'-Phosphopantetheinylgruppe (PP) vom Coenzym A (CoA) auf Acyl-Carrier-Proteine (ACP) bzw. Peptidyl-Carrier-Proteine (PCP). Die kovalente Verknüpfung der prosthetischen Gruppe mit der Seitenkette eines konservierten Serins überführt ACP und PCP in die holo-Form und aktiviert damit Fettsäuresynthasen (FAS), Polyketidsynthasen (PKS), Nichtribosomale Peptidsynthasen (NRPS) und *L*-Aminoacidat-Reduktasen (AAR; Elovson & Vagelos, 1968; Walsh *et al.*, 1997).

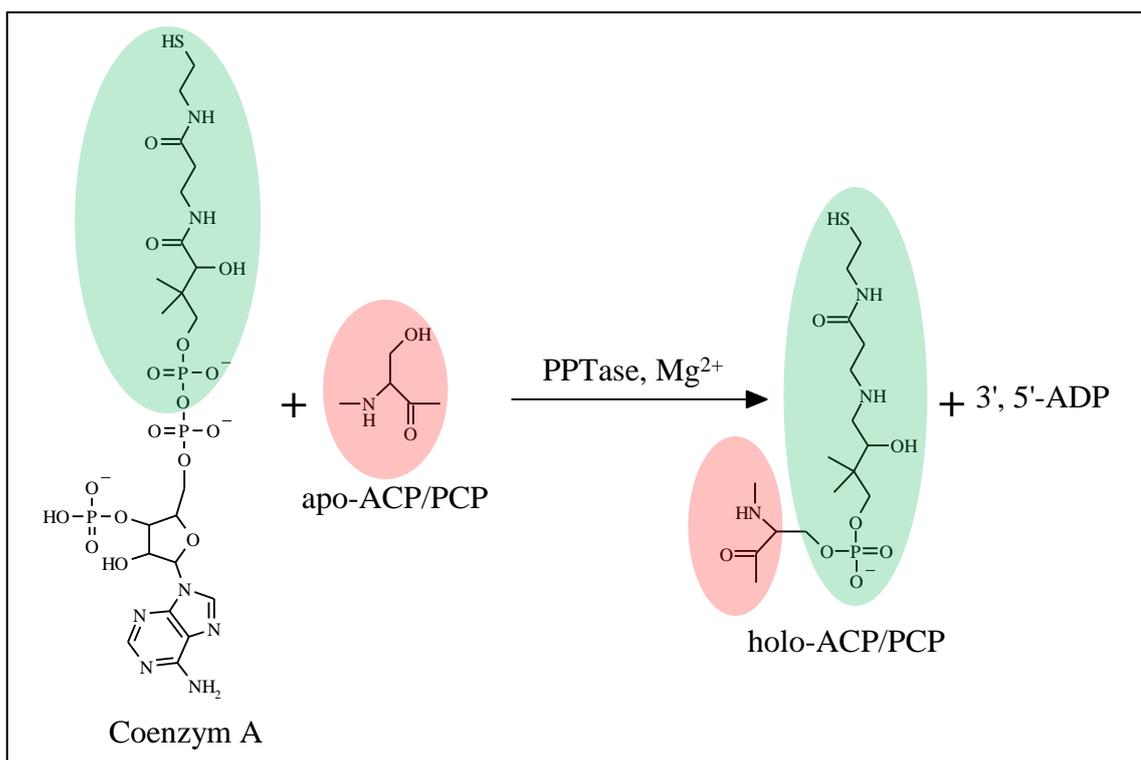


Abb. 2: Reaktionsschema der PP-Übertragung durch 4'-Phosphopantetheinyltransferasen

PPTasen katalysieren den nukleophilen Angriff der OH-Gruppe eines konservierten Serins von Acyl-Carrier-Proteinen bzw. Peptidyl-Carrier-Proteinen auf das 5'-β-Pyrophosphat des CoA. Dadurch werden inaktive apo-Carrier-Proteine in die aktive holo-Form überführt (Mootz *et al.*, 2001).

PPTasen sind entsprechend ihrer zentralen Funktion im Stoffwechsel ubiquitär verbreitet und wurden bisher in Archaeen, Eubakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren nachge-

wiesen (Reuter *et al.*, 1999; Keszenman-Pereyra *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2003; Copp & Neilan, 2006).

Anhand konservierter Sequenzmotive, Substratspezifität, Größe und Quartärstruktur werden PPTasen in zwei Gruppen unterteilt. Die erste Gruppe umfasst PPTasen vom AcpS-Typ, benannt nach der Acyl-Carrier-Protein-Synthase aus *E. coli* (Elovson & Vagelos, 1968; Walsh *et al.*, 1997). Vertreter dieser Gruppe bestehen aus etwa 120 bis 140 Aminosäuren und sind wahrscheinlich als Homotrimere katalytisch aktiv (Parris *et al.*, 2000). AcpS-Typ PPTasen aktivieren ACP von Fettsäuresynthasekomplexen und Polyketidsynthasen. Eine Untergruppe bilden AcpS-Typ PPTasen, die als integrierte Domänen eukaryotischer Typ I-Fettsäuresynthasen vorkommen (Lambalot *et al.*, 1996). Der Prototyp der zweiten Gruppe ist die Sfp- (Surfactin producing) PPTase aus *Bacillus subtilis*. Das Sfp-Gen wurde zunächst als funktionaler Bestandteil der Surfactinsynthese genetisch identifiziert (Nakano *et al.*, 1992; Grossman *et al.*, 1993). Wenige Jahre später gelang die biochemische Charakterisierung der Sfp-PPTase (Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998). Sfp-Typ PPTasen bestehen aus etwa 240 Aminosäuren und sind damit deutlich größer als PPTasen vom AcpS-Typ. Sie sind als Monomere katalytisch aktiv (Reuter *et al.*, 1999; Mofid *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu AcpS-PPTasen akzeptieren Sfp-PPTasen ein breites Substratspektrum. So wurden alle bisher getesteten ACP und PCP durch die Sfp-PPTase aus *B. subtilis* phosphopantetheinyliert (Lambalot *et al.*, 1996; Quadri *et al.*, 1998; Pfeifer & Khosla, 2001; Watanabe *et al.*, 2003; Shute *et al.*, 2005). Die biologische Relevanz dieser Ergebnisse zeigt die Tatsache, dass eine Deletion der *B. subtilis* AcpS-PPTase für das Bakterium nicht letal ist, da allein durch die katalytische Aktivität der Sfp-PPTase sämtliche Carrierproteine phosphopantetheinyliert werden (Mootz *et al.*, 2001).

In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Notwendigkeit redundanter PPTasen. Tatsächlich konnten Organismen mit nur einer PPTase, darunter *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* sowie bestimmte Cyanobakterien, identifiziert werden (Finking *et al.*, 2002). Andererseits existieren in enger phylogenetischer Nachbarschaft Cyanobakterien mit bis zu drei Sfp-Typ PPTasen (Copp & Neilan, 2006).

Während in *E. coli* insgesamt drei PPTasen identifiziert wurden, besitzen untersuchte Vertreter der Mycobakterien und Corynebakterien jeweils eine PPTase vom AcpS- und Sfp-Typ (Lambalot *et al.*, 1996; Chalut *et al.*, 2006).

In *Saccharomyces cerevisiae* wurden drei PPTasen mit unterschiedlichen Funktionen nachgewiesen. Jeweils eine AcpS-PPTase ist mit der cytosolischen bzw. mitochondrialen Fettsäuresynthase assoziiert, während eine dritte PPTase vom Sfp-Typ PP auf ein konserviertes Serin der AAR überträgt, welche ihrerseits einen essentiellen Schritt in der Lysinbiosynthese katalysiert (Stuible *et al.*, 1998; Ehmann *et al.*, 1999; Fichtlscherer *et al.*, 2000).

Sequenzdaten deuten auf eine identische Situation in *Candida albicans* hin (Southard & Cihlar, 1995; Jones *et al.*, 2004). Funktionelle Analysen liegen jedoch nur für die Sfp-PPTase aus *C. albicans* vor (Guo & Bhattacharjee, 2003). Gleiches gilt für filamentöse Ascomyceten, wie *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* und *Aspergillus fumigatus* (Oberegger *et al.*, 2003; Neville *et al.*, 2005; Marquez-Fernandez *et al.*, 2007).

Species	As	Motiv 1				As	Motiv 2				As	Motiv 3										
<i>A. fumigatus</i>	113	S	H	Q	A	156	V	G	I	D	I	226	Y	W	A	L	K	E	A	Y	I	K
<i>A. nidulans</i>	118	S	H	Q	A	145	V	G	I	D	I	214	Y	W	A	L	K	E	A	Y	I	K
<i>C. graminicola</i>	104	S	H	Q	A	127	V	G	V	D	V	201	L	W	C	L	R	E	A	Y	V	K
<i>M. grisea</i>	111	T	H	Q	A	135	V	G	I	D	V	209	L	W	C	L	R	E	A	Y	V	K
<i>P. anserina</i>	112	T	H	Q	A	133	T	G	V	D	V	208	L	W	A	L	R	E	A	Y	I	K
<i>S. cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	133	V	G	I	D	I	177	L	W	S	L	K	E	S	Y	T	K
<i>S. pombe</i>	108	S	H	Y	G	123	I	G	V	D	I	168	L	W	T	L	K	E	A	I	L	K
<i>A. gambiae</i>	98	S	H	Q	G	126	I	G	V	D	V	176	N	W	C	L	K	E	S	Y	V	K
<i>D. melanogaster</i>	100	S	H	Q	G	122	I	G	T	D	V	173	H	W	C	L	K	E	A	Y	V	K
<i>H. sapiens</i>	108	S	H	Q	G	126	V	G	I	D	I	176	N	W	A	L	K	E	S	F	I	K
<i>R. norvegicus</i>	150	S	H	Q	G	166	V	G	I	D	I	216	H	W	A	L	K	E	S	F	I	K
<i>C. elegans</i>	103	S	H	Q	G	115	I	G	V	D	V	166	I	W	C	L	L	E	S	I	L	K
<i>A. thaliana</i>	129	S	H	T	D	145	V	G	I	D	V	192	L	W	T	L	K	E	A	Y	V	K
<i>E. coli</i>	139	S	H	C	G	154	I	G	I	D	I	198	A	F	S	A	K	E	S	A	F	K
<i>H. influenzae</i>	89	S	H	S	G	109	V	G	I	D	I	151	C	W	C	L	R	E	A	V	L	K
<i>P. aeruginosa</i>	107	T	H	G	D	126	L	G	L	D	V	171	A	F	S	L	K	E	S	L	F	K
<i>S. venezuelae</i>	100	S	H	S	H	115	V	G	V	D	V	159	L	W	T	R	K	E	A	Y	L	K
<i>M. acetivorans</i>	120	N	H	N	E	144	V	G	I	D	V	182	E	W	T	L	R	E	A	Y	C	K
<i>M. barkeri</i>	104	N	H	N	E	128	V	G	I	D	I	166	T	W	T	L	K	E	A	Y	S	K
<i>M. mazei</i>	100	N	H	D	D	124	I	G	I	D	I	162	A	W	T	L	K	E	A	Y	C	K

Tab. 1: konservierte Sequenzmotive von Sfp-PPTasen unterschiedlicher Arten

Schwarz unterlegte Aminosäuren repräsentieren konservierte Sequenzbereiche, graue Felder eine hohe Ähnlichkeit. Nur einzelne Aminosäuren sind in den drei Motiven über alle Organismengruppen hinweg identisch. Die als Core-Motive bezeichneten Bereiche sind an der CoA-Bindung beteiligt. PPTasen vom AcpS-Typ besitzen weitgehend identische Sequenzabschnitte, lediglich die Reihenfolge ist verändert, so dass sich Motiv 1 C-terminal von Motiv 2 und 3 befindet. Die individuelle Position der jeweils ersten dargestellten Aminosäure jedes konservierten Motivs ist in der As- (Aminosäure) Spalte angegeben.

Ein deutlicher Trend zur Reduktion der Anzahl unterschiedlicher PPTasen hin zu einer einzigen PPTase, die gleichermaßen ACP cytosolischer und mitochondrialer FAS-Komplexe, aber auch die im Lysinstoffwechsel notwendige AAR aktiviert, scheint sich lediglich in höher entwickelten heterotrophen Eukaryoten abzuzeichnen (Praphanphoj *et al.*, 2001; Joshi *et al.*, 2003; Bunkoczy *et al.*, 2007).

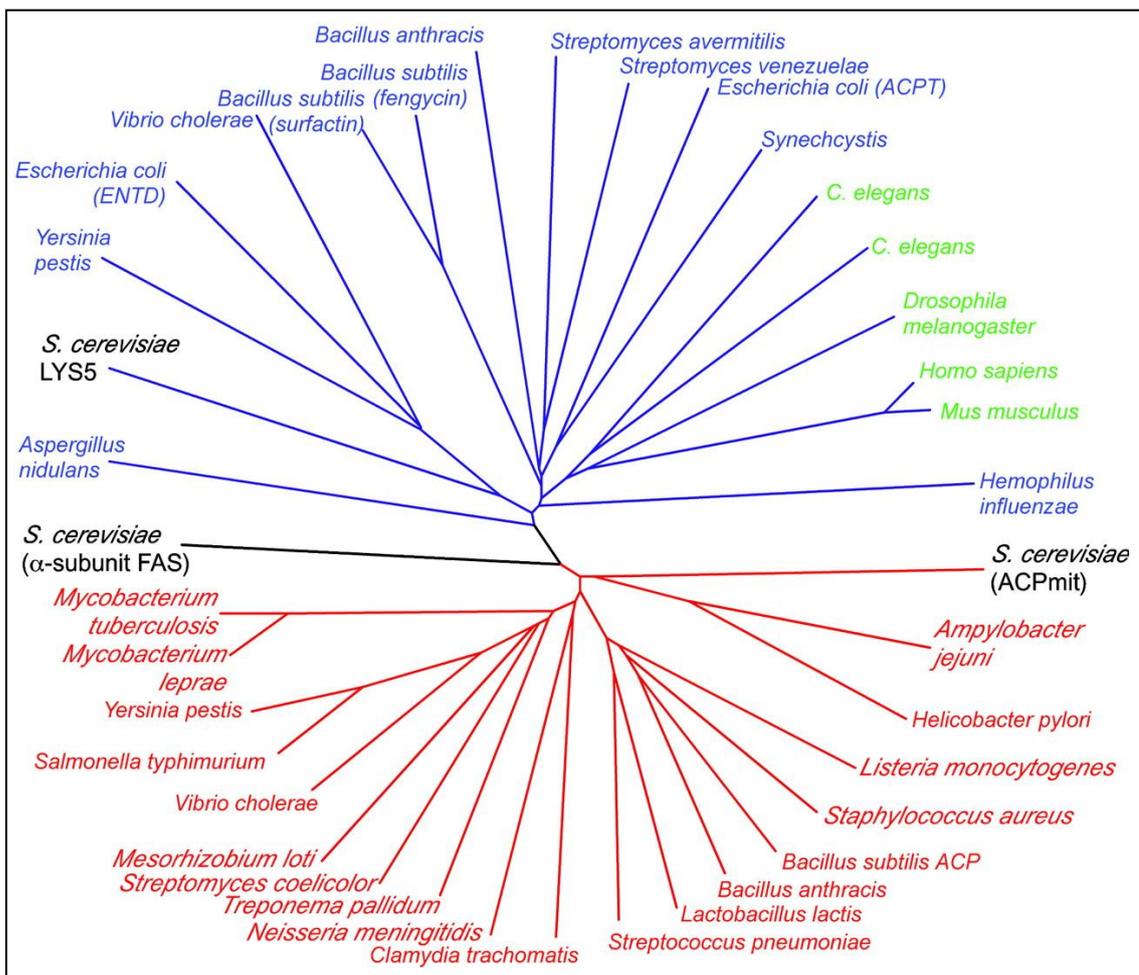


Abb. 3: Dendrogramm zur phylogenetischen Klassifizierung von PPTasen

Im rot markierten Abschnitt sind die phylogenetischen Beziehungen von AcpS-PPTasen unterschiedlicher Organismen dargestellt, im blau markierten Bereich die phylogenetischen Beziehungen der Sfp-PPTasen. Grün markiert sind Speciesbezeichnungen höherer Eukaryoten, deren PPTasen in die Analyse einbezogen wurden. Während *C. elegans* noch zwei dem Sfp-Typ zugeordnete PPTasen besitzt, ist die Anzahl der Sfp-PPTasen in *D. melanogaster*, *M. musculus* und *H. sapiens* auf eine reduziert. Schwarz hervorgehoben sind die drei PPTasen aus *S. cerevisiae* (Joshi *et al.*, 2003).

Die Aminosäuresequenz von PPTasen ist, abgesehen von sehr kurzen Sequenzmotiven, nur innerhalb nah verwandter Arten konserviert, was eine eindeutige Identifizierung dieser Enzyme in unterschiedlichen Species erschwert (Tab. 1 und Abb. 3). Besonders

schwer zu identifizieren und daher bisher kaum analysiert sind Sfp-Typ PPTasen, die als integraler Bestandteil von Polyketidsynthasen vorkommen (Weissman *et al.*, 2004; Copp & Neilan, 2006; Zhang *et al.*, 2007).

Bevorzugte Substrate der Sfp-PPTasen sind ACP von Polyketidsynthasen bzw. PCP Nichtribosomaler Peptidsynthetasen. Aus diesem Grund werden Sfp-PPTasen dem sekundären Metabolismus zugeordnet, AcpS-PPTasen dagegen dem primären Metabolismus (Finking *et al.*, 2004; Copp & Neilan, 2007). Diese Unterteilung ist jedoch schwierig aufrecht zu erhalten, da einerseits gezeigt wurde, dass AcpS-PPTasen zumindest potentiell in der Lage sind ACP von Polyketidsynthasen des Sekundärstoffwechsels zu aktivieren, andererseits jedoch vermeintliche Sekundärmetabolite essentielle Aufgaben im Primärstoffwechsel erfüllen (Gehring *et al.*, 1997; Marquez-Fernandez *et al.*, 2007). Zudem sind Sfp-PPTasen von Ascomyceten indirekt an der Lysinsynthese beteiligt, einem Prozess, der eindeutig dem Primärstoffwechsel angehört. Darüber hinaus besitzt *S. cerevisiae* zwar eine Sfp-PPTase, produziert aber keine Sekundärmetabolite (Smedsgaard & Nielsen, 2005).

Im Laufe der Evolution könnten PPTasen vom Sfp-Typ durch Genduplikation von AcpS-PPTasen entstanden sein, da Sfp-PPTasen eine als Pseudohomodimer bezeichnete Struktur aufweisen, welche dem AcpS-Monomer ähnelt (Finking *et al.*, 2004). Allerdings ergibt eine halbierte Sfp-PPTase kein funktionales Enzym. Außerdem verwenden Sfp-PPTasen zur Anpassung an unterschiedliche Substrate eine flexible Schlaufenstruktur, während AcpS-PPTasen mit einem relativ starren Helix-Motiv vorrangig ACP erkennen (Mofid *et al.*, 2004). Die Entstehung von Sfp-PPTasen lässt sich damit vermutlich nicht allein auf eine simple Genduplikation zurückführen. Vielmehr scheint die Koevolution von PPTasen und Substraten zu funktionell divergierenden Enzymtypen geführt zu haben.

Neben den bisher bekannten PP-Akzeptoren wurde kürzlich mit dem *car*-Genprodukt aus *Nocardia sp.* NRRL 5646 eine Aldehydoxydoreduktase als PPTase-Substrat beschrieben. Die Phosphopantetheinylierung führt auch in diesem Fall zum aktiven Holoenzym (Venkitasubramanian *et al.*, 2007).

I.3 Nichtribosomale Peptidsynthasen

I.3.1 Vorkommen, Struktur und katalytische Aktivität der NRPS

Peptide werden in Organismen auf zwei grundlegend verschiedenen Wegen synthetisiert. Im Verlauf der klassischen Protein- bzw. Peptidbiosynthese beladen Aminoacyl-tRNA-Synthasen tRNAs mit den entsprechenden Aminosäuren. Ribosomen katalysieren anschließend im Zusammenspiel mit Elongationsfaktoren die Bildung der Peptidbindung, wobei mRNA als Matrize fungiert (Noller, 1991).

Nichtribosomale Peptidsynthasen (NRPS) vereinen Matrizenfunktion und Biosynthesemaschinerie in großen multimodularen Komplexen. Mindestens drei unterschiedliche Domänen sind für die Synthese nichtribosomaler Peptide (NRP) notwendig. Die Adenylierungsdomäne (AD) bindet selektiv eine bestimmte Aminosäure als Aminoacyl-adenylat (Turgay *et al.*, 1992; Dieckmann *et al.*, 1995). Im nächsten Schritt wird die aktivierte Aminosäure zum Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) transportiert und dort kovalent an den Phosphopantetheinylrest gebunden (Cane & Walsh, 1999; Lai *et al.*, 2006). Schließlich katalysiert die Kondensationsdomäne (KD) die Bildung einer Peptidbindung zwischen zwei Aminosäuren, welche jeweils an ein PCP gebunden sind (Belshaw *et al.*, 1999; Keating *et al.*, 2002, Samel *et al.*, 2007). Fertige Produkte werden durch eine Terminations- bzw. Thioesterasedomäne (TE) vom PCP abgespalten (Schneider & Marahiel, 1998; Tanovic *et al.*, 2008).

Neben diesen essentiellen Domänen haben optionale Domänen einen entscheidenden Anteil an der strukturellen Diversität von NRP. Entsprechend ihrer Funktion lassen sich u. a. Epimerisierungs-, *N*-Methylierungs-, *N*-Formylierungs- und Oxidationsdomänen unterscheiden (Walsh *et al.*, 2001; Mootz *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur ribosomalen Proteinsynthese, bei der etwa 20 Aminosäuren als Substrat zum Einsatz kommen, akzeptieren NRPS neben den entsprechenden *D*-Enantiomeren auch nichtproteinogene Aminosäuren, wie z. B. *L*-Ornithin, *L*-Pipicolinsäure oder Phenylglycin (Challis *et al.*, 2000).

Besonders gut untersucht ist die Synthese von Surfactin. Das Lipopeptid wird von verschiedenen *Bacillus subtilis*-Stämmen produziert und lysiert als Molekül mit amphipathischen Eigenschaften Lipidmembranen (Heerklotz & Seelig, 2007; s. Abb. 4).

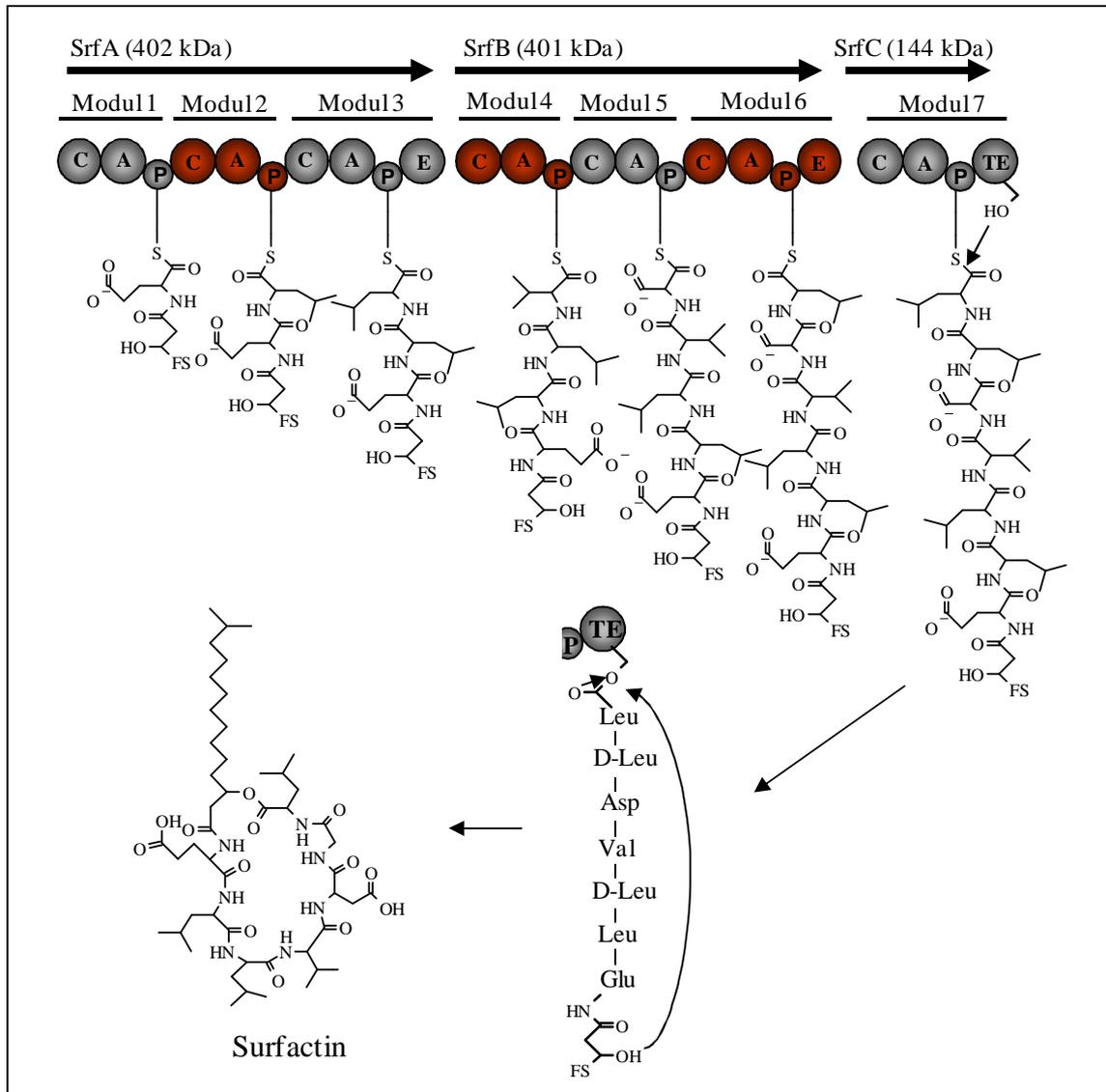


Abb. 4: Synthese komplexer Peptide: Surfactin

Der *Bacillus subtilis* Surfactinsynthese-Multienzymkomplex besteht aus 3 Proteinen (SrfA, B, C), die zusammen 7 funktionale Module bilden. Jedes Modul inkorporiert und modifiziert spezifisch je eine Aminosäure. Fünf unterschiedliche Domänen (A Adenylierung, C Kondensation, E Epimerisierung, P Peptidyl-Carrier-Protein, TE Thioesterase) katalysieren insgesamt 24 Einzelreaktionen. Das dabei entstehende lineare Peptid wird im letzten Schritt zyklisiert und vom Synthesekomplex getrennt (FS: Fettsäure; modifiziert nach Sieber & Marahiel, 2005).

Bakterien und Pilze galten lange Zeit als exklusive Besitzer von NRPS. Überraschend war die Entdeckung eines strukturell ähnlichen Proteins in *Drosophila melanogaster*, dass durch die Übertragung von β -Alanin auf Histamin diesen Neurotransmitter im synaptischen Spalt der Photorezeptoren deaktiviert (Richard *et al.*, 2003). Säugetiere

degradieren Lysin mit Hilfe eines NRPS-ähnlichen Enzyms, wobei der Reaktionsverlauf dem entsprechenden Reaktionsschritt in der pilzlichen Lysinsynthese entgegengesetzt ist (Kasahara & Kato, 2003).

In fast allen bisher sequenzierten Pilzgenomen wurden für NRPS kodierende Gene identifiziert. So ergaben erste Analysen nicht weniger als 30 NRPS in *Cochliobolus heterostrophus*, 37 in *Fusarium graminearum*, 29 in *Botrytis cinerea*, 7 in *Neurospora crassa* und 14 in *Aspergillus nidulans* (Yoder & Turgeon, 2001; Marquez-Fernandez *et al.*, 2007). Nach detaillierteren Genomanalysen reduzierte sich diese Anzahl für *C. heterostrophus* jedoch auf 11 (Lee *et al.*, 2005). Ähnliche Zahlen sind vermutlich auch für andere phytopathogene Ascomyceten realistisch.

Die physiologische Bedeutung der NRPS-Produkte ist noch weitgehend unbekannt. Diskutiert werden Funktionen als Signalmoleküle für Wachstum und Differenzierung (Marahiel *et al.*, 1979; Guillemette *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005), als antibiotisch aktive Substanzen gegen mikrobielle Konkurrenten (Vining, 1990), als Eisenchelatoren (Haas *et al.*, 2008) sowie als wirts- bzw. nichtwirtsspezifische Toxine (Markham & Hille, 2001; Howlett, 2006).

I.3.2 NRPS als Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze

Im Gegensatz zu bakteriellen NRPS wurden bisher relativ wenige pilzliche Gene, die für NRPS kodieren, funktionell charakterisiert und nur in Einzelfällen gelang die Identifizierung der zugehörigen Produkte (Lee *et al.*, 2005). Darunter befinden sich Siderophore sowie wirts- und nichtwirtsspezifische Toxine.

Mikrobielle Siderophore sind zyklische Peptide, die sich, abhängig von der chemischen Struktur der Fe³⁺-bindenden Gruppe, als Catecholate, Phenolate, Carboxylate oder Hydroxamate klassifizieren lassen. Sie werden von ihren Produzenten vermutlich mittels transmembraner Transportproteine in der desferri-Form sekretiert und mobilisieren als hochaffine Chelatoren Fe³⁺-Ionen. Über spezifische Transportsysteme gelangen die beladenen Ferri-Siderophore anschließend wieder in die Zelle, wo sie z. T. auch Speicherfunktionen erfüllen (Haas *et al.*, 2008). Auf diese Weise sichern Mikroorganismen ihre Versorgung mit essentiellen Eisenionen in einer Umwelt, in der Eisen zwar zu den häufigsten Elementen zählt, aber aufgrund der extrem schlechten Löslichkeit in Wasser biologisch kaum verfügbar ist (Ratledge & Dover, 2000).

Freie Eisenionen im Intrazellularraum tragen zur Entstehung cytotoxischer Sauerstoffradikale bei (Halliwell & Gutteridge, 1984). Aus diesem Grund erfolgt die Speicherung von Eisen in Pflanzen die enge Bindung an Proteine wie Ferritin (Arosio *et al.*, 2009). Phytopathogene sind im Verlauf der Pflanzeninfektion aber auf eine ausreichende Versorgung mit Eisen angewiesen, d. h., komplexiertes Eisen muss innerhalb des Wirts mit Hilfe hochaffiner Chelatoren mobilisiert werden.

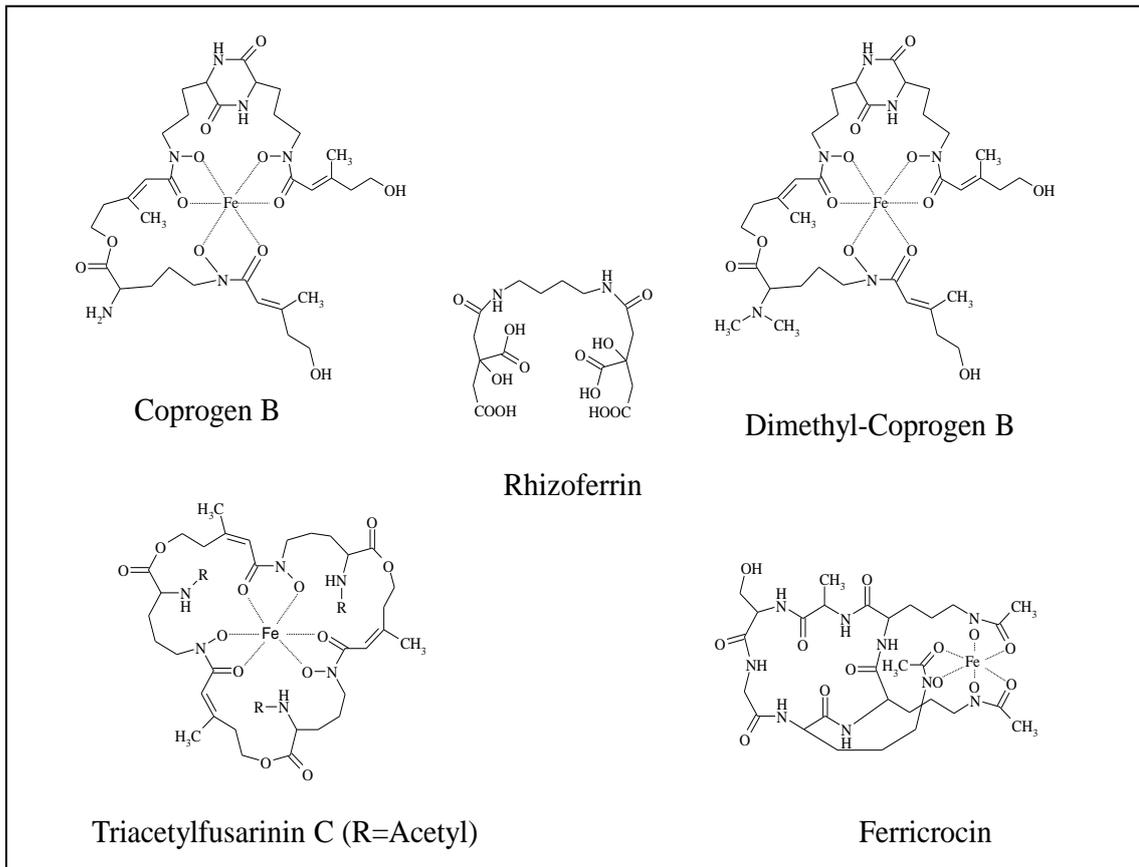


Abb. 5: fungale Siderophore

Mit Ausnahme von Rhizoferrin, dem Carboxylat-Siderophor bestimmter Zygomyceten, gehören alle bisher beschriebenen fungalen Siderophore zum Hydroxamat-Typ. Eine wichtige Strukturkomponente ist die Aminosäure Ornithin. Coprogene und Triacetylfusarinin werden sekretiert, während Ferricrocin der innerzellulären Fe-Speicherung dient.

Dass extrazelluläre Siderophore tatsächlich Virulenzdeterminanten darstellen, konnte erstmalig durch die Deletion des Nichtribosomalen Peptidsynthasegens *NPS6* in *Cochliobolus heterostrophus*, sowie der orthologen Gene in *Cochliobolus miyabeanus*, *Gibberella zae* und *Alternaria brassicicola* gezeigt werden. Alle Deletionsstämme verursachten deutlich reduzierte Symptome auf den jeweiligen Wirtspflanzen. Zusätzlich war die Anzahl asexuell gebildeter Sporen geringer als beim Wildtyp, während die

Suszeptibilität gegenüber oxidativem Stress erhöht war. Das *NPS6*-Genprodukt ist an der Synthese von **Coprogen B** in *Cochliobolus heterostrophus*, **Dimethyl-Coprogen** in *Alternaria brassicicola* und **Triacetylfusarinin C** in *Gibberella zea* beteiligt (Oide *et al.*, 2006).

Ein überraschendes Resultat war der Befund, dass auch intrazelluläre Siderophore Virulenzfaktoren sein können. Die Deletion des Ferricrocinsynthasegens *SSM1* in *Magnaporthe oryzae* reduzierte die Penetrationsrate der Appressorien drastisch. Im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp-Isolat wies die geringere Anzahl von Blattläsionen auf eine stark verminderte Virulenz der Deletionsmutante hin (Hof *et al.*, 2007).

Sekundärmetabolite mit phytotoxischer Wirkung sind besonders für nekrotrophe Pathogene von großer Bedeutung. Unter diesen Substanzen befinden sich zahlreiche Virulenzfaktoren, von denen einige durch NRPS synthetisiert werden (Markham & Hille, 2001).

Leptosphaeria maculans, der Verursacher von Wurzelhalsfäule an Raps, produziert während der Infektion das nichtwirtsspezifische Toxin **Sirodesmin PL**. Die komplizierte Struktur dieses Epipolythiodioxopiperazins erfordert zahlreiche Syntheseschritte, an denen mit *SirP* auch eine NRPS beteiligt ist. Rapsstängel wurden von Sirodesmindefizienten *SirP*-Deletionsmutanten weit weniger effektiv kolonisiert als vom Wildtypisolat (Elliott *et al.*, 2007).

Eine ebenfalls reduzierte Virulenz konnte bei Infektionen von Kartoffelknollen mit *Fusarium avenaceum*-Isolaten beobachtet werden, in denen das Enniatinsynthasegen deletiert wurde (Herrmann *et al.*, 1996). **Enniatine** sind Cyclohexadepsipeptide mit phytotoxischen Eigenschaften und werden von einer Reihe *Fusarium*-Species synthetisiert (Burmeister & Plattner, 1987). Bisher unbekannt ist die Wirkungsweise von Enniatinen und den strukturell verwandten Beauvericinen. Für beide Metabolitgruppen werden Funktionen als Chelatoren und membranpermeable Transporter divalenter Kationen diskutiert (Vallejos *et al.*, 1975).

Besonders gut erforscht ist die Wirkung des wirtsspezifischen **HC-Toxins**, benannt nach dem Maispathogen *Helminthosporium carbonum*. HC-Toxin ist ein zyklisches Tetrapeptid und wird von den Genprodukten des *Tox2*-Locus synthetisiert, dessen zentrales Element ein 15,7 kb großes NRPS-Gen darstellt. Entscheidend für die Toxizität ist die Ketofunktion der Fettsäure-Seitenkette. Resistente Maissorten reduzieren das Molekül an dieser Stelle mit Hilfe einer durch das *Hm1*-Gen kodierten Carbonylreduktase (Walton, 2006). Die Toxinwirkung basiert auf der universellen Inhibierung

von Histondeacetylasen. Dadurch gelingt es dem phytopathogenen Pilz, die Transkription pflanzlicher Abwehrgene zu supprimieren (Brosch *et al.*, 1995, 2001). Anhand von Gendelektionen wurde gezeigt, dass HC-Toxin-defiziente *H. carbonum*-Isolate kleinere Läsionen auf suszeptiblen Maispflanzen verursachen als die toxinproduzierende Rasse 1 (Ahn & Walton, 1996).

Victorin ist das wirtsspezifische Toxin des Pathogens *Cochliobolus victoriae*, dem Verursacher von Victoria Blight an Hafer. Ausschließlich Kultivare mit dem chromosomalen Marker Vb sind Victorin-suszeptibel (Wolpert *et al.*, 2002). Pilzisolat ohne die Fähigkeit zur Victorinsynthese sind vollständig apathogen (Scheffler *et al.*, 1967). Victorin bindet mit hoher Affinität an ein 100 kDa Protein, das nur in suszeptiblen Pflanzen vorkommt. Diese Interaktion induziert Reaktionen, die in ihrer Charakteristik apoptotischen Prozessen entsprechen (Coffeen & Wolpert, 2004; Tada *et al.*, 2005; Hoat *et al.*, 2006).

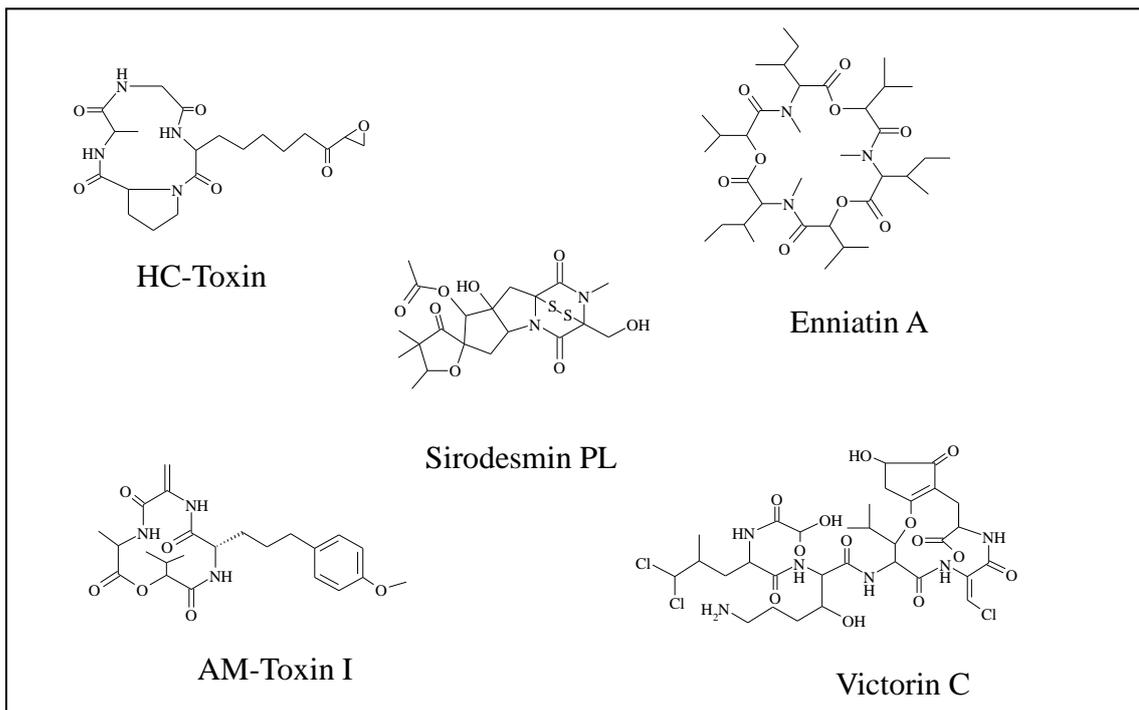


Abb. 6: fungale Toxine mit Peptidgerüst

Beispiele für die Strukturen pilzlicher Metabolite, die in ihrer Funktion als Virulenz- bzw. Pathogenitätsdeterminanten den Infektionsverlauf entscheidend beeinflussen.

Victorin bindet außerdem an ein 15 kDa Protein, das gleichermaßen in suszeptiblen und resistenten Haferpflanzen vorkommt. Beide Targetproteine gehören vermutlich zum Komplex der mitochondrialen Glycin-Decarboxylase, deren Aktivität durch die

Bindung des Toxins gehemmt wird (Navarre & Wolpert, 1995; Curtis & Wolpert, 2002). Ein destruktiver Sekundäreffekt der Toxinwirkung ist die proteolytische Spaltung von RubisCO (Navarre & Wolpert, 1999). Obwohl eine Victorinsynthetase bisher nicht eindeutig identifiziert wurde, weisen strukturelle Merkmale des Toxinmoleküls auf eine nichtribosomale Synthesemaschinerie hin. Bemerkenswert sind drei inkorporierte Chloratome (Nikolskaya *et al.*, 1995; Wolpert *et al.*, 2002).

Zu den wirtschaftlich bedeutendsten Apfelkrankheiten gehört die von *Alternaria alternata* verursachte Blattfleckenkrankheit (Sawamura, 1990). Entscheidend für eine erfolgreiche Infektion suszeptibler Pflanzen ist die Fähigkeit zur Synthese des wirtsspezifischen **AM-Toxins**. Die Deletion des *AMT*-Genes, einer NRPS, führte zum Ausfall der Toxinsynthese und damit zu apathogenen Isolaten (Johnson *et al.*, 2000). AM-Toxine sind zyklische Tetradepsipeptide (Ueno *et al.*, 1975). Physiologische Untersuchungen weisen auf zwei subzelluläre Wirkorte hin. Plastidäre Grana-Membranstackel zerfallen unter Vesikelbildung als Reaktion auf eine Toxinbehandlung (Park *et al.*, 1981). Darüber hinaus verlieren behandelte Zellen Elektrolyte, was auf eine Beeinflussung der Funktion von Membrankanälen bzw. der Membranstruktur hindeutet (Shimomura *et al.*, 1993).

I.4 Polyketidsynthesen

I.4.1 Vorkommen, Struktur und katalytische Aktivität der PKS

Polyketidsynthesen (PKS) katalysieren die Kondensation von Acyleinheiten in einer sequentiellen Reaktionsabfolge, die in ihren mechanistischen Merkmalen dem Ablauf der Fettsäuresynthese stark ähnelt (Shen, 2000). Im Gegensatz zur Fettsäuresynthese, bei der das Kondensationsprodukt in konservierten Reaktionsschritten durch Keto-reduktion, Dehydratation und Enoylreduktion modifiziert wird, gibt es bei der Biosynthese von Polyketiden kein festgelegtes Reaktionsschema im Anschluss an die decarboxylative Kondensation. Die Variabilität der enzymatischen Modifikationen des Kondensationsprodukts trägt somit zur strukturellen Vielfalt der Polyketide maßgeblich bei (Thines *et al.*, 2006).

Anhand unterschiedlicher Domänenarchitektur, Genstrukturen und katalytischer Mechanismen werden PKS in drei Klassen unterteilt (Seshime *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006; van Lanen & Shen, 2008). PKS vom Typ I sind große multifunktionale Proteine. Sie besitzen Domänen mit individueller Enzymaktivität und wurden bisher in Bakterien, Pilzen, Pflanzen sowie in Vertebraten nachgewiesen (Staunton & Weissman, 2001; Castoe *et al.*, 2007).

Typ II-PKS sind bakterielle Multienzymkomplexe und bestehen aus weitgehend monofunktionalen Proteinen (Hertweck *et al.*, 2007). Sie sind bakteriellen Fettsäuresynthasekomplexen funktionell homolog und synthetisieren typischerweise aromatische bzw. zyklische Verbindungen (Thines *et al.*, 2006).

Ein Teil der aromatischen Polyketide mikrobieller und pflanzlicher Herkunft werden durch Typ III-PKS synthetisiert (Thomas, 2001; Dixon *et al.*, 2002; Seshime *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den anderen PKS-Klassen verfügen Vertreter dieses Typs nicht über ACP, d. h. eine Aktivierung durch PPTasen entfällt. Decarboxylierung, Kondensation und Zyklisierung erfolgen an einem katalytisch aktiven Zentrum (Ferrer *et al.*, 1999). Prototyp dieser Enzymklasse ist die pflanzliche Chalconsynthase (Austin & Noel, 2003).

In Analogie zum strukturellen Aufbau von NRPS bestehen Typ I-PKS aus mindestens drei funktional unterschiedlichen Domänen, die für die Synthese von Polyketiden notwendig sind. Acyl- bzw. Aryltransferasen (AT) der N-terminalen Beladungsmodule binden selektiv Starteinheiten. Zahlreiche unterschiedliche AT-Substrate, z. B. Acetyl-CoA, Malonyl-CoA, Propionyl-CoA, Isobutyryl-CoA, Isovaleryl-CoA, Benzoyl-CoA oder Phenylacetyl-CoA, konnten bereits identifiziert werden (Moore & Hertweg, 2002; Bililign *et al.*, 2004; Crawford *et al.*, 2008).

Im nächsten Schritt erfolgt der Transfer der Starteinheit zum Acyl- bzw. Aryl-Carrier-Protein (ACP) sowie die kovalente Verknüpfung der Starteinheit mit der Phosphopantetheinylgruppe. Darüber hinaus binden ACP als zentrale Komponente von Typ I- und Typ II-PKS aber auch kettenverlängernde Einheiten sowie wachsende poly- β -Ketonintermediate und fertige Produkte (Shen, 2000; Li *et al.*, 2003).

Ketosynthase-Domänen (KS) katalysieren die decarboxylative Kondensation der Acyleinheiten. Auf diese Weise fusionieren einzelne Bausteine mit der wachsenden Kette unter Decarboxylierung der COOH-Gruppe (Kwon *et al.*, 2002; Austin *et al.*, 2004).

Fertige Produkte werden schließlich durch eine Terminations- oder Thioesterasedomäne (TE) vom ACP abgespalten (Tsai *et al.*, 2002; Tanovic *et al.*, 2009).

Neben diesen essentiellen Domänen haben modifizierende Domänen einen entscheidenden Anteil an der strukturellen Diversität von Polyketiden. Entsprechend ihrer Funktion lassen sich u. a. Ketoreduktase-, Enoylreduktase-, Methyltransferase- und Dehydratasedomänen unterscheiden (Weissman & Leadlay, 2005; van Lanen & Shen, 2008).

In multimodular organisierten PKS katalysiert typischerweise jedes Modul nur einen Syntheseschritt. Dagegen werden funktionale Domänen iterativer PKS mehrfach hintereinander verwendet, so dass die Produktgröße letztendlich durch die Anzahl der Reaktionszyklen bestimmt wird. Die Verlängerung der wachsenden Produktkette erfolgt mit identischen Acyleinheiten. Dabei entstehen relativ einfach strukturierte Polyketide, deren Komplexität aber durch anschließende Zyklisierung oder reduktive Modifikationen deutlich erhöht wird (Weissman & Leadlay, 2005; Chopra *et al.*, 2008).

Entsprechende Synthesestrategien sind auch bei NRPS zu finden (Schwecke *et al.*, 2006). Im Unterschied zu monomeren NRPS sind PKS aber vermutlich als Homodimere katalytisch aktiv (Sieber *et al.*, 2002).

Fungale Typ I-PKS sind monomodulare Enzyme mit überwiegend iterativem Reaktionsmechanismus. Nichtiterative PKS erzeugen Diketide, die häufig im Zusammenspiel mit iterativen PKS verzweigte Polyketide synthetisieren. Konsequenterweise sind die entsprechenden Gene solcher Syntheseeinheiten in einheitlich regulierten Clustern zusammengefasst (Hendrickson *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 2002).

Sequenzdaten der Genome filamentöser Pilze erlauben Rückschlüsse auf die Anzahl vorhandener PKS. So konnten jeweils 15 PKS in *Fusarium graminearum* und *Fusarium verticillioides* identifiziert werden, 20 in *Botrytis cinerea*, 25 in *Cochliobolus heterostrophus*, 27 in *Aspergillus nidulans* und 7 in *Neurospora crassa* (Kroken *et al.*, 2003; Gaffoor *et al.*, 2005; Marquez-Fernandez *et al.*, 2007).

In zahlreichen wissenschaftlichen Studien wurden die physiologischen Funktionen pilzlicher Polyketide untersucht. Die erhaltenen Resultate bestätigten, dass die strukturelle Vielfalt der PKS-Produkte auch zu einer großen funktionalen Diversität führt. So übernehmen Polyketide u. a. als Elemente hochmolekularer Pigmente Schutzfunktionen, inhibieren als antibiotische Substanzen mikrobielle Kompetitoren oder unterstützen als Toxine die Erschließung von Nahrungsquellen (Rehnstrom & Free, 1996; Yang *et al.*, 1996; Kawamura *et al.*, 1999; Nosanchuk & Casadevall, 2003; Shimizu *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2006).

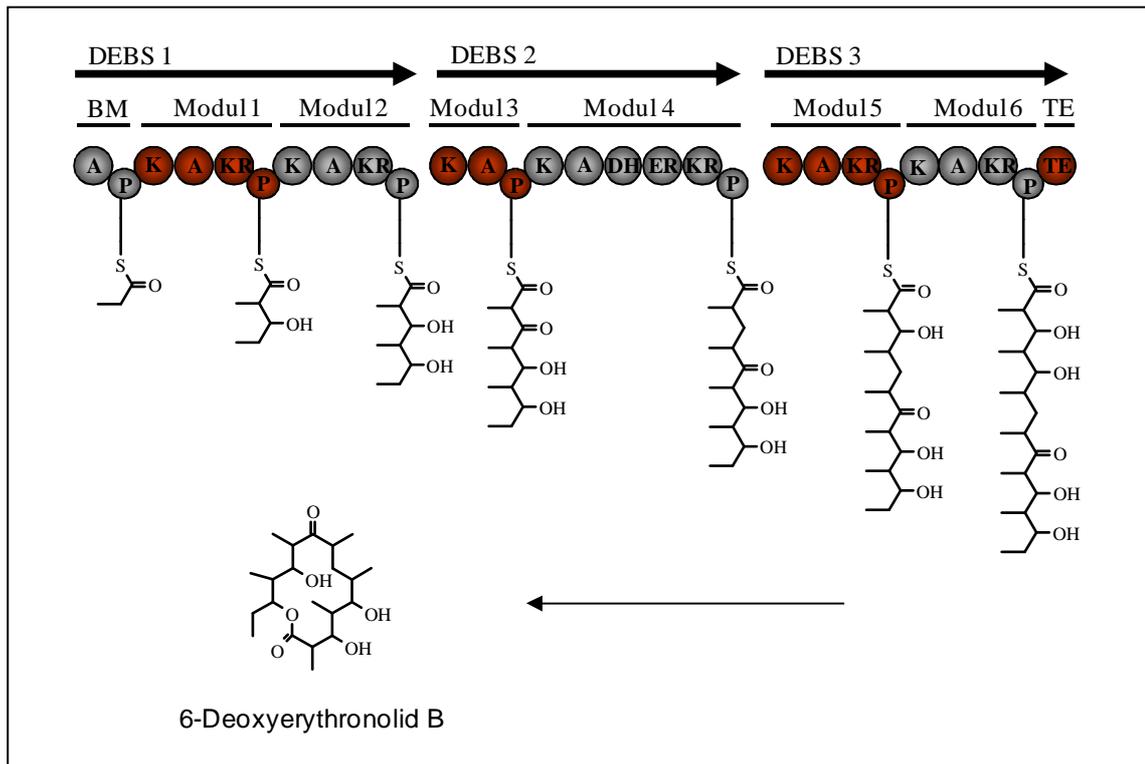


Abb. 7: Synthese komplexer Polyketide: Erythronolid

Der *Saccharopolyspora erythraea* 6-Deoxyerythronolid B Synthase- (DEBS) Multienzymkomplex besteht aus 3 Proteinen (DEBS 1-3), die zusammen 6 zentrale Module bilden. In einer sequentiellen Reaktionsabfolge verlängert jedes der 6 zentralen Module das Ausgangsmolekül um eine Methylmalonyl-CoA-Einheit. Das Beladungsmodul (BM) bindet die Propionyl-CoA-Starteinheit. Sechs funktional unterschiedliche Domänen (A Acyltransferase, DH Dehydratase, ER Enoylreduktase, KR Ketoreduktase, P Acyl-Carrier-Protein, TE Thioesterase) katalysieren Kondensations- und Reduktionsreaktionen. Die Zyklisierung und Freisetzung des linearen Polyketids erfolgt am Terminationsmodul (TM). Um das vollständig aktive Antibiotikum Erythromycin A zu erhalten, wird 6-Deoxyerythronolid B in nachfolgenden Reaktionen hydroxyliert, glykosyliert und methyliert (modifiziert nach Weissmann & Leadley, 2005).

I.4.2 PKS als Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze

Zahlreiche Produkte des Polyketidstoffwechsels fungaler Phytopathogene konnten bis zum heutigen Zeitpunkt identifiziert werden. Aber nur ein geringer Teil dieser Metabolite fördert als Virulenzfaktor die Besiedlung von Wirtspflanzen bzw. entscheidet als Pathogenitätsfaktor über den Erfolg der Infektion.

Ein umfassend analysierter Faktor fungaler Virulenz ist das **T-Toxin** von *Cochliobolus heterostrophus*. Das Toxinmolekül ist ein relativ einfach strukturiertes lineares Polyketid, bestehend aus einer Kette von 35-47 C-Atomen (Kono *et al.*, 1980, 1981). Isolate

mit der Fähigkeit zur Produktion von T-Toxin (Rasse T) sind hochvirulent gegenüber Maispflanzen, die das cytoplasmatisch vererbte *tms*-Gen (Texas male sterile cytoplasm, TMS) für Pollensterilität tragen, während Isolate ohne die Fähigkeit zur T-Toxinsynthese (Rasse O) schwach virulent gegenüber allen Maissorten sind (Turgeon & Lu, 2000; Yoder *et al.*, 1997). Damit gehört das T-Toxin zu den wirtsspezifischen Virulenzfaktoren. Mindestens drei Gene sind an der Synthese von T-Toxin beteiligt. Davon kodieren *PKS1* und *PKS2* jeweils für Polyketidsynthasen, während *DECI* für ein Enzym mit Decarboxylasefunktion kodiert. Die Deletion eines dieser Gene führt zum Ausfall der Toxinproduktion. Gleichzeitig sinkt die Virulenz auf das Niveau der natürlich auftretenden toxfreien Isolate (Yang *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 2002; Baker *et al.*, 2006). Wirksam ist T-Toxin nur im Zusammenspiel mit dem mitochondrial kodierten URF13-Protein suszeptibler TMS-Maissorten. Die Interaktion beider Komponenten führt zur Ausbildung von Poren in der inneren Mitochondrienmembran und damit zum Zusammenbruch des elektrochemischen Gradienten (Levings III, 1990; Korth & Levings III, 1993; Siedow *et al.*, 1995).

Cercosporin, das nichtwirtsspezifische Toxin zahlreicher *Cercospora*-Species, verursacht durch einen völlig anderen Wirkmechanismus Gewebnekrosen und -chlorosen (Kuyama & Tamura, 1957; Daub & Ehrenshaft, 2000). Die Perylenchinonstruktur von Cercosporin ermöglicht eine Absorption von Lichtquanten, wobei angeregte Elektronen letztendlich auf Sauerstoff übertragen werden. Bei diesem Prozess entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche u. a. DNA- und Membranschäden hervorrufen (Valzeno & Pooler, 1987; Ito, 1983; Heiser *et al.*, 1998). Maßgeblich beteiligt an der Cercosporinsynthese in *Cercospora nicotianae* ist das *CTB1*-Gen, welches für eine PKS kodiert. Die gezielte Inaktivierung von *CTB1* führte zu Cercosporin-defizienten Mutanten mit reduzierter Virulenz (Choquer *et al.*, 2005; Dekkers *et al.*, 2007).

Cercosporine und **Elsinochrome** verbindet ein hohes Maß an struktureller Identität. Daraus resultiert auch ein identischer Wirkmechanismus der Elsinochrome, welche von verschiedenen Pathogenen der Gattung *Elsinoë* produziert werden und Blattnekrosen an Zitrusgewächsen verursachen. Durch die gezielte Inaktivierung des PKS-Gens *EfPKS1* aus *Elsinoë fawcettii* wurden Elsinochrom-defiziente Isolate mit stark verringerter Virulenz erzeugt (Daub *et al.*, 2005; Liao & Chung, 2008 a,b).

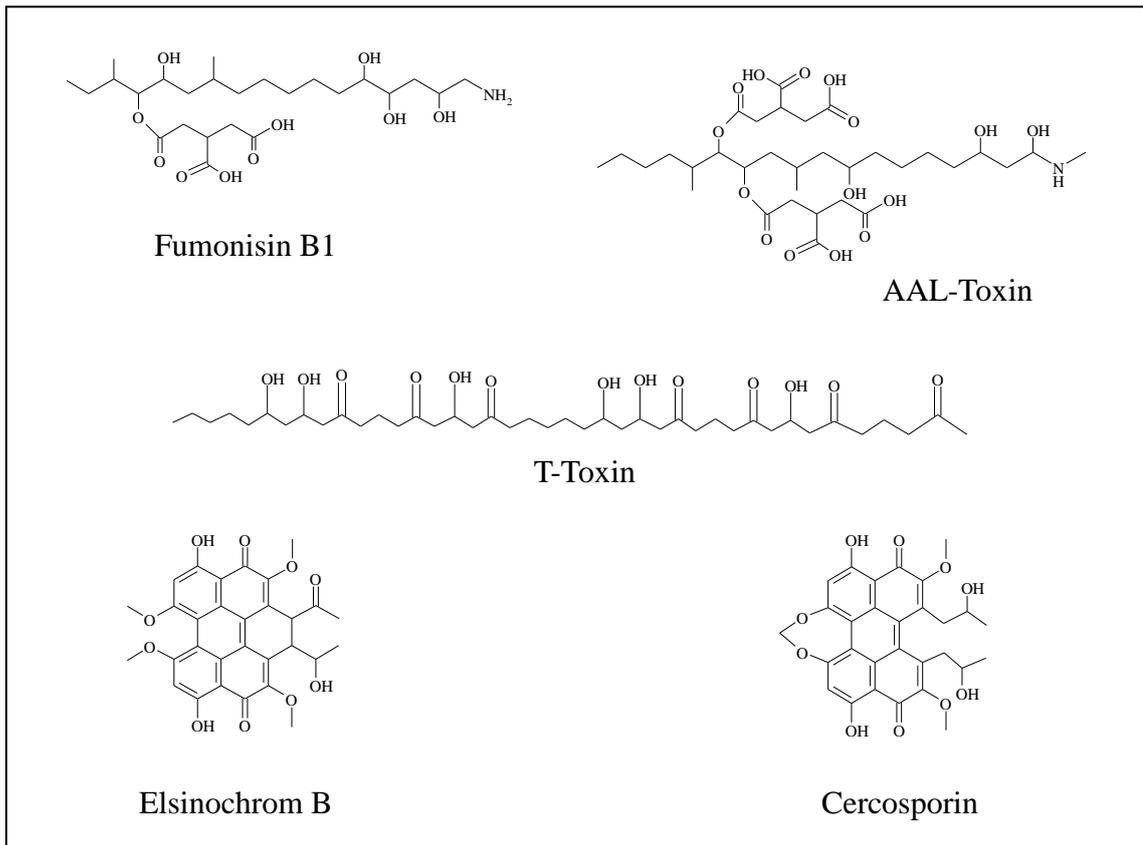


Abb. 8: Toxine mit Ketidgrundgerüst

Beispiele für die Strukturen pilzlicher Metabolite, die in ihrer Funktion als Virulenz- bzw. Pathogenitätsdeterminanten den Infektionsverlauf entscheidend beeinflussen.

Das **AAL-Toxin** des Tomatenpathogens *Alternaria alternata f.sp. lycopersici* ist ein wirtsspezifischer Pathogenitätsfaktor (Gilchrist & Grogan, 1976; Akamatsu *et al.*, 1997). Strukturell eng verwandt mit Dihydroxysphingosin, dem zentralen Baustein der Sphingolipide, inhibiert es als Struktur analogon kompetitiv die Ceramidsynthese und verursacht dadurch letale Membranschäden (Abbas *et al.*, 1994; Abbas *et al.*, 1998). Insertionsanalysen führten zur Identifizierung des *ALT1*-Gens, welches für eine Typ I-Polyketidsynthase kodiert (Akamatsu, 2003). Indirekt bestätigt wurde die Beteiligung von *ALT1* an der Synthese von AAL-Toxin durch die funktionale Komplementation einer *Fusarium verticillioides FUM1*-Mutante (Zhu *et al.*, 2008). Erstaunlicherweise stellt das unter Beteiligung der *FUM1*-PKS vom Maispathogen *Fusarium verticillioides* synthetisierte Fumonisin keinen Virulenzfaktor für dieses Pathogen dar, obwohl Fumonisin und AAL-Toxin sich strukturell ähneln und gleiche physiologische Wirkungen in den jeweiligen Wirten hervorrufen (Desjardins *et al.*, 2002; Brandwagt *et al.*, 2002, Marasas *et al.*, 2004).

Abgesehen von toxischen Polyketiden als Determinanten von Virulenz oder Pathogenität produziert die Mehrzahl fungaler Phytopathogene braune bis schwarze Pigmente, sogenannte **Melanine** (Langfelder *et al.*, 2003). Melanine bestehen aus Phenol- oder Indoleinheiten und polymerisieren in der Zellwand, wobei eine engmaschige, Licht- und UV-absorbierende sowie mechanisch strapazierfähige Schicht gebildet wird. Aus diesen Eigenschaften resultieren vielfältige biologische Funktionen. So schützen Melanine vor UV-Strahlung, Austrocknung, Radikalen und Osmolyse, inhibieren hydrolytische Enzyme, adsorbieren toxische Substanzen und verstärken Zellwände (Henson *et al.*, 1999 und Zitate darin).

Im Stoffwechsel phytopathogener Pilze verläuft die Melaninsynthese im Allgemeinen über das Intermediat 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphtalen (T4HN), selten über *L*-Dihydroxyphenylalanin (DOPA; Butler & Day, 1999; Solomon *et al.*, 2004). Zentraler Reaktionsschritt im Verlauf der DHN-Synthese ist die Verknüpfung von fünf Acetat-einheiten zur Pentaketid-Grundstruktur durch eine iterative Typ I-PKS (Bell & Wheeler, 1986; Fujii *et al.*, 2000).

Melaninschichten in der inneren Zellwand von Appressorien wirken als selektive Membranen, so dass niedermolekulare Osmolyte zurückgehalten werden, Wasser aber in die Zelle eindringen kann. Auf diese Weise generieren pilzliche Pathogene, darunter *C. graminicola*, *M. grisea* oder *Phyllostica ampelecida*, Drücke von bis zu 8 MPa in den Appressorien und nutzen diesen enormen hydrostatischen Turgor zur mechanischen Penetration der Wirtsepidermis (Bechinger *et al.*, 1999; Deising *et al.*, 2000; Wirsal *et al.*, 2004). Phytopathogene Pilze, die mit Hilfe melanisierter Appressorien Wirtsgewebe durch die Generierung hoher hydrostatischer Drücke penetrieren, verlieren mit der Fähigkeit zur Synthese von Melanin auch ihre Pathogenität (Howard, 1997; Kubo *et al.*, 1999; Wilson & Talbot, 2009).

I.5 PKS/NRPS-Hybride

Polyketidsynthasen und Nichtribosomale Peptidsynthasen verwenden eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate für die Synthese von Sekundärmetaboliten. Zusätzlich ermöglicht eine variable Anordnung modifizierender Domänen die Herstellung von Produkten, die durch eine nahezu unbegrenzte strukturelle Diversität gekennzeichnet sind.

Weitere Strukturmerkmale, verbunden mit potentiell neuartigen Moleküleigenschaften, ergeben sich aus der Kombination von Polyketiden und Nichtribosomalen Peptiden.

Tatsächlich enthalten alle bisher analysierten Genome filamentöser Ascomyceten PKS/NRPS-Hybridgene. Darüber hinaus besteht aber auch die Möglichkeit, dass unabhängig exprimierte PKS und NRPS als Multienzymkomplexe synthetisch aktiv sind bzw. individuelle PKS/NRPS in aufeinanderfolgenden Syntheseschritten an der Entstehung des Hybridprodukts mitwirken (Böhnert *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005).

In *Magnaporthe grisea* wurden durch *in silico* Genomanalysen insgesamt sieben putative PKS/NRPS-Hybridgene entdeckt. Bisher konnte mit *ACE1* (Avirulence Conferred Enzyme) lediglich eines dieser Gene molekularbiologisch näher charakterisiert werden. Deletionsexperimente zeigten, dass Pilzisolat mit funktionalem *ACE1* Abwehrreaktionen in Reissorten mit dem Resistenzgen *Pi33* auslösen (Berruyer *et al.*, 2003).

ACE1 kodiert für ein putatives PKS/NRPS-Fusionsprotein. Exprimiert wird das cytoplasmatisch lokalisierte Protein ausschließlich im Appressorium. Der Austausch einer einzigen Aminosäure im katalytischen Zentrum der *ACE1*-Ketoacylsynthase-domäne verhindert die Erkennung durch resistenten *Pi33*-Reis und unterbindet damit eine Abwehrreaktion. Daher induziert vermutlich nicht das Genprodukt, sondern das Syntheseprodukt der *ACE1*-PKS/NRPS pflanzliche Abwehrreaktionen (Böhnert *et al.*, 2004, Collemare *et al.*, 2008).

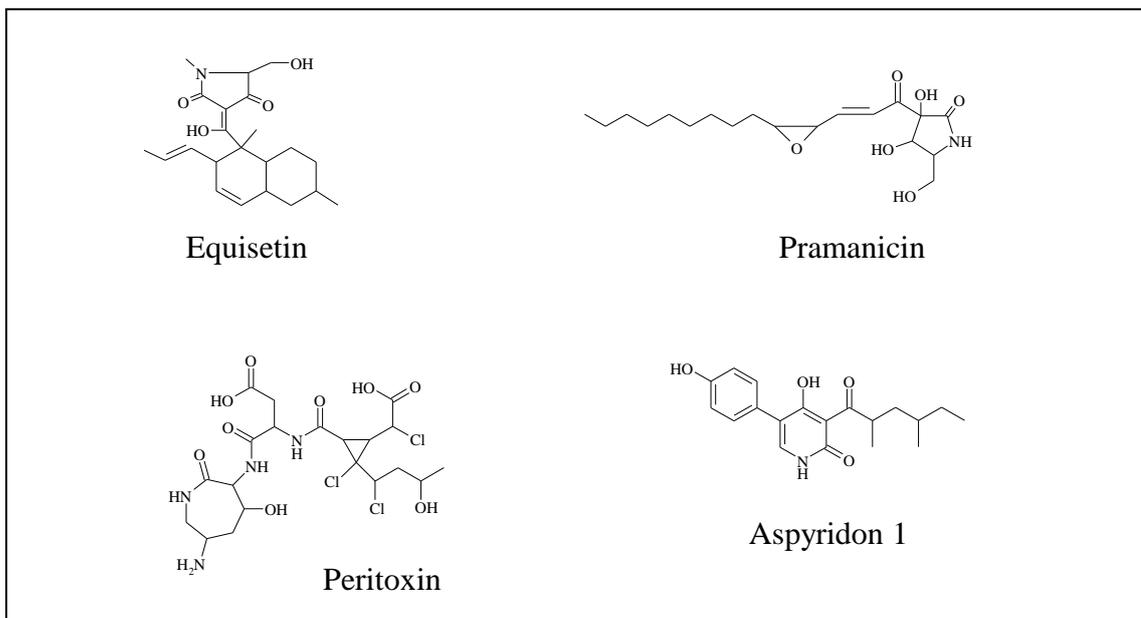


Abb. 9: Metabolite mit Peptid/Ketid-Grundgerüst

Beispiele für die Strukturen fungaler Peptid/Ketid-Hybridmetabolite.

Fusarium moniliforme und *Fusarium venenatum* synthetisieren das Mycotoxin Fusarin mit Hilfe einer Hybrid-PKS/NRPS (Song *et al.*, 2004). Strukturell ähnliche Moleküle werden von einigen weiteren phytopathogenen Pilzen hergestellt, wie z. B. **Equisetin** von *Fusarium heterosporum* und **Pramanicin** von verschiedenen *Stagonospora*-Species (Rees *et al.*, 2007). Allerdings sind für diese Substanzen keine detaillierten Informationen über Synthesewege, beteiligte Gene bzw. Enzyme sowie die biologische Bedeutung der Metabolite verfügbar. Eine Ausnahme bildet **Peritoxin**. Das wirtsspezifische Toxin des Hirsepathogens *Periconia circinata* besteht aus einem chlorierten Polyketid/Peptid-Hybrid (Macko *et al.*, 1992; Churchill *et al.*, 2001). Peritoxindefiziente Isolate sind nicht in der Lage, susceptible Hirse-Genotypen zu infizieren (Dunkle & Macko, 1995).

Problematisch für die Analyse sekundärer Metabolite ist die Tatsache, dass Mikroorganismen bestimmte Substanzen unter Laborbedingungen nicht oder nur in sehr geringen Mengen synthetisieren. Unter Verwendung von DNA-Rekombinationstechniken ist es jedoch möglich, konstitutive Promotoren zur Expression des Zielgens einzusetzen. Dadurch kann die Anzahl synthetisch aktiver Proteine, die an der Herstellung eines bestimmten Produkts beteiligt sind, enorm gesteigert werden. Auf diesem Weg gelang die Identifizierung von **Aspyridon** als Produkt der APD-Polyketid-Peptid-Synthase aus *Aspergillus nidulans* (Bergmann *et al.*, 2007).

I.6 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll die 4'-Phosphopantetheinyltransferase des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* genetisch und biochemisch charakterisiert werden. Im Mittelpunkt steht dabei die Frage nach der Bedeutung der Sfp-PPTase als potentieller Faktor pilzlicher Virulenz und Pathogenität.

Die Erzeugung PPTase-defizienter Isolate durch die gezielte Inaktivierung von *CgPPT1* in Verbindung mit detaillierten Infektionsstudien soll Informationen über die Funktion der *C. graminicola* 4'-PPTase liefern. Von besonderem Interesse ist dabei der Einfluss von *CgPPT1* auf spezifische Phasen des Infektionszyklus sowie die Morphologie differenzierter Infektionsstrukturen.

Darüber hinaus sind Untersuchungen zur Lokalisation und Expression des Genprodukts geplant. Ein wichtiger Bestandteil der funktionellen Charakterisierung besteht im Nachweis der Phosphopantetheinylierung von ACP oder PCP.

Informationen zur Funktion und Bedeutung PP-abhängiger Enzyme sollen durch die Isolierung und Deletion des Melaninsynthase- und α -Aminoadipat-Reduktase-Gens aus *C. graminicola* gewonnen werden.

Durch Analysen des Metabolitspektrums sollen Polyketide bzw. nichtribosomale Peptide identifiziert und hinsichtlich ihrer biologischen Funktion charakterisiert werden. Von besonderem Interesse sind dabei Substanzen mit phytotoxischen Eigenschaften.

II Material und Methoden

II.1 Biologisches Material

II.1.1 Pilzisolat

II.1.1.1 *Colletotrichum graminicola*

Referenzobjekt und Ausgangsmaterial der experimentellen Ansätze war das Wildtyp-Isolat CgM2 von *Colletotrichum graminicola* (Panaccione *et al.*, 1988; Anderson & Nicholson, 1996; Bergstrom & Nicholson, 1999).

Die Kultivierung erfolgte auf Haferflockenagar (**M1**) in Petrischalen bei konstant 23°C im WiseCube-Inkubator (Daihan Scientific, Seoul, Korea) unter ständiger NUV-Beleuchtung (Röhrentyp: TLD36W/08; Philips, Hamburg) zur Stimulation der Konidienbildung. Flüssigkulturen wurden in Kompletmedium (**M2**) bei konstant 23°C und 100 rpm im Unitron-Inkubator (Infors, Bottmingen, Schweiz) angezogen.

Konidien aller verwendeten Isolate wurden von OMA-Kulturen (**M1**) in sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen bzw. durch Filtration (190 mm Rundfilter, Carl Roth, Karlsruhe) von Flüssigmedium (**M2**) gewonnen und in 25% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert.

II.1.1.2 *Magnaporthe oryzae*

Referenzobjekt für die Untersuchungen an *Magnaporthe oryzae* war das Isolat 70-15 (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA).

Die Kultivierung erfolgte auf CMM-Agar (**M14**) bei 28°C und voller Beleuchtung unter Tagbedingungen (16 h) bzw. 25°C und Dunkelheit unter Nachtbedingungen (8 h) im Friocell-Klimaschrank (MMM Medcenter, München). Flüssigkulturen wurden in CMM-Flüssigmedium (**M13**) oder HMG-Medium (**M12**) bei konstant 28°C und 100 rpm im Unitron-Inkubator (Infors, Bottmingen, Schweiz) angezogen.

Konidien des Wildtyp-Isolats 70-15 wurden von CMM-Agar (**M14**) ab gespült, in sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und in 25% (v/v) Glycerin bei -80°C gelagert. Da

$\Delta Moppt1$ -Deletionsmutanten keine Sporen bildeten, wurden Agarblöckchen mit dem Myzel dieser Isolate aus CMM-Agar (**M14**) geschnitten und in 25% (v/v) Glycerin dauerhaft bei -80°C gelagert.

II.1.2 Pflanzenmaterial

II.1.2.1 *Zea mays*

Die Anzucht von Maispflanzen der Sorte Nathan (KWS, Einbeck) erfolgte in gedämpfter Komposterde unter kontrollierten Umweltbedingungen. Drei Pflanzen wurden pro Topf (\varnothing 12 cm) angezogen. Folgende Parameter wurden standardmäßig für den Betrieb der Klimakammer AR-75L (Percival Scientific, Perry, USA) verwendet:

16 h Tag

- 70% Lichtintensität der Leuchtstoffröhren, Glühbirnen aktiviert
- 50% relative Luftfeuchtigkeit
- 25°C

8 h Nacht

- Dunkelheit
- 70% relative Luftfeuchtigkeit
- 20°C .

II.1.2.2 *Allium cepa*

Küchenzwiebeln der Sorte Grano wurden als unbehandeltes Bioprodukt im Lebensmitteleinzelhandel erworben.

II.1.2.3 *Oryza sativa*

Die Anzucht von Reispflanzen der Sorte CO 39 erfolgte in Einheitserde vom Typ ED73 (Werkverband e.V., Frankfurt/Main). Fünf Pflanzen wurden pro Topf (\varnothing 12 cm) angezogen. Folgende Parameter wurden standardmäßig für den Betrieb des Klimaschranks (Versatile Enviromental Test Chamber; SANYO, München) verwendet:

16 h Tag

- maximale Lichtintensität
- 80% relative Luftfeuchtigkeit
- 27°C

8 h Nacht

- Dunkelheit
- 70% relative Luftfeuchtigkeit
- 27°C.

II.1.3 Bakterienkultur**II.1.3.1 *Escherichia coli***

Escherichia coli DH10B (Grant *et al.*, 1990; Durfee *et al.*, 2008) bzw. BL21 (DE3) (Studier & Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990) wurden in Petrischalen auf LB-Agar (**M4**) bei 37°C im Brutschrank (Modell Function Line Serie 700; Kendro Laboratory Products, Langenselbold) angezogen.

Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte durch Animpfen von LB-Flüssigmedium (**M3**) mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation bei 37°C und 200 rpm im Kulturschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA). Die Zugabe von Antibiotika erfolgte entsprechend den verwendeten Selektionsmarkern (s. II.2.2). Petrischalen und Flüssigkulturen wurden, falls erforderlich, bei 4°C im Kühlschrank bis zu vier Wochen gelagert. Eine dauerhafte Aufbewahrung erfolgte in LB-Flüssigmedium (**M3**) mit 7% (v/v) DMSO bei -80°C.

Stamm	Genotyp
BL12 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>])
DH10B	F ⁻ <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74</i> Φ80 <i>lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> λ ⁻

II.1.3.2 *Agrobacterium tumefaciens*

A. tumefaciens AGL1 (Lazo *et al.*, 1991) wurde in Petrischalen auf LB-Agar (**M4**) mit Rifampicin (**L20**) bei 28°C im Brutschrank (Modell Function Line Serie 700; Kendro Laboratory Products, Langenselbold) angezogen. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte durch Animpfen von LB-Flüssigmedium (**M3/L20**) mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation bei 28°C und 200 rpm im Kulturschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA).

Die Zugabe von Antibiotika erfolgte entsprechend den verwendeten Selektionsmarkern (s. II.2.2). Petrischalen und Flüssigkulturen wurden, falls erforderlich, bei 4°C im Kühlschrank bis zu vier Wochen gelagert. Eine dauerhafte Aufbewahrung erfolgte in LB-Flüssigmedium (**M3/L20**) mit 7% (v/v) DMSO bei -80°C.

Stamm	Genotyp
AGL1 (BAA-101) (ATCC, Manassas, USA)	AGL0 <i>recA::bla</i> pTIBo542deltaT <i>Mop+</i> <i>CbR</i> (50648)

II.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth (Karlsruhe) bezogen. Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten stammen aus dem Angebot von MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Auf weitere Bezugsquellen molekularbiologischer Produkte wird an den entsprechenden Textstellen verwiesen. Synthetische Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und biomers.net (Ulm) bezogen. Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma B. Heinemann (Duderstadt) erworben.

II.2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen

II.2.1.1 Nährmedien

M1: Haferflockenagar, Oat Meal Agar, OMA (Koneman *et al.*, 1997)

In 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden 50 g Haferflocken in einem Mixer (Waring Blender BB 90 E; Waring, Torrington, USA) 6x 20 s auf höchster Stufe homogenisiert und mit 500 ml flüssigem 2,4% (w/v) Wasseragar gemischt. Beide Ansätze wurden vereint und 30 min autoklaviert.

M2: Kompletmedium, Complete Medium, CM (mod. nach Leach *et al.*, 1982)

Je 10 ml **L1** und **L2** wurden zusammen mit 10 g Glucose, 1 g Hefeextrakt sowie 1 g Caseinhydrolysat (Difco Laboratories, Augsburg) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ in einem Gesamtvolumen von 1000 ml gelöst und autoklaviert.

M3: LB-Flüssigmedium, Lysogeny Broth (Bertani, 2004)

In einem Gesamtvolumen von 1000 ml wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und autoklaviert. Antibiotika, IPTG bzw. X-Gal wurden nach dem Abkühlen je nach Anwendung in Verdünnungen von 1:1000 zugegeben (Stammlösungen s. II.2.1.3).

M4: LB-Agar

M3 mit 1,5% (w/v) Agar-Agar. Antibiotika, IPTG bzw. X-Gal wurden nach dem Abkühlen auf etwa 40°C je nach Anwendung in Verdünnungen von 1:1000 zugegeben (Stammlösungen s. II.2.1.3).

M5: Synthetisches Minimalmedium, SMM

In einem Gesamtvolumen von 900 ml wurden 10 g Glucose; 1 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 0,2 g KH_2PO_3 ; 0,25 g MgSO_4 ; 0,054 g NaCl und 15 g Agarose in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und autoklaviert. Lysin (**L13**) wurde nach dem Abkühlen auf etwa 40°C in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

M6: Synthetisches Komplettmedium, SCM

In einem Gesamtvolumen von 900 ml wurden 20 g Glucose; 1,7 g YNB ohne Aminosäuren (BD, Heidelberg); 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 15 g Agarose in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und autoklaviert. Bathophenanthrolindisulfonat (**L14**), Desferri-Ferri-chrom (**L15**) bzw. Desferri-Coprogen (**L16**) sowie 100 ml 10x Aminosäuremix (**L23**) wurden nach dem Abkühlen auf etwa 45°C in Endkonzentrationen von 100 μM bzw. 50 μM zugegeben.

M7: Kartoffeldextrose-Agar, Potato Dextrose Agar, PDA

In 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden 24 g PDA (BD, Heidelberg, Germany) gelöst und autoklaviert. Hygromycin B (**L10**) bzw. Nourseothricin (**L17**) wurde nach dem Abkühlen auf etwa 45°C in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ zugegeben. Die Zugabe von Bengalrosa und H_2O_2 erfolgte nach dem Abkühlen auf etwa 45°C in Endkonzentrationen von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bzw. 0,0075% (v/v).

M8: Regenerationsmedium

In 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden 342,3 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Casein und 6 g Agar-Agar gelöst und autoklaviert. Regenerationsmedium mit eingebetteten Protoplasten wurde zum Überschichten von Selektionsmedium (**M9**) verwendet.

M9: Selektionsmedium

M8 mit 1,5% (w/v) Agar-Agar und 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin B (**L10**) bzw. 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nourseothricin (**L17**).

M10: modifiziertes Regenerationsmedium

In 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden 342,3 g Saccharose; 1,7 g YNB ohne Aminosäuren (BD, Heidelberg); 5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie 6 g Agarose gelöst und autoklaviert. Modifiziertes Regenerationsmedium mit eingebetteten Protoplasten wurde zum Überschichten von modifiziertem Selektionsmedium (**M9**) verwendet.

M11: modifiziertes Selektionsmedium

M10 mit 1,5% (w/v) Agarose.

M12: HMG-Medium

In 1000 ml H₂O_{bidest} wurden 4 g Hefeextrakt, 10 g Glucose sowie 10 g Malzextrakt (Dr. Fränkle & Max Eck, Fellbach) gelöst und autoklaviert. Für die Kultivierung von *M. grisea* PPTase-Deletionsmutanten wurde nach dem Abkühlen Lysin (**L13**) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

M13: CMM- (Complete Medium Magnaporthe) Flüssigmedium

In einem Gesamtvolumen von 1000 ml wurden 10 g Glucose, 1 g Casamino Acids (BD, Heidelberg), 2 g Bacto Pepton (Becton Dickinson, Heidelberg), 1 g Bacto Yeast Extract (BD, Heidelberg) mit 50 ml Nitratsalzlösung (**L18**) und 1 ml Spurenelementlösung (**L19**) in H₂O_{bidest} gelöst und autoklaviert. Für die Kultivierung von *M. grisea* PPTase-Deletionsmutanten wurde nach dem Abkühlen auf etwa 45°C Lysin (**L13**) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

M14: CMM- (Complete Medium Magnaporthe) Agar

M13 mit 1,5% (w/v) Agar-Agar. Für die Kultivierung von *M. grisea* PPTase-Deletionsmutanten wurde nach dem Abkühlen Lysin (**L13**) in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben.

M15: AIM-Flüssigmedium

In einer 1 Liter Flasche wurden 900 ml H₂O_{bidest} autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf etwa 40°C wurden folgende Medienbestandteile sterilfiltriert (NYL Filter Unit 500 ml, Porengröße 0,2 µm; Nalgene, Rochester, USA) zugegeben:

0,8 ml K-Puffer (**P31**)

20 ml MN-Lösung (**L24**)

5 ml Spurenelementlösung II (**L21**)

1 ml CaCl₂-Lösung (1%)

10 ml FeSO₄-Lösung (0,01%)

5 ml Glucose-Lösung (20%)

5 ml Glycerin-Lösung (50%)

40 ml MES-Lösung (1M)

2,5 NH₄NO₃-Lösung (20%)

2 ml 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyacetophenon.

M16: AIM-Agar

M16 mit 1,5% (w/v) Agar-Agar.

M17: CMM-Selektionsmedium

M14 mit 300 µg/ml Cefotaxim (**L22**), 300 µg/ml Hygromycin B (**L10**) und 50 µg/ml Lysin (**L13**).

Sämtliche Medien wurden, falls nicht anders angegeben, 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Die Zugabe von hitzesensitiven Bestandteilen erfolgte nach dem Abkühlen auf 40-45°C.

II.2.1.2 Puffer

P1: DNA-Extraktionspuffer I

7 M Harnstoff

2% (w/v) SDS

5 mM EDTA

50 mM Tris-HCl

pH 8,0

P2: DNA-Extraktionspuffer II

150 mM NaCl

5 mM EDTA

50 mM Tris-HCl

pH 8,0

P3: TE-Puffer

0,1 mM EDTA,

10 mM Tris-HCl

pH 8,0

P4: Resuspendierungspuffer

10 mM EDTA
50 µg/ml RNase A
25 mM Tris-HCl
pH 8,0

P5: RNA-Lysispuffer

4,5 M Guanidinium-Thiocyanat
2% (w/v) N-Lauroylsarcosin
1% (v/v) β-Mercaptoethanol (vor Gebrauch zusetzen)
50 mM Hepes-KOH
pH 7,5

P6: TES-Puffer

5 mM EDTA
1% (w/v) SDS
10 mM Tris-HCl
pH 7,4

P7: TAE-Puffer

20 mM Natriumacetat
2 mM EDTA
40 mM Tris-HCl
pH 8,3

P8: 6x DNA-Probenpuffer

30% (v/v) Glycerin
60% 10x TAE-Puffer (**P7**)
0,25% (w/v) Bromphenolblau

P9: 10x RNA-Laufpuffer

50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
20% (v/v) Formaldehyd
200 mM MOPS
pH 7,0

P10: RNA-Probenpuffer

55% (v/v) deionisiertes Formamid
10% (v/v) 10x RNA-Laufpuffer (P9)
6,5% (v/v) Formaldehyd
7% (v/v) Glycerin
21,35% H₂O_{bidest}
0,15% (w/v) Bromphenolblau

P11: Transferpuffer, 20x SSC

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,5

P12: Hybridisierungspuffer

5x SSC (P11)
0,1% (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin
0,02% (w/v) SDS
1% (w/v) Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
autoklaviert

P13: 2x Waschpuffer I

2x SSC (P11)
0,1% (w/v) SDS

P14: 0,5x Waschpuffer I

0,5x SSC (P11)
0,1% (w/v) SDS

P15: Waschpuffer II

150 mM NaCl
0,3% (v/v) Tween 20
100 mM Maleinsäure-NaOH
pH 7,5

P16: Blockingpuffer

1% (w/v) Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)
in Waschpuffer II (P15)
autoklaviert

P17: Detektionspuffer

100 mM NaCl
100 mM Tris-HCl
pH 9,5
autoklaviert

P18: STC-Puffer

1 M Sorbitol
50 mM CaCl₂
50 mM Tris-HCl
pH 8,0
autoklaviert

P19: PEG-Puffer

40% (w/v) PEG 4000
600 mM KCl
50 mM CaCl₂
50 mM Tris-HCl
pH 8,0

P20: Sequenzierpuffer

125 mM (w/v) EDTA
3 M (w/v) Natriumacetat
pH 5,0

P21: Zellaufschlusspuffer

1 mM DTT
20 mM Tris-HCl
pH 8,0

P22: DEAE-Puffer

1 mM DTT
20 mM Tris-HCl
pH 8,0

P23: HT-Puffer

500 mM NaCl
20 mM Imidazol
20 mM HEPES-NaOH
pH 7,5

P24: HP-Puffer

50 mM NaCl
20 mM HEPES-NaOH
pH 7,5

P25: HL-Puffer

1 mM DTT
10 mM MgCl₂
20 mM HEPES-NaOH,
pH 7,5

P26: Storage-Puffer

1 mM DTT
10 mM MgCl₂
20 mM HEPES-NaOH,
pH 7,5

P27: 2x SDS-Probenpuffer

20% (v/v) Glycin
4% (w/v) SDS
0,02% (w/v) Bromphenolblau
0,2 M DTT
125 mM Tris-HCl
pH 6,8

P28: SDS-Laufpuffer

0,96 M Glycin
0,5% (w/v) SDS
0,125 M Tris-Base
pH 8,3

P29: PBS

10 mM Na₂HPO₄
1,75 mM KH₂PO₄
13,7 mM NaCl
2,65 mM KCl
pH 7,0
autoklaviert

P30: 2x PP-Reaktionspuffer

20 mM MgCl₂
100 mM HEPES-KOH
pH 7,0

P31: K-Puffer200 g K_2HPO_4 145 g KH_2PO_4 *ad* 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

autoklaviert

Die Puffer wurden, wenn angegeben, 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert.

II.2.1.3 Lösungen**L1: Stammlösung A**50 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ *ad* 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

autoklaviert

L2: Stammlösung B10 g KH_2PO_3 12,5 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 2,7 g NaCl *ad* 500 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$

autoklaviert

L3: Denaturierungslösung0,2 M NaOH 1% (w/v) SDS **L4: Neutralisierungslösung**

3 M Natriumacetat

pH 5,0

L5: Coomassie-Färbelösung

0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

40% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) H₂O_{bidest}

L6: Coomassie-Entfärbelösung

40% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

50% (v/v) H₂O_{bidest}

L7: Säurefuchsin-Lactophenol

0,1% (w/v) Säurefuchsin

20% (v/v) Milchsäure

20% (v/v) Phenol

40% (v/v) Glycerin

20% (v/v) H₂O_{bidest}

L8: Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L9: Kanamycin-Stammlösung

50 mg/ml in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L10: Hygromycin-Stammlösung

50 mg/ml Hygromycin B (InvivoGen, Toulouse, Frankreich) in **P29**, steril geliefert

L11: IPTG-Stammlösung

100 mM IPTG in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L12: X-Gal-Stammlösung

50 mg/ml X-Gal in DMSO

L13: Lysin-Stammlösung

50 mg/ml *L*-Lysin in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L14: Bathophenanthrolindisulfonat- (BPS) Stammlösung

100 mM BPS (Sigma-Aldrich, München) in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L15: Desferri-Ferrichrom-Stammlösung

50 mM Desferri-Ferrichrom (Sigma-Aldrich, München) in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L16: Desferri-Coprogen-Stammlösung

50 mM Desferri-Coprogen (EMC microcollections, Tübingen) in H₂O_{bidest},
sterilfiltriert

L17: Nourseothricin-Stammlösung

100 mg/ml Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena) in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L18: Nitratsalzlösung (20x)

10,4 g KCl

30,4 g KH₂PO₄

10,4 g MgSO₄ x 7 H₂O

120 g NaNO₃

ad 1000 ml H₂O_{bidest}

autoklaviert

L19: Spurenelementlösung (1000x)

0,17 g CoCl₂ x 6 H₂O

0,16 g CuSO₄ x 5 H₂O

0,5 g FeSO₄ x 7 H₂O

1,1 g H₃BO₃

0,5 g MnCl₂ x 4 H₂O

5,0 g Na₂EDTA x 2 H₂O

0,15 g Na₂MoO₄ x 2 H₂O

2,2 g ZnSO₄ x 7 H₂O

ad 80 ml H₂O_{bidest}

L20: Rifampicin-Stammlösung

50 mg/ml in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L21: Spurenelemente AIM (1000x)

100 mg CuSO₄ x 5 H₂O

100 mg FeSO₄ x 7 H₂O

100 mg H₃BO₃

100 mg MnSO₄ x H₂O

100 mg ZnSO₄ x 7 H₂O

ad 80 ml H₂O_{bidest}

autoklaviert

L22: Cefotaxim-Stammlösung

300 mg/ml Cefotaxim (Fresenius CABI, Bad Homburg) in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L23: 10x Aminosäuremix

21 mg Adenin	85,6 mg <i>L</i> -Phenylalanin
85,6 mg <i>L</i> -Alanin	85,6 mg <i>L</i> -Asparagin
85,6 mg <i>L</i> -Arginin	85,6 mg <i>L</i> -Threonin
85,6 mg <i>L</i> -Aspartat	85,6 mg <i>L</i> -Serin
85,6 mg <i>L</i> -Cystein	85,6 mg <i>L</i> -Glutamin
85,6 mg <i>L</i> -Glutamat	85,6 mg <i>L</i> -Glycin
85,6 mg <i>L</i> -Histidin	85,6 mg <i>L</i> -Tryptophan
85,6 mg myo-Inositol	8,6 mg <i>p</i> -Aminobenzoat
85,6 mg <i>L</i> -Isoleucin	85,6 mg <i>L</i> -Tyrosin
173,4 mg <i>L</i> -Leucin	85,6 mg Uracil
85,6 mg <i>L</i> -Lysin	85,6 mg <i>L</i> -Valin
85,6 mg <i>L</i> -Prolin	85,6 mg <i>L</i> -Methionin

ad 100 ml H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L24: MN-Lösung

30 g MgSO₄ x 7 H₂O

15 g NaCl

ad 1 l H₂O_{bidest}

autoklaviert

Die Lösungen wurden, sofern angegeben, 20 min bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Die Filtersterilisation hitzesensitiver Lösungen erfolgte unter Verwendung von CA-Filtern mit 0,2 µm Porengröße.

II.2.2 Vektoren**pGEM-TEasy**

(Promega, Mannheim)

„High copy“-Plasmid für T/A-Klonierungen von PCR-Produkten und Amplifikation in *E. coli*. Ermöglicht Blau-Weiß-Selektion von Transformanten (s. II.4.5.4.3). Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin.

pCR2.1

(Invitrogen, Karlsruhe)

„High copy“-Plasmid für T/A-Klonierungen von PCR-Produkten und Amplifikation in *E. coli*. Ermöglicht Blau-Weiß-Selektion von Transformanten. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin und Kanamycin.

pJET2.1/blunt

(Fermentas, St. Leon-Rot)

„High copy“-Plasmid für blunt end Klonierungen von PCR-Produkten und Amplifikation in *E. coli*. Ermöglicht lebend-tot-Selektion von Transformanten (s. II.4.5.4.3). Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin.

- pAN7-1** (Punt *et al.*, 1987)
pUC18-Derivat mit dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen aus *E. coli* unter Kontrolle des *Aspergillus nidulans gpdA*-Promoters, terminiert durch den *A. nidulans trpC*-Terminator. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Hygromycin B in Pilzen. Fungaler Transformationsvektor.
- pNR1** (Malonek *et al.*, 2004)
pBluescript II KS-Derivat mit dem *Streptomyces noursei nat1*-Gen (Nourseothricin-Acetyltransferase) unter Kontrolle des *Aspergillus nidulans oliC*-Promoters, terminiert durch den *Botrytis cinerea tub1*-Terminator. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Nourseothricin in Pilzen. Fungaler Transformationsvektor.
- pSH1.6EGFP**
Plasmidvektor mit promoterlosem *eGFP*-Gen und dem Terminator des *Aspergillus nidulans trpC*-Gens. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Hygromycin B in Pilzen. Fungaler Transformationsvektor für eGFP-Tagging.
- pTAPSG** (Fujii *et al.*, 1999)
Fungaler Transformationsvektor mit dem *Colletotrichum lagenarium PKS1*-Gen (cDNA) unter Kontrolle des amyloseinduzierbaren *Aspergillus oryzae amyB*-Promoters. Enthält das *argB*-Gen als Selektionsmarker. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli*.
- pGEMCgPPT1KO**
Plasmidvektor pGEM-TEasy mit dem vollständigen *CgPPT1*-Deletionskonstrukt.
- pGEMCgPPT1KOM**
Plasmidvektor pGEM-TEasy mit dem vollständigen *CgPPT1*-Komplementationskonstrukt.

pGEMCgPKS1KO	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit dem vollständigen <i>CgPKS1</i> -Deletionskonstrukt.
pGEMCgPKS1KOM	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit dem vollständigen <i>CgPKS1</i> -Komplementationskonstrukt.
pGEMPPTfl	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit dem vollständigen <i>CgPPT1</i> -ORF (gDNA) sowie 1,2 kb <i>CgPPT1</i> -Promoter.
pGEMCgPKS1fr	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit einem internen 1,7 kb Fragment von <i>CgPKS1</i> .
pCR2.1hphBsp119I	Plasmidvektor pCR2.1 mit 3,7 kb <i>hph</i> -Kassette aus pAN7-1. Restriktion mit <i>Bsp119I</i> setzt die Resistenzkassette frei.
pGEMhphAgeI	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit 2,4 kb <i>hph</i> -Kassette aus pAN7-1. Restriktion mit <i>AgeI</i> setzt die Resistenzkassette frei.
pGEMhphBsuI	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit 2,6 kb <i>hph</i> -Kassette aus pAN7-1. Restriktion mit <i>BsuI</i> setzt die Resistenzkassette frei.
pGEMhphEco81I/StuI	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit 2,6 kb <i>hph</i> -Kassette aus pAN7-1. Restriktion mit <i>Eco81I/StuI</i> setzt die Resistenzkassette frei.
pGEMPKS1egfp1	Plasmidvektor pGEM-TEasy mit einem 1,3 kb DNA-Fragment, welches 300 bp des putativen <i>CgPKS1</i> -ORF sowie 1 kb <i>CgPKS1</i> -Promotersequenz enthält.
pJETCgPKS1fl	Plasmidvektor pJET2.1/blunt mit dem vollständigen 6,7 kb <i>CgPKS1</i> -ORF (gDNA) sowie etwa 0,5 kb <i>CgPKS1</i> -Terminator.

pCAMBIA0380

(CAMBIA; Canberra, Australien, www.cambia.org)

Der Vektor pCAMBIA0380 gehört zu einer Serie von Plasmiden für die ATMT von Pilzen. Sie zeichnen sich durch eine hohe Kopienzahl in *E. coli*, eine hohe Stabilität in *A. tumefaciens* und eine relativ geringe Größe (ca. 7 kb) aus. Der Plasmidvektor trägt ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion bakterieller Transformanten. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. A. J. Foster zur Verfügung gestellt.

pGEX-4T-1

(GE Healthcare, München)

Plasmidvektor für die Expression von Proteinen mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase-Fusion (GST-Fusion) in *E. coli* BL21 (DE3) unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren *tac*-Promoters. Vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin.

pET28a

(Novagen, Madison, USA)

Plasmidvektor für die Expression von Proteinen mit N- und/oder C-terminaler (His)₆-Fusion in *E. coli* BL21 (DE3) unter der Kontrolle des IPTG-induzierbaren T7-Promoters. Vermittelt Resistenz gegenüber Kanamycin.

II.2.3 Oligonukleotide

II.2.3.1 CgPPT1-Primer

Primer	Sequenz (5'→3')
PPT ORF1	ATGGCCCCGACTATCATACAGTGG
PPT ORF2	CTAACTTTGATGACTCTCCCCAAAAG
CgPPT KO1	TTGTTGGGGTCTCAAAAGGATG
CgPPT KO2	ACTTTGATGACTCTCCCCAA
PPT KO Sonde1	AACGTCTCAACCTCCCC
PPT KO Sonde2	ACGCTACAGGCAAGATCG
EGFP1	TT <u>ACCGGTTT</u> GTTGGGGTCTCAAAAGGATG <i>AgeI</i>
EGFP2	TT <u>TTCGAAACT</u> TTGATGACTCTCCCCAA <i>Bsp119I</i>
EGFP3	TT <u>TTCGAAAT</u> GGTGAGCAAGGGCGAG <i>Bsp119I</i>
EGFP4	TT <u>TTCGAAATT</u> AGGGAGCTTACGCGC <i>Bsp119I</i>
CgPPT1expr1	<u>CATATGGCCCCGACTATCATA</u> <i>NdeI</i>
CgPPT1expr2	<u>GCGGCCGCTTAACTTTGATGACTCTCCCC</u> <i>NotI</i>
TER fw	<u>TTCGAATAGGGCCGGACTCAGATC</u> <i>Bsp119I</i>
PPT KO Bsu fw	<u>TCCTGAGGCTATAGAATCATCCTTATT</u> <i>Eco8II</i>
PPT KO Bsu rev	<u>TCCTCAGGGGAAGAAACATGCAATTAT</u> <i>Eco8II</i>
PPTwalk1	AACTTGCTCAAGCTGCTTCG
PPTwalk1nes	GCTTCGGGCCACAACCTGC

II.2.3.2 MoPPT1-Primer

MagPPTKO fw	CCCCAATACGTAGCACTA
MagPPTKO rev	GTGTTACGGATAAAACGACCG
Stu hyg fw	AGGCCTGGCACGGCTAC
Bsu hyg rev	CCTCAGGCTAAGCTATTCTTCTCTTCGC
MagPPTprobe1	AGAGACTTGCAGGGACTCC
MagPPTprobe2	CTCTTCACCTCTGCATTTCG

II.2.3.3 CgPKS1-Primer

CgPKS1KO1	CAACGCTGCATACCTCCG
CgPKS1KO2	CGCGCATCCTGCCGGAGAC
PKSEGF1	<u>ACCGGTACTCCCCGCGGATCGGTG</u> <i>AgeI</i>
PKSEGF2	<u>TTCGAAAACGTA</u> CTCGATGTAGTGAGC <i>Bsp119I</i>
CgPKS1expr1	<u>CATATGACCGCTAGCAACCTCAAGGC</u> <i>NdeI</i>
CgPKS1expr2	<u>GCGGCCGCTTAGTCCTGGACGTAGCTGTC</u> <i>NotI</i>
CgPKS1expr3	<u>GAATTCGCTAGCAACCTCAAGGC</u> <i>EcoRI</i>
CgPKS1 probe1	CGCGTCAGCTACCTTATCAAG
CgPKS1 probe2	GGTACCGTTGATGATGAAGCC
CgPKS1fl1	<u>ACCGGTATGGCCGATATGATGTCTTATCTCC</u> <i>AgeI</i>
CgPKS1fl2	<u>TTCGAAGTATATCGTAAACTCAAAGTACTACTATC</u> <i>Bsp119I</i>
Olic fw Xba	<u>TCTAGAGGATCGATTGTGATGTGATGG</u> <i>XbaI</i>
Olic rev Xba	<u>TCTAGAGAGCCGCATTCCCGATTCCG</u> <i>XbaI</i>
CgPKS3	ACGGTACCGATGCCATTGACTCTC
CgPKS4	TTGCGGGGGATGGACTGGAAGTTG
CgPKS1int1rev	GCTCCTTCTCGGTGCGGTCCG

II.2.3.4 CgAAR-Primer

DJ-5'Flanke-for	AAAGGGTGTTCGGTCCTCTAC
DJ-5'Flanke-nes	CCATCCGTGTGGAGGAGTTG
DJ-5'Flanke-rev	<u>GATTCTATAGGAAGATCCAGGCACCGGTCA-</u> TTGATCGTAGGTGCTCCGAAC (<i>Hyg-Kassette</i>)
DJ-3'Flanke-for	<u>GAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACC</u> TGGCGCTTTGGTCTAAGTAAC (<i>Hyg-Kassette</i>)
DJ-3'Flanke-nes	AGGGAGAGGGCATACTTGACTG
DJ-3'Flanke-rev	CTCCGAGACCTAGGCTAGTAAAG
Cg-SQ_7	ACAGCGGTCATTGACTGGAG
AAR-Sonde-rev	GTGGTGAGAGGTGCAGACAAG

II.2.3.5 allgemeine Primer

Gpd	GTCCCTCAGTCCCTGGTAGG
Hyg1	CCAATACGAGGTCGCCAACA
CgTUB1fw	AAGGGCCACTACACCGAAGG
CgTUB1rev	CCAGTGTACCAATGCAAGAAAGC
CgGPD-qRT.F2f	TGAACGCGAGCTAACTTGACA
CgGPD-qRT.F2r	GGGCATCGAAGATGGAGGA
UAP	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGT
SAP	GGAGACTGACATGGACTGAAGGAGT- AAAGGGIIGGGIIGGGIIGGGCATG
CgCHSII1	ACCCAACCTAGGTCTCCTTCC
CgCHSII3	TGATTCTGTGAGACTGTATGCG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAGAAT
pJET up	TGTGAGCGGATAACAATTCCC
pJET down	AGTTATTGCTCAGCGGTGGC
noursf	CCGCTCTAGAGCCGCATTC
noursr	AAGCTTGATATCTGTTAGTAATCATCATTAAG
Hyg DJ fw	TGACCGGTGCCTGGATCTTCCTATAGAATC
Hyg DJ rev	GAGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACC

II.3 Infektions- und Wachstumsversuche

II.3.1 Pflanzeninfektion

II.3.1.1 Gewinnung von Konidien

Die Anzucht der *C. graminicola*-Kulturen erfolgte wie beschrieben (s. II.1.1.1) auf Haferflockenagar (**M1**). Konidien einer 10-14 Tage alten Kultur wurden unter sterilen Bedingungen durch mehrfaches Abspülen eines kleinen Bereichs der Petrischale in 1 ml sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und 1 min bei 5000 g und Raumtemperatur in der

Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg) sedimentiert. Das erhaltene Pellet wurde sorgfältig in 1 ml H₂O_{bidest} gelöst und analog dem vorhergehenden Schritt zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3x durchgeführt.

II.3.1.2 Einstellen der Konidienkonzentration

Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte lichtmikroskopisch durch Auszählen der Zellen eines Aliquots der Konidiensuspension mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf) bei 200facher Vergrößerung im Hellfeld (Objektiv Plan Fluor 20x; N.A. 0.50, WD 2.1; Forschungsmikroskop Eclipse E600; Nikon, Düsseldorf). Ausgehend von der ermittelten Konzentration wurde die benötigte Endkonzentration durch Verdünnen der Konidiensuspension mit H₂O_{bidest} exakt eingestellt.

II.3.1.3 Maisinokulation

Vierzehn Tage alte Maispflanzen wurden mit 10⁶ Konidien/ml in 0,01% (v/v) Tween20 inokuliert, wobei 20 ml Inokulum durch Verwendung einer Zerstäuberflasche (Carl Roth, Karlsruhe) gleichmäßig auf 3 Pflanzen verteilt wurden. Begleitend zu jedem Infektionsexperiment erfolgte eine Kontrollinokulation mit 0,01% (v/v) Tween20-Lösung.

Folgende Klimakammer-Parameter wurden bis 24 h nach erfolgter Inokulation verwendet:

16 h Tag

- 50% Lichtintensität der Leuchtstoffröhren, Glühbirnen aktiviert
- 100% relative Luftfeuchtigkeit
- 25°C

8 h Nacht

- Dunkelheit
- 100% relative Luftfeuchtigkeit
- 25°C.

Nach 24 h erfolgte die Umstellung auf die Parameter des Programms „Pflanzenanzucht“ (s. II.1.2.1).

Die Bonitierung sowie die photographische Dokumentation der Symptome erfolgte, abhängig von der Fragestellung, täglich bzw. 6 Tage nach der Inokulation.

Alternativ wurden 0,5 g Pilzmyzel einer 5 Tage alten CM-Flüssigkultur (**M2**) in 0,01% (v/v) Tween20 gewaschen, filtriert (Rotilabo-Rundfilter 190 mm; Carl Roth, Karlsruhe), anschließend in 1 ml 0,01% (v/v) Tween20 aufgenommen und mit Hilfe eines Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen) 30 s bei höchster Umdrehungszahl im 2 ml Reaktionsgefäß fragmentiert. Die Inokulation von Maispflanzen erfolgte wie bereits beschrieben (s. oben).

Blattsegmente von 5-10 cm Länge des 1.-3. Folgeblatts 14 Tage alter Maispflanzen wurden auf leicht angefeuchtetem Filterpapier (Whatman 3MM; Whatman, Dassel) fixiert und mit 10 µl einer Suspension von 10^6 Konidien/ml in 0,01% (v/v) Tween20 inokuliert. Die Inkubation erfolgte in Petrischalen (ø 18 cm) in der Klimakammer (Bedingungen s. II.1.2.1) bzw. bei 23°C und Dunkelheit im BOD 400 Inkubator (UniEquip, Martinsried). Artifizielle Läsionen wurden mit Hilfe eines Stempels mit 49 Nadelspitzen/cm² erzeugt.

Die Bestimmung der Anzahl neu gebildeter Konidien erfolgte nach 6 Tagen Inkubation durch rigides Waschen inokulierter Blattsegmente in 2 ml 0,01% (v/v) Tween20 und anschließende Auszählung der Konidien in einer Thoma-Kammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf).

II.3.1.4 Phytotoxizitätstest

Verwundete und intakte Blattsegmente von 5-10 cm Länge des 1.-3. Folgeblatts 14 Tage alter Maispflanzen wurden auf leicht angefeuchtetem Filterpapier (Whatman 3MM; Whatman, Dassel) fixiert und mit 5 µl Metabolitlösung (1 µg/µl Methanol) inokuliert. Die Inkubation erfolgte in verschlossenen Plastikschränken (30x20 cm) im Klimaschrank (Versatile Environmental Test Chamber; SANYO, München) unter Maisanzuchtbedingungen (s. II.1.2.1). Artifizielle Läsionen wurden mit Hilfe einer Lanzett-nadel erzeugt. Die Bonitur erfolgte 6 Tage nach Beginn des Experiments.

II.3.1.5 Zwiebelinokulation

Zwiebelepidermen (ca. 1 x 1 cm) wurden vorsichtig mit Hilfe von Lanzettnadel und Pinzette präpariert und in Petrischalen auf 1,5%igem (w/v) Wasseragar fixiert. Die Inokulation erfolgte mit 10 µl einer Suspension von 10^6 Konidien/ml in H_2O_{bidest} . Der gesamte Ansatz wurde bei 23°C im Dunkeln inkubiert (s.II.1.1.1). Einzelne Proben wurden täglich mikroskopisch analysiert.

II.3.1.6 Reisinokulation

Blattsegmente von 10-15 cm Länge des 2. und 3. Folgeblatts 21 Tage alter Reispflanzen wurden auf leicht angefeuchtetem Filterpapier (Whatman 3MM; Whatman, Dassel) fixiert und mit Myzelfragmenten aus einer 6 Tage alten Flüssigkultur (s. II.1.1.2) inokuliert. Die Inkubation erfolgte in verschlossenen Plastischalen (30x20 cm) im Klimaschrank (Versatile Enviromental Test Chamber; SANYO, München) unter Reisanzuchtbedingungen (s. II.1.2.3). Artifizielle Läsionen wurden mit Hilfe einer Lanzettnadel erzeugt. Begleitend zu jedem Infektionsexperiment erfolgte eine Kontrollinokulation mit H_2O_{bidest} .

Die Bonitierung sowie die photographische Dokumentation der Symptome erfolgten 7 Tage nach der Inokulation.

II.3.1.7 Cytorrhizie

Konidien des *C. graminicola*-Wildtyps sowie der $\Delta Cgaar$ - und $\Delta Cgpksl$ -Mutanten wurden in einer Konzentration von 10^4 Konidien/ml H_2O_{bidest} auf Objektträger aufgetragen und 20 h bei 23°C in verschlossenen Petrischalen inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von PEG6000-Lösung. Nach 30minütiger Inkubation erfolgte die Auswertung durch Zählung der kollabierten Appressorien in wässrigen Lösungen mit PEG6000-Konzentrationen von 100-600 g/l.

II.3.2 Wachstumsversuche

Die Quantifizierung des vegetativen Wachstums von Wildtypisolat und Deletionsmutanten sowie die Identifizierung von Auxotrophien erfolgten unter Verwendung von Medien mit exakt definierter Zusammensetzung (**M5**, **M6**). Eisenmangel wurde durch Zugabe von 100 μM Bathophenanthrolindisulfonat (**L14**) induziert. Desferri-Coprogen (**L16**) und Desferri-Ferrichrom (**L15**) wurden in Endkonzentrationen von 50 μM eingesetzt. Die Sensitivität der Isolate gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wurde unter Verwendung von PDA (**M7**) mit zugesetztem H_2O_2 bzw. Bengalrosa untersucht. Mit Hilfe eines Korkbohrers erfolgte die Entnahme von Agarblöckchen definierter Größe (\varnothing 0,4 cm) aus der Myzelwachstumszone von PDA-Kulturen (**M7**). Sämtliche Ansätze, ausgenommen Medien mit Bengalrosa, wurden bei 23°C und Dunkelheit im BOD 400 Inkubator (UniEquip, Martinsried) inkubiert. Experimentelle Ansätze mit Bengalrosa wurden bei 23°C und 10 μE Lichtintensität inkubiert. Der Zuwachs wurde täglich mit dem Lineal gemessen und nach 6 bzw. 20 Tagen photographisch dokumentiert.

II.4 Molekularbiologische Methoden

II.4.1 Präparation von Nukleinsäuren

II.4.1.1 Präparation genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte nach Döbbeling *et al.* (1997). Etwa 5 g Pilzmyzel einer 7 Tage alten CM-Flüssigkultur (**M2**) wurden kurz auf saugfähigem Papier getrocknet und anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert, bis ein homogenes Pulver vorlag, welches noch in gefrorenem Zustand in ein 50 ml SS-34 Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Extraktionspuffer I (**P1**) überführt wurde.

Nach Zugabe von 8 ml Phenol-Chloroform (1:1) und sorgfältigem Mischen erfolgte die Trennung der Phasen durch Zentrifugation (Sorvall RC 5C Plus; Sorvall Deutschland, Bad Homburg) für 10 min bei 20000 g und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues SS-34 Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform

versetzt und analog dem vorhergehenden Schritt extrahiert und zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Fällung der DNA durch Überführung der oberen Phase in ein weiteres SS-34 Zentrifugenröhrchen, Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol und 60minütiger Inkubation bei -20°C .

Die Proben wurden anschließend 15 min bei 6800 g und 4°C sedimentiert und das erhaltene Pellet in 7 ml DNA-Extraktionspuffer II (**P2**) resuspendiert. RNA wurde durch Zugabe von 35 μl (10 mg/ml) RNase A (Roche Diagnostics, Mannheim) und 30minütige Inkubation bei 37°C hydrolysiert. Verbliebene Proteine wurden durch die Zugabe von 10 μl (14-22 mg/ml) Proteinase K (Roche Diagnostics, Mannheim) und eine 60minütige Inkubation bei 60°C entfernt. Danach erfolgten erneut eine Phenol-Chloroform- und eine Chloroform-Extraktionen mit anschließender Isopropanol-Präzipitation (s. oben).

Die präzipitierte DNA wurde 20 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und weitere 20 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstands mit Hilfe einer Pipette wurde das DNA-Pellet unter der Sterilbank getrocknet und anschließend in sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder TE-Puffer (**P2**) aufgenommen.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Reinheit erfolgte spektrometrisch (Uvikon 933 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer; Kontron Instruments, Mailand, Italien) durch Messung der Extinktion eines 100fach verdünnten Aliquots bei 260 nm bzw. 280 nm Wellenlänge.

II.4.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

E. coli DH10B bzw. *E. coli* BL21 (DE3) wurden in Kulturröhrchen mit 4 ml LB-Flüssigmedium (**M3**) und den entsprechenden Antibiotika 16-20 h bei 37°C und 200 rpm im Kulturschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) angezogen. Nach dem Überführen der Bakterienkultur in 2 ml Reaktionsgefäße erfolgte die Sedimentation der Zellen für 1 min bei 10000 g und Raumtemperatur in der Tischzentrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg). Das erhaltene Pellet wurde anschließend in 100 μl Resuspendierungslösung (**P4**) sorgfältig gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 200 μl Denaturierungslösung (**L3**) und vorsichtiges Invertieren der Reaktionsgefäße. Während der folgenden Inkubationszeit

von 15 min bei Raumtemperatur wurde die RNA enzymatisch degradiert. Danach erfolgte die Zugabe von 200 µl Neutralisierungslösung (**L4**), eine 10minütige Inkubation auf Eis und die Zentrifugation der Proben für 10 min bei 10000 g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß übertragen, mit 1 ml Ethanol versetzt und für 10 min bei 10000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit 70%igem Ethanol wurde das Pellet unter der Sterilbank getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O_{bidest} oder TE-Puffer (**P2**) aufgenommen.

Die Präparation von Plasmid-DNA für Sequenzierungen oder Transformationen erfolgte unter Verwendung des GeneJet Plasmid Miniprep Kits (Fermentas, St. Leon-Rot). Aus 2-4 ml *E. coli*-Übernachtskulturen wurde nach Herstellerangaben die Plasmid-DNA isoliert.

II.4.1.3 Präparation von Gesamt-RNA

Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte nach der von Chirgwin *et al.* (1979) beschriebenen Methode. Es wurden ausschließlich RNase-freie Lösungen, Gefäße und Geräte verwendet.

Myzel 5 Tage alter CM-Flüssigkulturen (**M2**) wurde mittels Filtration (18,5 cm Rundfilter; Spezialpapier-FILTRAK, Niederschlag) und anschließendes Auflegen saugfähigen Papiers vom Nährmedium separiert. Etwa 3 bis 6 g des Pilzmaterials wurden danach in einen vorgekühlten Mörser gegeben, in flüssigem Stickstoff zu einem homogenen weißen Pulver zerrieben und mit Hilfe eines gekühlten Spatels in vorgekühlte 50 ml Flaschen (Schott, Mainz) überführt. Nach dem vollständigen Entweichen des Stickstoffs erfolgte die Zugabe von 15 ml RNA-Lysispuffer (**P5**) zu dem noch gefrorenen Pilzmaterial. Lysispuffer (**P5**) und Pilzmaterial wurden danach sofort mit Hilfe eines Ultra-Turrax T8 (IKA Labortechnik, Staufen) sorgfältig homogenisiert und 15 min bei 250 rpm und 37°C im Thermoschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert. Nichtlösliche Zellbestandteile wurden anschließend 20 min bei 9500 g und 10°C in der Zentrifuge sedimentiert (Sorvall RC 5C Plus; Sorvall Deutschland, Bad Homburg), der Überstand in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem 0,02fachen Volumen 3 M Natriumacetat (**L4**) und dem 0,75fachen Volumen Ethanol_{reinst} versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Die Sedimentation der Nukleinsäuren und Proteine erfolgte durch 20minütige Zentrifugation bei 10000 g und 4°C. Das erhaltene Pellet wurde noch im Zentrifugenröhrchen in 15 ml TES-Puffer (**P6**) unter Verwendung des Ultra-Turrax T8 gelöst, mit dem gleichen Volumen Phenol- (pH 7,8) Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und 15 min bei 250 rpm und Raumtemperatur im Thermoschüttler inkubiert. Zur Phasentrennung erfolgte anschließend eine Zentrifugation für 10 min bei 15500 g und Raumtemperatur. Die wässrige Phase wurde danach zusammen mit dem gleichen Volumen Chloroform in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und analog dem vorhergehenden Schritt extrahiert und zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde wiederum nach Bestimmung des Volumens in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, mit dem 0,33fachen Volumen 8 M Lithiumchloridlösung versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Anschließend erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 10000 g und 4°C. Das Pellet wurde etwa 15 min bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet, in 5 ml TES-Puffer (**P6**) durch 20minütige Inkubation im Schüttelwasserbad (Memmert Laborgeräte, Schwabach) bei 60°C gelöst, danach mit dem 0,1fachen Volumen 4 M NaCl-Lösung und dem 2,5fachen Volumen Ethanol_{reinst} versetzt und exakt 25 min bei -80°C inkubiert. Die RNA wurde durch 20minütige Zentrifugation bei 15500 g und 4°C sedimentiert, das erhaltene Pellet bei Raumtemperatur unter der Sterilbank getrocknet und in 1 ml sterilem H₂O_{bidest} bei 60°C im Schüttelwasserbad gelöst.

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit wurde spektrometrisch durch die Ermittlung der Extinktion eines 100fach verdünnten Aliquots bei 260 nm bzw. 280 nm Wellenlänge vorgenommen (s. II.4.1.1). Die Kontrolle der RNA-Integrität erfolgte elektrophoretisch durch die Auftrennung von 5 µg RNA in einem denaturierenden Agarose-Gel (s. II.4.2.2) sowie visueller Beurteilung der ribosomalen 28 S und 18 S RNA-Banden.

Alternativ wurde Gesamt-RNA bei großer Probenzahl und geringen benötigten Mengen mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

II.4.2 Gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

II.4.2.1 DNA-Elektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele in Konzentrationen von 0,8% bis 2% (w/v) Agarose (Biozym Scientific, Hess. Oldendorf) hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer (**P7**) gegeben, durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in einen Gelträger gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Probenpuffer (**P8**) versetzt, mit Hilfe einer Pipette auf das Gel aufgetragen und bei konstanter Spannung (1 V pro cm² Gelfläche) in einer Elektrophoresekammer (Modell 2; Mechanikwerkstatt Universität Konstanz bzw. Modell HU13; biostep, Jahnsdorf) aufgetrennt. Anschließend erfolgte die 15minütige Färbung des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der AlphaImager-Videodokumentationsanlage (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) aufgezeichnet. Als Größenstandard wurden DNA-Fragmente definierter Länge (GeneRuler DNA Ladder Mix; Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

II.4.2.2 RNA-Elektrophorese

Agarose wurde in einer Konzentration von 1% (w/v) in RNA-Laufpuffer (**P9**) durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Nach dem Abkühlen auf eine Temperatur von etwa 50°C erfolgte die Zugabe von Formaldehyd.

Fünf µg RNA wurden für jede Applikationstasche vorbereitet. Dazu erfolgte die Entnahme des entsprechenden Volumens RNA-Lösung aus den unter Gliederungspunkt II.4.1.3 hergestellten Proben. Mit sterilem H₂O_{bidest} wurde ein Probenvolumen von 46 µl eingestellt. Vier µl 4 M NaCl-Lösung und 100 µl Ethanol_{reinst} vervollständigten den Fällungsansatz.

Nach Inkubation der Proben über Nacht bei -20°C erfolgte eine 20minütige Zentrifugation bei 14000 g und 4°C sowie ein Waschschrift mit 70%igem Ethanol. Die erhaltenen Pellets wurden etwa 20 min unter der Sterilbank getrocknet und anschließend in 22 µl RNA-Probenpuffer (**P10**) aufgenommen, 15 Minuten bei 65°C im Heizblock denaturiert und danach bis zur Gelbeladung auf Eis gehalten. Die Trennung der RNA-Fragmente erfolgte bei konstanter Spannung (1 V pro cm² Gelfläche). Anschließend

wurde das Gel etwa 60 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ inkubiert und danach in einer Ethidiumbromid-Lösung ($1\mu\text{g}/\text{ml}$ in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) angefärbt.

Die Qualität der RNA wurde auf dem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 320 nm anhand der Integrität der ribosomalen 18 S und 28 S RNA-Banden kontrolliert und mittels Videodokumentation (AlphaImager; Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) aufgezeichnet.

II.4.3 Southern-Hybridisierung

II.4.3.1 Herstellung von Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin-dUTP erfolgte in einer Standard-PCR (s. II.4.4.1). Verwendet wurde ein spezieller DIG-dNTP-Mix, bestehend aus je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1,9 mM dTTP und 0,1 mM DIG-dUTP (PCR DIG Labelling Mix Alkali-labil; Roche Diagnostics, Mannheim). Als Matrize wurden 5 ng Plasmid-DNA mit den entsprechenden DNA-Sequenzen eingesetzt.

Ein paralleler Kontrollansatz ohne DIG-dUTP wurde zusammen mit dem markierten Sondenfragment im 1%igen (w/v) Agarosegel aufgetrennt. Der Erfolg der Markierung konnte am veränderten Laufverhalten der Sonde überprüft werden.

II.4.3.2 Southern-Blot

II.4.3.2.1 Restriktion und Gelelektrophorese

Jeweils 5 μg genomische DNA wurden pro Ansatz mit 2 μl Restriktionsendonuclease (*Pst*I, *Xho*I, *Eco*8II je 10 u/ μl) und dem entsprechenden Volumen des zugehörigen Puffers versetzt und 20 h bei 37°C im Brutschrank Modell Function Line Serie 700 (Kendro Laboratory Products, Langenselbold) inkubiert.

Nach Zugabe von DNA-Probenpuffer (**P8**) erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente im 0,8%igen (w/v) Agarosegel (s.II.4.2.1). Die enzymatische Fragmentierung der DNA konnte anschließend durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visuell kontrolliert werden.

II.4.3.2.2 Transfer

Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente (II.4.3.2.1) wurde das Gel zunächst 20 min in 0,25 M HCl unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend etwa 20 min in 0,4 M NaOH-Lösung denaturiert. Als pH-Indikator diente im Probenpuffer (**P8**) enthaltenes Bromphenolblau. Die DNA wurde durch einen 8stündigen abwärts gerichteten Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Die Transfereinheit wurde folgendermaßen aufgebaut:

auf einen ca. 10 cm hohen Stapel Papierhandtücher wurden 3 Lagen Filterpapier (Whatmann 3MM; Whatman, Göttingen), die Nylonmembran, das Gel und weitere 3 Lagen Filterpapier übereinander gelegt, wobei die Größe von Membran und Filterpapier genau der Gelgröße entsprachen. Den Abschluss bildete ein Streifen Filterpapier, welcher, in Gelbreite geschnitten, die Verbindung zum Pufferreservoir (**P11**) herstellte. Im Anschluss an den Transfer erfolgte die kovalente Verknüpfung von Membran und DNA-Fragmenten durch 60minütige Inkubation bei 80°C.

II.4.3.2.3 Hybridisierung

Zunächst erfolgte eine Prähybridisierung der Membran für 2 h in 20 ml Hybridisierungspuffer (**P12**) bei 65°C im Hybridisierungsinkubator (Biozym Diagnostic, Hess. Oldendorf). Danach wurde die für 3 min bei 95°C denaturierte Sonden-DNA zugegeben und der gesamte Ansatz bei 65°C in Hybridisierungsröhren über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran 2x 5 min in 2x Waschpuffer I (**P13**) bei Raumtemperatur und anschließend 2x 15 Minuten in 0,5x Waschpuffer I (**P14**) bei 65°C gewaschen.

II.4.3.2.4 Nachweis der gebundenen Sonde

Die Membran wurde zunächst kurz in Waschpuffer II (**P15**) äquilibriert und anschließend 1 h in Blockingpuffer (**P16**) bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des Antikörpers (Verdünnung 1:10000; anti-DIG AP Fab-Fragmente; Roche

Diagnosics, Mannheim) zum Blockingpuffer (**P16**). Ungebundene Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit Waschpuffer II (**P15**) für je 15 min bei Raumtemperatur entfernt, die Membran anschließend kurz in Detektionspuffer (**P17**) geschwenkt und nach Zugabe von 1 ml CSPD-Lösung (0,25 mM CSPD ready-to-use; Roche Diagnostics, Mannheim) zwischen zwei Plastikfolien 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Membran wurde anschließend in Saranfolie (Saran Wrap; DuPont, Wilmington, USA) verpackt und zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtungsdauer richtete sich nach der Signalstärke. Die Filmentwicklung wurde mit Hilfe eines automatischen Entwicklungsgeräts (Optimax TR; MS Laborgeräte, Heidelberg) durchgeführt.

II.4.4 PCR

II.4.4.1 Standard-PCR

Sämtliche Reaktionen wurden mit den Thermocyclern PTC-150 (MJ Research, Waltham, USA) bzw. Tpersonal (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme und Reaktionspuffer wurden von NEB (Frankfurt/Main) bezogen. Ein 20 µl Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
2 µl	PCR-Puffer	10x
1 µl	dNTPs	10 mM
1 µl	Primer1	2 µM
1 µl	Primer2	2 µM
0,2 µl	Taq-Polymerase	5 Units/ml
DNA (1-50 ng)		
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

Das Standard-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

95°C	1 min	initiale Denaturierung	30-40 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
T _m	30 s	Annealing	
72°C	1 min/kb	Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

Etwa 30-40 Zyklen erwiesen sich für die Mehrzahl der PCR-Anwendungen als ausreichend. Die Dauer der initialen Denaturierung war abhängig von der Art der verwendeten Template-DNA und DNA-Polymerase. Als Annealing-Temperatur (T_m) wurde die niedrigste Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Die Elongationsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments (~1 kb/min). Die effektivsten Bedingungen wurden durch Variation der einzelnen Parameter empirisch ermittelt.

II.4.4.2 DJ-PCR

Konstrukte für die vollständige Deletion von Genen, unabhängig vom Vorhandensein geeigneter Restriktionssequenzen, wurden mittels Double-Joint PCR (Yu *et al.*, 2004) generiert. In einem ersten 50 μ l Reaktionsansatz erfolgte zunächst die Amplifikation der 5' und 3' Flanken des Zielgens sowie der Resistenzkassette:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 μ l	HF-Puffer	5x
1 μ l	dNTPs	10 mM
5 μ l	Primer1	2 μ M
5 μ l	Primer2	2 μ M
0,5 μ l	Phusion Polymerase	2 Units/ml
DNA (1-20 ng)		
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

98°C	1 min	initiale Denaturierung	30 Zyklen
98°C	30 s	Denaturierung	
60°C	30 s	Annealing	
72°C	1 min	Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

Die Produkte der ersten PCR wurden anschließend in einem zweiten PCR-Ansatz eingesetzt, wobei jeweils etwa 50 ng der Flanken-DNA und 100 ng der amplifizierten Resistenzkassette als Template verwendet wurden. Komplementäre Überhänge an den Fusionsstellen von 5' Flanke und Promoter der Resistenzkassette bzw. 3' Flanke und 3' Terminus des Hygromycin-Phosphotransferase-Gens übernahmen dabei die Primerfunktion.

Reaktionsansatz (50 μ l) und PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 μ l	HF Puffer	5x
1 μ l	dNTPs	10 mM
0,5 μ l	Phusion Polymerase	2 Units/ml
stöchiometr. Verhältnis 1:1:1	<i>hph</i> -Kassette	-
	5'-Flanke	-
	3'-Flanke	-
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

98°C	1 min	initiale Denaturierung	10 Zyklen
98°C	30 s	Denaturierung	
60°C	30 s	Annealing	
72°C	1 min	Elongation	
98°C	15 s	Denaturierung	25 Zyklen
72°C	1 min 30 s	Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

Etwa 1 μ l des Reaktionsansatzes der zweiten PCR wurde schließlich zur Generierung von 2-5 μ g Fusionskonstrukt in bis zu 10 Parallelansätzen eingesetzt:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
10 μ l	HF Puffer	5x
1 μ l	dNTPs	10 mM
5 μ l	nested-Primer1	2 μ M
5 μ l	nested-Primer2	2 μ M
0,5 μ l	Phusion Polymerase	2 Units/ml
1 μ l	Fusionsfragment	-
26,5 μ l	H ₂ O _{bidest}	-

98°C	1 min	initiale Denaturierung	30 Zyklen
98°C	30 s	Denaturierung	
60°C	30 s	Annealing	
72°C	2 min	Elongation	
72°C	5 min	finale Elongation	

Das amplifizierte KO-Konstrukt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben (Qiagen, Hilden) gereinigt und für die Transformation fungaler Protoplasten verwendet.

II.4.4.3 RT-PCR

RT-PCR-Ansätze zur Abschätzung der relativen *CgPKS1/CgPPT1*-Transkriptmengen in Deletionsmutanten und Wildtyp-Isolat wurden mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu erfolgte die Isolierung von Gesamt-RNA (s. II.4.1.3) aus 5 Tage alten CM-Flüssigkulturen (**M2**). Jeweils 50 ng RNA wurden pro 10 µl Reaktionsansatz verwendet:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
2 µl	RT-PCR Puffer	5x
0,4 µl	dNTPs	10 mM
3 µl	Primer1	2 µM
3 µl	Primer2	2 µM
0,2 µl	RT-PCR Enzymmix	50x
50 ng RNA		
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

Die cDNA-Synthese und die Amplifikation von *CgPKS1*- bzw. *CgPPT1*-Fragmenten (Primer PPTORF1/PPTORF2, *CgPKS3/CgPKS4* bzw. *CgPKS1fl/CgPKS1int1rev*) wurden unter Verwendung folgender PCR-Parameter durchgeführt:

50°C	30 min	reverse Transkription	25-40 Zyklen
95°C	15 min	initiale Denaturierung	
94°C	30 s	Denaturierung	
60°C	30 s	Annealing	
72°C	50 s	Elongation	
98°C	15 s	Denaturierung	
72°C	5 min	finale Elongation	

Kontrollansätze mit spezifischen Primern (*CgCHSII1/CgCHSII3*) für die Amplifikation eines 380 bp großen Fragments des Chitinsynthase-Gens *CgCHSII* wurden parallel unter identischen Reaktionsbedingungen mitgeführt.

II.4.4.4 quantitative PCR

Die relative Quantifizierung von DNA erfolgte mit einem MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), ausgestattet mit iQ5-Standardsoftware (Version 2.0.148.60623). Template-DNA wurde wie beschrieben

(s. II.4.1.1) mit einer zusätzlichen Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. DNA-Fragmente <100 bp wurden durch eine Fällung mit SureClean-Lösung (Bioline, Luckenwalde) nach Herstellerangaben entfernt. Die exakte Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photospektrometrisch (s. II.4.1.1) und densitometrisch (AlphaImager, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) nach Auftrennung im 1%igen (w/v) Agarosegel.

Reaktionspuffer, Enzyme und dNTPs waren Bestandteile des kommerziell erworbenen iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Komplettiert wurden die 20 µl Reaktionsansätze durch Zugabe spezifischer Primer (CgGPD-qRT.F2/CgGPD-qRT.F2) sowie der Template-DNA:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
1 µl	Primer1	2 µM
1 µl	Primer2	2 µM
10 µl	iQ SYBR Green Supermix	2x
100 ng DNA		
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

Das PCR-Programm bestand aus folgenden Reaktionsschritten:

95°C	3 min	initiale Denaturierung	50 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
63°C	20 s	Annealing	
72°C	15 s	Elongation	

Im Anschluss erfolgte die Aufzeichnung der Produkt-Schmelzkurve im Temperaturbereich von 55°C-95°C in Schritten von 0,5°C. Zusätzlich wurden alle Reaktionen zur Identifizierung möglicher Nebenprodukte elektrophoretisch in 1%igem (w/v) Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und analysiert (AlphaImager, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf).

Die Bestimmung der PCR-Effizienz erfolgte mit Hilfe der LinReg-Software Version 7.2 (Ramakers *et al.*, 2003). C_T-Werte von Proben aus experimentellen Ansätzen mit je drei biologischen Wiederholungen wurden zur Berechnung von Durchschnittswerten und der Standardabweichung herangezogen. Alle Zahlenwerte im Ergebnisteil beziehen sich auf den durchschnittlichen C_T-Wert von Proben aus der Inokulation unverletzter Blätter mit Wildtyp-Konidien zum Zeitpunkt 0 des Experiments.

II.4.4.5 Genome Walking

Die Analyse unbekannter Genomregionen, welche an bekannte Sequenzbereiche anschließen, erfolgte durch die Sequenzierung von PCR-Fragmenten, die mit Hilfe der Tailing-Methode (Liu & Baird; 2001) generiert wurden. Zunächst wurden 10 µg genomische DNA 60 min bei 37°C mit 0,5 u *Nla*III (NEB, Frankfurt/Main) partiell verdaut, elektrophoretisch im 0,8% igem (w/v) Agarosegel getrennt und Fragmente >2 kb aus dem Gel eluiert (s. II.4.5.1). Anschließend wurden diese Fragmente im Tailing-Ansatz, bestehend aus 3-5 µg eluierter DNA; 50 u TdT (NEB, Frankfurt/Main); 0,25 mM CoCl₂; 1 mM dCTP und 1x Reaktionspuffer 4 (NEB, Frankfurt/Main) in 50 µl Gesamtvolumen 1 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der TdT erfolgte durch 20minütige Inkubation bei 85°C.

Die primäre PCR zur Amplifikation unbekannter DNA-Bereiche erfolgte in Reaktionsansätzen von 50 µl Gesamtvolumen:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
5 µl	PCR-Puffer	10x
2 µl	dNTPs	10 mM
3 µl	Primer SAP	2 µM
1 µl	spezifischer Primer	2 µM
0,5 µl	Taq-Polymerase	5 Units/ml
0,5 µg oligo-dC DNA		
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

Das verwendete PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

95°C	2 min	initiale Denaturierung	5 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
72°C	2 min	Elongation	5 Zyklen
95°C	30 s	Denaturierung	
70°C	30 s	Annealing	20 Zyklen
72°C	2 min	Elongation	
95°C	30 s	Denaturierung	20 Zyklen
68°C	30 s	Annealing	
72°C	2 min	Elongation	20 Zyklen
72°C	5 min	finale Elongation	

Aus dem Reaktionsansatz der 1. PCR wurde 1 μl in der anschließenden PCR (Gesamt-
volumen 50 μl) eingesetzt:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
5 μl	PCR-Puffer	10x
2 μl	dNTPs	10 mM
2 μl	Primer UAP	2 μM
2 μl	spezifischer Primer (nested)	2 μM
0,5 μl	Taq-Polymerase	5 Units/ml
1 μl	Ansatz erste Reaktion	
<i>ad H₂O_{bidest}</i>		

Das Programm der 2. PCR entsprach dem Standard-PCR-Programm (s. II.4.4.1) mit 2 min Elongationszeit und 68°C Annealingtemperatur. Die Auftrennung der entstandenen PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch im 1%igen (w/v) Agarosegel. Produkte >500 bp wurden anschließend eluiert (s. II.4.5.1), in pGEM-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert, sequenziert und analysiert (s. II.4.10).

II.4.5 Klonierung

II.4.5.1 Generierung von DNA-Fragmenten

Sämtliche klonierten DNA-Fragmente wurden mittels PCR bzw. durch Restriktion vorhandener Plasmidvektoren generiert. Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel, Ethidiumbromid-Färbung und Kontrolle unter UV-Licht wurden einzelne Banden mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Die anschließende Gelelution der DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem MinElute Gel Extraction Kit bzw. dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden).

II.4.5.2 Restriktionsverdau

Ansätze mit Restriktionsendonukleasen wurden in Volumina von 10-50 μl unter Zugabe des entsprechenden Volumens 10x Reaktionspuffer bei enzymespezifischen Temperaturen inkubiert (Thermocycler PTC-150; MJ Research, Waltham, USA bzw. Tpersonal; Biometra, Göttingen), wobei unterschiedliche Mengen Restriktionsendonuklease in

Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge sowie der Anzahl bekannter Erkennungssequenzen verwendet wurden. Falls notwendig, erfolgte im Anschluss eine Hitzeinaktivierung der Enzyme nach Herstellerangaben.

II.4.5.3 Ligation und Dephosphorylierung

Ligationsansätze zur Klonierung von PCR-Fragmenten, die durch Taq-Polymerase (NEB, Frankfurt/Main) generiert wurden, bestanden aus 2,5 µl 2x Ligationspuffer; 0,5 µl Vektor-DNA (pGEM-Teasy TA Cloning Vektor; Promega, Mannheim); 0,5 µl T4 DNA-Ligase und 1,5 µl eluiertem DNA-Fragment (s. II.4.5.1). Die verwendeten Enzyme und Puffer wurden dem T/A-Cloning Kit (Promega, Mannheim) entnommen.

Von DNA-Polymerasen mit Proofreading-Funktion (Phusion DNA Polymerase; NEB, Frankfurt/Main) erzeugte PCR-Fragmente wurden nach Herstellerangaben mit den Reagenzien des CloneJET PCR Cloning Kit in den pJET1.2/blunt-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot) kloniert.

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit komplementären Überhängen, welche durch vorherige Inkubation mit Restriktionsendonukleasen entstanden, erfolgte in 10 µl Reaktionsansätzen, bestehend aus 5 µl 2x Ligationspuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase (1 Weiss unit/µl) sowie Plasmid- und Insert-DNA im stöchiometrischen Verhältnis 1:3. Um eine Religation komplementärer Vektorenden zu verhindern, wurden diese durch Zugabe von 0,5 u SAP/10 µl Restriktionsansatz und Inkubation für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. SAP wurde anschließend 20 min bei 80°C deaktiviert.

Die Inkubation sämtlicher Ligationsansätze erfolgte bei 16°C (Thermocycler Tpersonal; Biometra, Göttingen) über Nacht oder alternativ 1 h bei Raumtemperatur.

II.4.5.4 Transformation von *E. coli*

II.4.5.4.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Fünf ml LB-Flüssigmedium (**M3**) wurden mit einer Einzelkolonie *E. coli* DH10B bzw. BL21 (DE3) inokuliert und über Nacht inkubiert (Bedingungen s. II.1.3.1).

Am nächsten Tag wurden 500 ml LB-Flüssigmedium (**M3**) in einem 2 Liter Erlenmeyerkolben mit 1 ml der Übernachtskultur inokuliert und bis zum Erreichen einer OD_{600} von etwa 0,6 inkubiert. In regelmäßigen Zeitabständen entnommene Aliquots der Bakteriensuspension wurden für die Absorptionsmessung (Uvikon 933 Double Beam UV/VIS-Spectrophotometer; Kontron Instruments, Mailand, Italien) verwendet.

Während der weiteren Arbeitsschritte wurden alle eingesetzten Gefäße und Lösungen auf Eis gekühlt. Die Sedimentation der Zellen erfolgte durch 15minütige Zentrifugation bei 5000 g und 4°C. Verwendet wurde ein GSA-Rotor (Sorvall Deutschland, Bad Homburg) und Zentrifugenbecher mit 250 ml Fassungsvermögen. Das Pellet wurde in 100 ml 10% (v/v) Glycerin resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 4x durchgeführt. Danach erfolgte eine abschließende Zentrifugation für 15 min bei 5000 g und 4°C. Das erhaltene Pellet wurde dann in 2 ml 10% (v/v) Glycerin sorgfältig resuspendiert, die Zellsuspension in Aliquots von 100 μ l aufgeteilt und bei -80°C gelagert.

II.4.5.4.2 Elektroporation

Fünfzig μ l kompetente Zellen wurden zusammen mit 1 μ l Ligationsansatz in eine 2 mm Elektroporationsküvette (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) pipettiert, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend im Elektroporator (Multiporator; Qiagen, Hilden) 5 ms einer Stromspannung von 2500 Volt ausgesetzt. Die Zellsuspension wurde sofort in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml LB-Flüssigmedium (**M3**) überführt.

In der nachfolgenden 60minütigen Regenerationsphase bei 37°C und 250 rpm im Kulturschüttler erfolgte die Expression des Ampicilin- bzw. Kanamycinresistenzfaktors in erfolgreich transformierten Bakterienzellen.

II.4.5.4.3 Selektion

Volumina von 100 μ l bis 400 μ l Zellsuspension transformierter *E. coli* (s. II.4.5.4.2) wurden auf LB_{amp^-} bzw. LB_{kan^-} -Agar (**M4**) zusammen mit 10 μ l steriler IPTG-Lösung (**L11**) und 60 μ l X-Gal-Lösung (**L12**) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Kulturschrank inkubiert. Die Identifizierung transformierter Zellen mit und ohne Vektor-

insertion erfolgte anhand der Koloniefärbung (Blau-Weiß-Selektion, pGEM-Teasy TA Cloning Vektor; Promega, Mannheim). Kolonien, die aufgrund der Insertion eines DNA-Fragments in den offenen Leserahmen des β -Galaktosidasegens (N-terminaler Teil von α -*lacZ*) keine Farbreaktion zeigten, wurden mit Hilfe eines Zahnstochers unter sterilen Bedingungen auf Selektionsmedium (LB_{amp}-Agar, IPTG, X-Gal; s. oben) übertragen und standen für weitere Anwendungen zur Verfügung.

Ein anderes Selektionsprinzip kommt bei Transformationen mit dem pJET1.2/blunt-Vektor (Fermentas, St. Leon-Rot) zur Anwendung. Insetierte DNA-Fragmente unterbrechen den ORF des *eco47IR*-Gens, welches für eine cytotoxische Restriktionsendonuclease codiert. Rezirkularisierung führt zur Expression eines letalen Faktors und verhindert somit das Wachstum von Bakterienkolonien, die Vektoren ohne DNA-Insert aufgenommen haben.

II.4.5.5 Transformation von *A. tumefaciens*

II.4.5.5.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

A. tumefaciens AGL1 wurde ausgehend von einer Glycerin-Dauerkultur auf LB-Agar (**M12**) mit Rifampicin (**L20**) ausgestrichen und 2-4 Tage bei 28°C inkubiert. Fünf ml LB-Flüssigmedium (**M3/L20**) wurden anschließend mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht inkubiert (Bedingungen s. II.1.3.1). Zwei ml dieser Vorkultur wurden dann zur Inokulation von 100 ml LB-Flüssigmedium (**M3/L20**) verwendet und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 inkubiert. Danach wurde die Kultur 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend 5 min bei 4000 g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC 5C Plus; Sorvall Deutschland, Bad Homburg). Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert, die Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

II.4.5.5.2 Transformation und Selektion

Ein 100 μ l Aliquot der chemisch kompetenten Zellen wurde mit 6 μ l Plasmid-DNA versetzt und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort in LB-

Flüssigmedium (**M3**) resuspendiert und 3 h bei 28°C und 220 rpm inkubiert. Danach wurden die transformierten Zellen auf LB-Agar (**M4/L20/L9**) ausplattiert und 3 Tage bei 28°C inkubiert.

II.4.5.6 Kolonie-PCR

Die Kontrolle der Insertgröße klonierter DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR, wobei Teile einer Bakterienkolonie mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers direkt in den PCR-Ansatz übertragen wurden. Abweichend vom PCR-Standardprotokoll (s. II.4.4.1) erfolgte die initiale Denaturierung bei 95°C für 5 min.

II.4.6 Protoplastentransformation

II.4.6.1 Gewinnung von Protoplasten

Konidien 14 Tage alter CgM2-Kulturen wurden mit H₂O_{bidest} unter sterilen Bedingungen von OMA-Platten (**M1**) gespült und in Konzentrationen von etwa 10⁶/ml in Erlenmeyerkolben mit 100 ml Kompletmedium (**M2**) bei 23°C ohne Schütteln 6-7 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die Filtration der Flüssigkultur durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA). Sedimentiert wurden die Konidien durch 10minütige Zentrifugation bei 4000 g und 20°C in 200 ml Zentrifugenbechern (Rotor SLA-1500, Zentrifuge Sorvall-RC-6; Sorvall Deutschland, Bad Homburg).

Die Protoplastierung der Konidien erfolgte durch Zugabe von 20 ml einer 0,7 M NaCl-Lösung mit 20 mg/ml *Trichoderma harzianum* Lysing Enzymes (Sigma, Deisenhofen); 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol sowie 3stündige Inkubation bei 30°C und 75 rpm im Kulturschüttler. Sedimentiert wurden die protoplastierten Konidien durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 g und 4°C in 30 ml Zentrifugenröhrchen (Rotor SS-34; Zentrifuge Sorvall RC-6; Sorvall Deutschland, Bad Homburg). Die Protoplasten wurden in 20 ml STC-Puffer (**P18**) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 1 ml STC-Puffer (**P18**) aufgenommen.

II.4.6.2 Transformation und Selektion

Zu je 100 µl Protoplastenlösung (s. II.4.6.1) wurden in sterilen 15 ml Zentrifugenröhrchen 1-5 µg des DNA-Konstrukts gegeben. Parallel wurde ein Kontrollansatz ohne DNA mitgeführt. Sämtliche Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml PEG-Puffer (**P19**) und eine 20minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

Zu jedem Aliquot wurden anschließend 5 ml flüssiges, 45°C warmes Regenerationsmedium (**M8**) gegeben. Der gesamte Ansatz wurde dann zum Überschichten von Petrischalen mit Selektionmedium (**M9**) verwendet. Die Inkubation der Petrischalen erfolgte bei Raumtemperatur bis zum Erscheinen sichtbarer Kolonien.

II.4.6.3 Gewinnung von Einzelsporisolen

Hygromycinresistente Kolonien wurden zur Gewinnung von Konidien zunächst auf Petrischalen mit OMA-Medium (**M1**) übertragen. Nach etwa 10 Tagen wurden die Konidien der Transformanten durch Zugabe von sterilem H₂O_{bidest} abgespült und stark verdünnt (~10²/ml) auf PDA mit 100 µg/ml Hygromycin B (**M7**) ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden auf diese Weise isoliert und wiederum auf OMA-Medium (**M1**) übertragen.

II.4.7 *A. tumefaciens* vermittelte Transformation von *M. oryzae*

II.4.7.1 Gewinnung von Konidien

Konidien von 10 Tage alten *Magnaporthe oryzae* CMM-Agar-Kulturen (**M14**) wurden mit Hilfe eines Drigalski-Spatels mit ca. 10 ml sterilem H₂O_{bidest} abgeschwemmt und durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA) filtriert. Sedimentiert wurden die Konidien durch 10minütige Zentrifugation bei 4000 g und 20°C in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Rotor SLA-1500, Zentrifuge Sorvall-RC-6; Sorvall Deutschland, Bad Homburg). Das erhaltene Pellet wurde zunächst in 1 ml sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und die Suspension auf eine Konzentration von 10⁶ Konidien/ml eingestellt.

II.4.7.2 Transformation und Selektion

Mehrere Kolonien transformierter *A. tumefaciens* (s. II.4.7.2) wurden zur Inokulation einer Übernachtskultur von 5 ml LB-Flüssigmedium (**M3/L9/L20**) verwendet. Ein ml der Bakteriensuspension wurde am nächsten Tag 3 min bei 8000 g und 20°C zentrifugiert und in 5 ml AIM-Flüssigmedium (**M15**) resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Suspension im 15 ml Röhrchen bei 28°C und 220 rpm für 6-8 h.

Im nächsten Schritt wurden 200 µl Sporenlösung und 200 µl Bakteriensuspension gemischt. Diese Lösung wurde vorsichtig entlang des äußeren Randes eines sterilen Filters (NC45 ST Membranfilter; Schleicher & Schuell, Dasseln), der auf AIM-Agar (**M16**) ausgelegt wurde, pipettiert. Nach dem Abtrocknen der Flüssigkeit wurden die Platten 48 h bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Filter auf CMM-Selektionmedium (**M17**) und eine weitere Inkubation von 5-10 Tagen. Sichtbare Einzelkolonien von äußersten Filterrand wurden zunächst auf CMM-Selektionsmedium (**M17**), später auf CMM-Agar (**M14**) übertragen.

II.4.8 Deletionsstrategien

II.4.8.1 Inaktivierung und Komplementation von *CgPPT1*

Ein 2313 bp DNA-Fragment, welches den kodierenden Bereich von *CgPPT1* (1111bp) sowie 1202 bp 5'-flankierende Sequenz umfasst, wurde mittels PCR (Primer CgPPT KO1/CgPPT KO2) amplifiziert und in pGem-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert. Durch Restriktionsverdau mit *Eco8II* und anschließender Ligation wurde ein 182 bp Fragment aus dem 5'-Bereich des *CgPPT1* ORF (Nukleotide 226-307) durch die 2,55 kb große *Eco8II*-Hygromycinresistenzkassette des Vektors pGEMhphBsuI ersetzt. Die Transformation fungaler Protoplasten erfolgte mit dem PCR-Produkt (Primer CgPPT KO1/CgPPT KO2) des vollständigen Deletionsfragments. Als PCR-Template wurde der Vektor pGEMCgPPT1KO mit dem 4,68 kb großen KO-Konstrukt verwendet. Der Nachweis der korrekten Integration des KO-Konstrukts erfolgte durch Southern-Analyse. Dazu wurde die DNA einzelner Transformanten mit *PstI* fragmentiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran fixiert und mit einer

spezifischen 686 bp großen DIG-Sonde (Primer PPT KO Sonde1/PPT KO Sonde2; Nukleotide -849 bis -163 vor ATG) hybridisiert.

Zur Herstellung des *CgPPT1*-Expressionskonstrukts wurde zunächst ein 2316 bp DNA-Fragment, welches 1,2 kb der *CgPPT1*-Promoterregion sowie den vollständigen *CgPPT1*-ORF umfasst, mittels PCR amplifiziert (Primer EGFP1/EGFP2) und in pGem-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert. Der resultierende Vektor pGEMPPTfl wurde mit *Bsp119I* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die Terminatorsequenz des *Aspergillus nidulans trpC*-Gens des Vektors pSH1.6EGFP (750bp) wurde mittels PCR amplifiziert (Primer TERfw/EGFP4) und in die *Bsp119I*-Restriktionsstelle des Vektors pGEMPPTfl kloniert. Das vollständige *CgPPT1*-Komplementationskonstrukt wurde durch *NotI*-Restriktionsverdau aus pGEMCgPPT1KOM geschnitten und zur Transformation von Protoplasten der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante verwendet. Modifiziertes Regenerationsmedium (M10) und Selektionsmedium (M11) ohne Lysin wurde zur Selektion lysin-prototropher Transformanten eingesetzt.

II.4.8.2 Inaktivierung und Komplementation von *CgPKS1*

Die Inaktivierung von *CgPKS1* erfolgte durch die Integration einer Hygromycin-resistenzkassette in den ORF des Gens. Zunächst wurde ein 1689 bp großes Fragment von *CgPKS1* (Nukleotide 3557-5246) mittels PCR amplifiziert (Primer CgPKS1KO1/CgPKS1KO2) und in pGem-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert. Der resultierende Vektor pGEMCgPKS1fl wurde mit *Bsp119I* linearisiert und anschließend dephosphoryliert. Die 3,7 kb große Hygromycinresistenzkassette aus dem Vektor pAN7-1, subkloniert in pCR2.1hphBsp119I, wurde durch *Bsp119I*-Restriktionsverdau aus pCR2.1hphBsp119I geschnitten und in die *Bsp119I*-Restriktionsstelle von pGEMCgPKS1fl kloniert. Das vollständige 5,4 kb große KO-Konstrukt aus dem Vektor pGEMCgPKS1KO wurde anschließend mittels PCR amplifiziert (Primer CgPKS1KO1/CgPKS1KO2) und zur Transformation fungaler Protoplasten verwendet.

Der Nachweis der korrekten Integration des KO-Konstrukts erfolgte durch Southern-Analyse. Dazu wurde die DNA einzelner Transformanten mit *XhoI* fragmentiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran fixiert und mit einer spezifischen Sonde (Primer CgPKS1 probe1/CgPKS1 probe2; Nukleotide 4424-4708) hybridisiert.

Das *CgPKS1*-Komplementationskonstrukt wurde durch PCR-Amplifikation eines 7,2 kb großen DNA-Fragments (Primer CgPKS1fl1/CgPKS1fl2), welches den *CgPKS1*-ORF und etwa 500 bp Terminatorregion umfasst, generiert. Die Klonierung des Fragments in den Vektor pJET2.1/blunt führte zum Vektor pJETCgPKS1fl. Die Fusion mit dem *oliC*-Promoter aus *Aspergillus nidulans* (Ward & Turner, 1986 MGG) erlaubt eine konstitutive Expression von *CgPKS1*. Dazu wurden 833 bp *oliC*-Promoterregion von genomischer DNA mittels PCR amplifiziert (Primer Olic fw Xba/Olic rev Xba), in pGem-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert, durch *XbaI*-Restriktion aus dem Klonierungsvektor geschnitten und in die *XbaI*-Restriktionsstelle von pJetblunt, in 5'-Orientierung zum promoterlosen *CgPKS1*-Komplementationskonstrukt, kloniert. Das etwa 8 kb große Komplementationskonstrukt aus dem Vektor pGEMCgPKS1KOM wurde mittels PCR amplifiziert (Primer Olic fw Xba/CgPKS1fl2) und zur Transformation von Protoplasten der $\Delta CgpkS1$ -Deletionsmutante verwendet. Dabei wurde das Komplementationskonstrukt mit dem PCR-Produkt (Primer nousrf/noursr) der Nourseothricin-Resistenzkassette des Vektors pNR1 (Malonek *et al.*, 2004) ko-transformiert. Ein weiterer Komplementationsansatz basierte auf der heterologen Integration des *Colletotrichum lagenarium* *PKS1*-Gens durch Transformation von Protoplasten der $\Delta CgpkS1$ -Mutante mit dem linearisierten Vektor pTAPSG (Fujii *et al.*, 1999).

II.4.8.3 Inaktivierung von *CgAAR*

Die Herstellung des KO-Konstrukts für die vollständige Deletion von *CgAAR* erfolgte mittels DJ-PCR (s. II.4.4.2). Zunächst wurden in separaten PCR-Ansätzen jeweils 1 kb 5'- und 3'-flankierende Bereiche (Primer DJ-5'Flanke-for/DJ-5'Flanke-rev bzw. DJ-3'Flanke-for/DJ-3'Flanke-rev) des *CgAAR*-ORF und die Hygromycin-Resistenzkassette des Vektors pAN7-1 (Primer Hyg DJ fw/Hyg DJ rev) amplifiziert. Komplementäre Überhänge der PCR-Produkte ermöglichten in einer zweiten PCR die Fusion der einzelnen Fragmente zum kompletten KO-Fragment. In einer terminalen PCR wurde das Fusionsprodukt der vorhergehenden Reaktion mit Hilfe spezifischer Primer (DJ-5'Flanke-nes/DJ-3'Flanke-nes) zur Gewinnung größerer Mengen des KO-Fragments amplifiziert und anschließend zur Transformation fungaler Protoplasten verwendet. Der Nachweis der korrekten Integration des KO-Konstrukts erfolgte durch Southern-Analyse. Dazu wurde die DNA einzelner Transformanten mit *Eco8II* fragmentiert,

elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran fixiert und mit einer spezifischen Sonde (Primer Cg-SQ_7/AAR-Sonde-rev; Nukleotide 2929-3335 Vektor pAN7-1 sowie 0,5 kb *CgAAR*-Terminatorbereich) hybridisiert.

II.4.8.4 Inaktivierung von *MoPPT1*

Ein 3135 bp DNA-Fragment, welches den kodierenden Bereich von *MoPPT1* (1146bp) sowie jeweils etwa 1000 bp 5'- und 3'-flankierende Sequenz umfasst, wurde mittels PCR (MagPPTKO fw/MagPPTKO rev) amplifiziert und in pGem-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert. Durch Restriktionsverdau mit *Eco81I* und *StuI* wurde ein 870 bp Fragment, welches den Bereich von 60 bp vor dem putativen Translationsstart bis 810 bp nach dem ATG des *MoPPT1*-Gens umfasst, durch die 2,6 kb große *Eco81I/StuI*-Hygromycin-Resistenzkassette des Vektors pGEMhphEco81I/StuI ersetzt. Das fertige KO-Konstrukt wurde durch Restriktion mit *NotI* aus pGem-Teasy geschnitten und in den mit *PspOMI* linearisierten Vektor pCAMBIA0380 kloniert.

Der Nachweis der korrekten Integration des KO-Konstrukts erfolgte durch Southern-Analyse. Dazu wurde die DNA einzelner Transformanten mit *PstI* fragmentiert, elektrophoretisch aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran fixiert und mit einer spezifischen 400 bp großen Sonde (Primer MagPPTprobe1/MagPPTprobe2; Nukleotide -480 bis -80 vor ATG) hybridisiert.

II.4.9 *eGFP*-Fusionen

II.4.9.1 *CgPPT1:eGFP*

In die unikale *Bsp119I*-Restriktionsstelle des Plasmids pGEMPPTfl wurde ein 1,5 kb großes PCR-Fragment (Primer EGFP3/EGFP4) kloniert, welches den ORF des *eGFP*-Gens sowie dem Terminator des *Aspergillus nidulans trpC*-Gens aus dem Vektor pSH1.51EGFP enthält. Der resultierende Plasmidvektor wurde durch *AgeI*-Restriktion linearisiert. Anschließend wurde die 2,4 kb große Hygromycin-Resistenzkassette des Vektors pGEMhphAgeI in die *AgeI*-Schnittstelle des *eGFP*-Fusionsvektors kloniert. Das vollständige 6,2 kb große *CgPPT1:eGFP* Fusionskonstrukt wurde mit der Re-

sistenzkassette durch *NotI*-Restriktionsverdau aus pGem-Teasy (Promega, Mannheim) geschnitten und zur Transformation von CgM2-Protoplasten verwendet.

II.4.9.2 *CgPKS1:eGFP*

Ein 1,3 kb großes DNA-Fragment, welches 300 bp des putativen *CgPKS1*-ORF sowie 1 kb Promotersequenz umfasst, wurde mittels PCR amplifiziert (Primer PKSEGFP1/PKSEGFP2) und in pGEM-Teasy (Promega, Mannheim) kloniert. In die unikale *Bsp119I*-Restriktionsstelle des resultierenden Vektors pGEMPKS1egfp1 wurde ein 1,5 kb großes PCR-Fragment (Primer EGFP3/EGFP4) kloniert, welches den ORF des *eGFP*-Gens mit dem Terminator des *Aspergillus nidulans trpC*-Gens aus dem Vektor pSH1.6EGFP enthält. Der resultierende Plasmidvektor wurde durch *AgeI*-Restriktion linearisiert. Anschließend wurde die 2,4 kb Hygromycin-Resistenzkassette des Vektors pHPHAgeI in die *AgeI*-Schnittstelle des eGFP-Fusionsvektors kloniert. Das vollständige 5,2 kb große *CgPKS1:eGFP* Fusionskonstrukt wurde mit der Resistenzkassette durch *NotI*-Restriktionsverdau aus pGem-Teasy (Promega, Mannheim) geschnitten und zur Transformation von CgM2-Protoplasten verwendet.

II.4.10 Sequenzierung und Sequenzanalyse

II.4.10.1 Sequenzierreaktion und Probenvorbereitung

Die verwendete Sequenziermethode beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide ermöglichen die Detektion der PCR-Fragmente, wobei die vier im Reaktionsmix (Applied Biosystems, Weiterstadt) vorhandenen ddNTPs durch eine Markierung mit unterschiedlichen Chromophoren identifiziert werden. Templates für die Sequenzierreaktion waren PCR-Produkte sowie Plasmid-DNA.

Ein 10 μ l Sequenzieransatz setzte sich wie folgt zusammen:

Volumen	Reagenz	Stammkonzentration
2 μ l	Ready Reaction Mix	-
1 μ l	Sequenzierprimer	2 μ M
50-500 ng DNA		
<i>ad</i> H ₂ O _{bidest}		

Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

96°C	1 min	initiale Denaturierung	30 Zyklen
96°C	10 s	Denaturierung	
55°C	10 s	Annealing	
60°C	4 min	finale Elongation	

Dreißig Reaktionszyklen wurden durchlaufen. Durch Zugabe von 1 μ l Sequenzierpuffer (P20) und 25 μ l Ethanol wurde die enzymatische Reaktion terminiert und markierte DNA-Fragmente gefällt. Der gesamte Ansatz wurde zunächst 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 20 min bei 5000 g und 4°C zentrifugiert, mit 50 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation für 15 min bei 5000 g und 4°C unter der Sterilbank getrocknet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

II.4.10.2 Sequenzierung und Analyse der Daten

Sequenzanalysen wurden mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Handhabung des Geräts erfolgte nach Herstellerangaben.

Sequenzauswertung und manuelle Korrektur der Sequenzdaten wurden mit dem Laser-gene-Programmpaket DNASTAR (Madison, USA) vorgenommen. Homologievergleiche (BLAST Search; Altschul *et al.*, 1997) und Datenbankrecherche erfolgten über die Internetseiten des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

II.4.11 Expression rekombinanter Proteine

II.4.11.1 Expressionsstrategie

CgPPT1 (NCBI accession AAZ04409) wurde mittels PCR unter Verwendung von Template-cDNA amplifiziert (Primer *CgPPT1expr1/CgPPT1expr2*) und nach *NdeI/NotI*-Restriktion in die entsprechenden Schnittstellen des *E. coli*-Expressionsvektors pET28a (Novagen, Darmstadt) kloniert.

Auf gleichem Weg erfolgte die Klonierung der ACP-Domäne von *CgPKS1* (NCBI accession FJ194435; Nukleotide 4969-5268; Primer *CgPKS1expr1/CgPKS1expr2*) in pET28a. Außerdem wurde das durch PCR generierte Fragment von *CgPKS1* (Primer *CgPKS1expr3/CgPKS1expr2*) unter Verwendung der *EcoRI/NotI*-Restriktionsstellen in den *E. coli*-Expressionsvektor pGEX-4T-1 (GE Healthcare, München) kloniert. Diese Klonierungsstrategie ermöglicht die Expression von Proteinen mit N-terminalem (His)₆- (pET28a) bzw. GST- (pGEX-4T-1) Tag.

Die Vektorkonstrukte wurden mittels Transformation in *E. coli* BL21(DE3) eingeschleust, reisoliert und durch Sequenzierung und Sequenzanalyse kontrolliert.

II.4.11.2 Proteinexpression in *E. coli*

Einzelkolonien transformierter *E. coli* BL21 (DE3) wurden in 5 ml LB-Flüssigmedium (**M3**; 50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin) übertragen und bei 37°C und 200 rpm im Kulturschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) über Nacht inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden am nächsten Tag Erlenmeyerkolben mit 1000 ml LB-Flüssigmedium (**M3**; 50 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin) inokuliert und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37°C und 200 rpm inkubiert.

Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von 10 ml IPTG-Lösung (**L11**). Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 g sedimentiert (Sorvall RC 5C Plus; Rotor SLA-1500; Sorvall Deutschland, Bad Homburg).

II.4.11.3 Zellaufschluss

Das erhaltene Zellpellet mit einem Gewicht von etwa 8 g (s. II.4.11.2) wurde in 45 ml Aufschlusspuffer (**P21**) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter Verwendung einer French-Press (Aminco; SLM Instruments, Rochester, USA) bei einem Maximaldruck von $1,1 \times 10^8$ Pa und anschließender abrupter Entspannung. Insgesamt wurden drei Hochdruck-/Entspannungsphasen durchlaufen.

II.4.11.4 Proteinreinigung

Die Proteinreinigung wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers mit dem ÄKTAprime System (GE Healthcare, München) bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Zellysate mit exprimierten (His)₆- Proteinen wurden zunächst auf eine HiTrap DEAE FF-Säule (GE Healthcare, München), äquilibriert mit DEAE-Puffer (**P22**), aufgetragen. Der Säulendurchfluss wurde anschließend für die Beladung der mit HT-Puffer (**P23**) äquilibrierten HisTrap-Säule (GE Healthcare, München) verwendet. Die Elution gebundener Proteine erfolgte in einem linearen Gradienten von 0-500 mM Imidazol in Äquilibrierungspuffer (**P23**).

Lysate mit dem GST-Fusionsprotein wurden auf eine GSTrap HP-Säule (GE Healthcare, München), äquilibriert mit HP-Puffer (**P24**), aufgetragen. Die Elution erfolgte in Äquilibrierungspuffer (**P24**) mit 10 mM reduziertem *L*-Glutathione (Sigma-Aldrich, Hamburg). Fraktionen mit affinitätsgereinigten Proteinen wurden vereinigt und mit Zentrifugenfiltern (Amicon Ultra; Millipore, Billerica, USA) nach Herstellerangaben konzentriert. Verbliebene Verunreinigungen wurden anschließend unter Verwendung einer HiLoad 16/60 Superdex 75 pg-Säule (GE Healthcare, München), äquilibriert mit HL-Puffer (**P25**), entfernt. Die Lagerung von (His)₆-CgPPT1 und GST-CgPKS100 erfolgte bei -80°C in Storage-Puffer (**P26**).

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die theoretischen Absorptionskoeffizienten von (His)₆-CgPPT1 und GST-CgPKS100 verwendet (www.expasy.org/tools). Die Messung 100fach verdünnter Aliquote erfolgte bei 280 nm (Uvikon 933 Double Beam UV/VIS Spectrophotometer; Kontron Instruments, Mailand, Italien).

II.4.12 *in vitro* 4'-Phosphopantetheinylierung

II.4.12.1 Phosphopantetheinylierungsreaktion

Reaktionsansätze zum Nachweis der Phosphopantetheinyltransferaseaktivität von (His)₆-CgPPT1 enthielten 100 µM fluoreszenzmarkiertes CoA-488 (Covalys, Witterswil, Schweiz), 5 µM (His)₆-CgPPT1 und 50 µM GST-CgPKS100 in 1x PP-Reaktionspuffer (**P30**) in einem Gesamtvolumen von 25 µl. In parallelen Kontrollansätzen wurden einzelne Reaktionskomponenten durch das entsprechende Volumen H₂O_{bidest} ersetzt.

Die Ansätze wurden 30 min bei 23°C im WiseCube-Inkubator (Daihan Scientific, Seoul, Korea) inkubiert. Terminiert wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl 2x SDS-Probenpuffer (**P27**) und Erhitzen auf 95°C für 2 min im Heizblock (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg).

II.4.12.2 SDS-Gelelektrophorese

Je 10 µl Probenvolumen wurden mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) in 12%igem Acrylamidgel (Sammelgel: 3,9% (w/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 125 mM Tris-HCl; pH 6,8; 0,1% (w/v) SDS; Trenngel: 12% (w/v) Acrylamid; 0,32% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid; 0,375 mM Tris-HCl; pH 8,8; 0,1% (w/v) SDS) in SDS-Laufpuffer (**P28**) bei konstant 30 mA aufgetrennt. Die Polymerisationsreaktion wurde durch die Zugabe von 0,01% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat sowie 0,005% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine gestartet. Verwendet wurden Gießvorrichtung und Laufkammer des Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis Systems (Biorad Laboratories, München).

II.4.12.3 Detektion markierter Reaktionsprodukte

Acrylamidgele wurden 2 h unter leichtem Schwenken (Unimax 2010; Carl Roth, Karlsruhe) in einer Coomassie-Färbelösung (**L5**) angefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde anschließend unter leichtem Schütteln in Entfärbelösung (**L6**) entfernt.

Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines FLA-3000 Phosphoimagers (Fujifilm, Düsseldorf).

II.5 Metabolitanalytik

II.5.1 Fermentation und Extraktion

II.5.1.1 Fermentation von *C. graminicola*

Sterilisierte Fermenter (Modell C6; Biolafitte, Paris, Frankreich) mit 20 l Kulturmedium (**M 12**) sowie 1 ml Silikonentschäumer (Merck, Darmstadt) wurden mit 200 ml CgM2-Vorkultur beimpft. Die anschließende Fermentation erfolgte bei konstant 21°C, 130 rpm des Rührwerks und einer Luftzufuhr von 3 l/min. Tagesproben wurden zur Bestimmung von pH-Wert (pH-Meter CG 820; Schott, Hofheim) und Glucosegehalt (Diabur-Test 5000; Roche Diagnostics, Mannheim) steril entnommen. Die Fermentation wurde beendet, sobald keine Glucose im Kulturmedium mehr nachweisbar war.

II.5.1.2 Herstellung von Extrakten aus Kulturüberständen

Flüssiger Kulturüberstand und Pilzmyzel der Fermentation wurden durch Filtration (200x200 mm Tiefenfilter; Pall Corporation, Bad Kreuznach) separiert. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde mit dem gleichen Volumen Ethylacetat (BASF, Ludwigshafen) extrahiert. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuumrotationsverdampfer (Rotavapor RE-111, Büchi, Essen) entfernt. Nach der Bestimmung des Rückstandsgewichts erfolgte die Lagerung des Extrakts bei -20°C.

II.5.2 Chromatographie und Strukturaufklärung

II.5.2.1 Adsorptionschromatographie

Rohextrakte wurden durch die Verwendung von Kieselgel 60 (0,063-0,2 mm; Merck, Darmstadt) mittels Adsorptionschromatographie aufgetrennt. Die Präparation der Säule erfolgte mit Kieselgel (50 g/g Rohextrakt), das etwa 10 min in Cyclohexan (Merck, Darmstadt) entgast wurde. Das Säulenbett wurde mit dem an Kieselgel gebundenen Extrakt überschichtet. Eluiert wurde mit dem 3fachen Säulenvolumen folgender Lösungsmittel:

1. Cyclohexan
2. Cyclohexan/Ethylacetat 9:1
3. Cyclohexan/Ethylacetat 3:1
4. Cyclohexan/Ethylacetat 1:1
5. Ethylacetat
6. Ethylacetat/Methanol 3:1
7. Ethylacetat/Methanol 1:1
8. Methanol

Die jeweiligen Fraktionen wurden in Rundkolben aufgefangen und die verwendeten Lösungsmittel im Vakuumrotationsverdampfer (Rotavapor RE-111; Büchi, Essen) entfernt. Nach der Bestimmung des Rückstandsgewichts erfolgte die Lagerung der Extraktfraktionen bei -20°C.

II.5.2.2 Präparative HPLC

Zur Reindarstellung von Metaboliten aus *C. graminicola* wurden vorbereitete Extraktfraktionen (s. II.5.2.1) zunächst filtriert (Chromabond C18ec; Macherey-Nagel, Düren) und anschließend in folgendem präparativen System aufgetrennt:

Shimadzu Preparative Liquid Chromatography (Shimadzu Deutschland, Duisburg)

- LC-8A Pumpeneinheit
- DG-4213 Degasser
- SCL-10A Systemkontroller

- SPD-M10A Diodenarray-Detektor
- FRC-10A Fraktionssammler
- stat. Phase: Nucleosil-7 C18 (RP 18, 250x10 mm, 7 μ m; Macherey-Nagel, Düren)
- Gradient: 10%-100% Acetonitril (AcN:H₂O), Fluss: 20 ml/min, 50 min
- Temperatur: 40°C
- Detektion: 210 nm.

Fraktionen mit distinkten Peaks wurden zur weiteren Analyse ausgewählt. Das verwendete Acetonitril-Wasser-Gemisch wurde im Vakuumrotationsverdampfer (Rotavapor RE-111; Büchi, Essen) entfernt. Nach der Bestimmung des Rückstandsgewichts erfolgte die Lagerung der Proben bei -20°C.

II.5.2.3 Analytische HPLC und HPLC/MS

Analytische HPLC-Untersuchungen wurden zur qualitativen Kontrolle isolierter Substanzen sowie zur Identifizierung bekannter Verbindungen in komplexen Stoffgemischen durchgeführt. Das folgende analytische HPLC-System wurde verwendet:

HP 1100 Series U (Hewlett-Packard, Waldbronn)

- stationäre Phase: LiChrospher (RP 18, 125x4 mm, 5 μ m; Merck, Darmstadt)
- Gradient: 0%-100% Acetonitril (AcN:H₂O), Fluss: 2 ml/min, 25 min
- Temperatur: 40°C
- Detektion: 210-300 nm.

Injiziert wurden 5-25 μ l Probenvolumen, wobei komplexe Stoffgemische in einer Konzentration von 2 mg Extrakt/ml und Reinsubstanzen in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt wurden.

Die Massenspektren isolierter Substanzen wurden mit Hilfe eines HPLC/MS-Systems (HP-LC/MSD-System Series 1100; Hewlett-Packard, Waldbronn) bestimmt. Sämtliche Massenspektren wurden in einem Durchlauf mit positiver und negativer Polarität der Dynode aufgenommen. Die Temperatur der Verdampfungskammer betrug 400°C. Die Nadelspannung betrug bei positiver Ionisierung 3500 V und der Koronastrom 4 μ A, bei negativer Ionisierung 2200 V und der Koronastrom 12 μ A.

Das verwendete HPLC-MS-System war mit RP-18 Trennsäulen (LiChroCART 125-2, 4 µm Supersphere 100 RP-18; Merck, Darmstadt) ausgestattet. Als Eluenten wurden H₂O bzw. 0,1%ige Ameisensäure und Acetonitril eingesetzt. Sämtliche Analysen wurden bei konstant 40°C durchgeführt. Optimale Gradienten wurden empirisch ermittelt.

II.5.2.4 Identifizierung von Metaboliten

Die Identifizierung von Reinsubstanzen bzw. Substanzen aus komplexen Stoffgemischen erfolgte mittels analytischer HPLC (s. II.5.2.3) anhand der Parameter HPLC-Retentionszeit und UV-Absorption durch einen Abgleich mit den Daten bekannter Substanzen aus der Reinsubstanzbibliothek des IBWF. Zusätzlich wurde das Massenspektrum zur Substanzidentifizierung herangezogen.

NMR-Messungen sowie die Aufklärung der chemischen Struktur von unbekanntem Metaboliten wurden von Prof. Dr. Till Opatz, Johannes C. Liermann, Dr. V. Sinnwell (Universität Hamburg), Dr. N. Hanold und Heinz Kolshorn (Universität Mainz) durchgeführt.

II.6 Dokumentation

II.6.1 Mikroskopie

II.6.1.1 Lichtmikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Eclipse E600-Forschungsmikroskop (Nikon, Düsseldorf) durchgeführt. Die Ausstattung des optischen Systems erlaubte Beobachtungen im Hellfeld und DIC-Modus. Bilder von Untersuchungsobjekten wurden mit Hilfe einer digitalen Mikroskopkamera (Digital Sight DS-SM; Nikon, Düsseldorf) aufgezeichnet.

II.6.1.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Objekte bzw. GFP-markierte Pilzisolat wurden mit einem Nikon Eclipse 90i Confocal Laser Scanning-Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) untersucht. Anregungswellenlänge und Detektionsbereich wurden entsprechend den Spezifikationen der verwendeten Fluorophore gewählt. Zur Minimierung von Lichtstreuungseffekten erfolgte die Bildgewinnung, wann immer möglich, bei 30 µm Öffnungsweite der Lochblende. Digitale Bilder der Untersuchungsobjekte wurden während des Scan-Prozesses generiert und zusätzlich mit Hilfe einer Mikroskopkamera (Digital Sight DS-SM; Nikon, Düsseldorf) im Durchlichtmodus aufgezeichnet.

II.6.1.3 Färbetechniken

Calcofluor White (Sigma-Aldrich Chemie, München) bindet spezifisch an Chitin und ermöglicht damit die Markierung fungaler Zellwände. Pilzmaterial wurde 10-15 min in PBS (**P29**) mit 0,03% (w/v) Calcofluor-White bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2x mit PBS (**P29**) gewaschen. Das Absorptionsmaximum von Calcofluor-White in PBS (**P29**) liegt bei 355 nm, die maximale Emission bei 433 nm.

Säurefuchsin färbt fungale Zellwandbestandteile und erhöht damit die Kontrastierung hyaliner Pilzstrukturen im Pflanzengewebe. Blattsegmente wurden in Säurefuchsin-Lactophenol (**L7**) 20 min bei 60°C unter leichtem Schütteln (Thermomixer comfort; Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Fixierung und Entfärbung erfolgten in einem Essigsäure-Ethanol-Gemisch (1:1). Das Absorptionsmaximum von Säurefuchsin liegt bei 540 nm, die maximale Emission bei 630 nm.

Nile Red (Acros Organics, Geel, Belgien) färbt spezifisch intrazelluläre Lipiddepots. Pilzmaterial wurde 5 min in 5 µg Nile Red/ml PBS (**P29**; Stammlösung: 500 µg Nile Red/ml Aceton) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 2x mit PBS (**P29**) gewaschen. Das Absorptionsmaximum in wässrigen Lösungen liegt bei 549 nm, die maximale Emission bei 628 nm.

II.6.2 Photographie und Bildbearbeitung

Bilder zur Dokumentation experimenteller Resultate wurden mit einer Nikon D50 Digitalkamera (Nikon, Düsseldorf) aufgenommen. Die Bearbeitung digitaler Bilder erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop Version CS 8.8 (Adobe Systems, San Jose, USA).

II.6.3 Statistik

Statistische Analysen (T-Test, ANOVA) wurden mit dem Programm XLSTAT Version 2009.4.02 (Addinsoft, Andernach) durchgeführt.

III Ergebnisse

III.1 Charakterisierung von *CgPPT1*

III.1.1 Expression von *CgPPT1*

Sfp-PPTasen aktivieren als zentrale Komponenten des pilzlichen Metabolismus Enzyme des Primär- und Sekundärstoffwechsels, deren katalytische Aktivitäten für die Synthese von Produkten mit vielfältigen Funktionen benötigt werden. Untersuchungen zur Expression von *CgPPT1* sollten daher zunächst klären, ob *CgPPT1* tatsächlich in allen Phasen des fungalen Entwicklungszyklus, speziell im Verlauf der Maisinfektion, exprimiert wird.

Infektionsstrukturen von *C. graminicola* differenzieren während der Pathogenese asynchron. Aus diesem Grund ist die Aussagekraft von Transkriptionsanalysen mittels RT-PCR im Hinblick auf die Expression von *CgPPT1* in individuellen Infektionsstrukturen limitiert. Genaue Untersuchungen der *CgPPT1*-Expression sollten daher durch die Inokulation von Maispflanzen und Zwiebelepidermen mit Konidien eines Stammes, der ein *CgPPT1:eGFP*-Reporterkonstrukt exprimiert, vorgenommen werden.

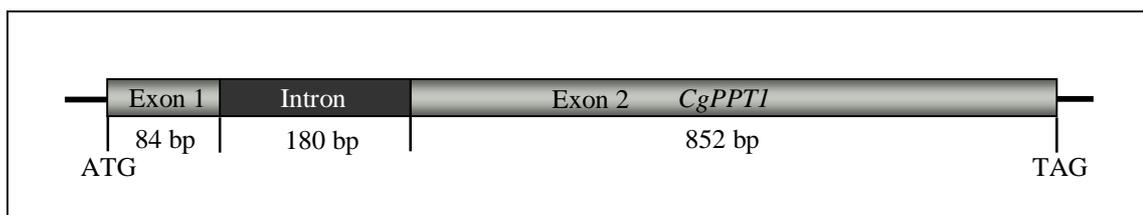


Abb. 10: Struktur von *CgPPT1*

Der kodierende Bereich von *CgPPT1* umfasst zwei Exons von 84 bp bzw. 852 bp Länge (inklusive TAG) und wird durch ein Intron von 180 bp Länge unterbrochen. Das abgeleitete Protein besteht aus 311 Aminosäuren.

Die 4'-Phosphopantetheinyltransferase *CgPPT1* aus *Colletotrichum graminicola* wurde in einem Ansatz zur genetischen Komplementation der *Saccharomyces cerevisiae* Δ lys5-Deletion isoliert und strukturell charakterisiert (Abb. 10). RT-PCR-Experimente

wiesen auf eine konstitutive Expression von *CgPPT1* in allen Stadien der saprophytischen Lebensweise hin (Graf, 2004).

Ausgehend vom 5'-Bereich des *CgPPT1*-ORF erfolgte zunächst die Isolierung der Promoterregion mittels Genome Walking nach Liu & Baird (2001). Unter Verwendung dieser Technik wurde ein 1,2 kb großes DNA-Fragment, das den Promoterbereich von *CgPPT1* umfasst, identifiziert (Abb. 11). Damit war es möglich, *CgPPT1:eGFP*-Fusionskonstrukte unter der Kontrolle des nativen Promoters zu exprimieren.

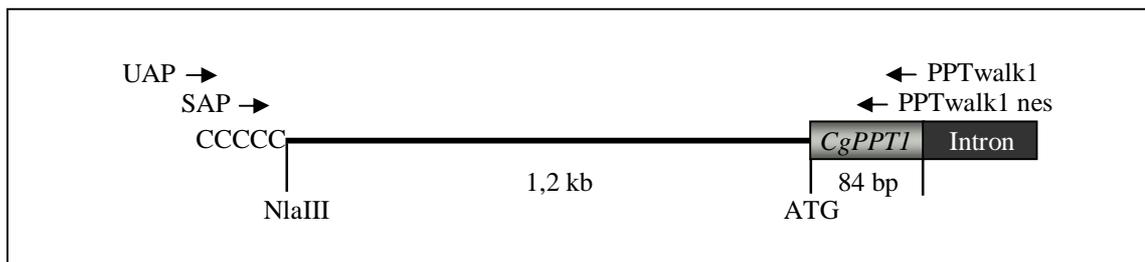


Abb. 11: Isolierung des *CgPPT1*-Promoters

Partielle *NaIII*-Restriktion generierte DNA-Fragmente mit 3'-Überhängen, welche durch die katalytische Aktivität des Enzyms Terminale Desoxynukleotidyltransferase (TdT) mit Desoxycytidintriphosphat (C) verlängert wurden. Die Primer SAP bzw. UAP wurden zur PCR-Amplifikation der unbekannt Promoterregion zusammen mit den genspezifischen Primern (PPTwalk1 bzw. PPTwalk1 nes) eingesetzt.

Fluoreszenzmikroskopischen Bilder von Maisblättern bzw. Zwiebelepidermen, die mit Konidien des *CgPPT1:eGFP*-Reporterstammes inokuliert wurden, zeigten morphologisch nahezu identische Infektionsstrukturen und eine hohe Übereinstimmung des zeitlichen Infektionsverlaufs in beiden Wirten (Abb. 12).

Etwa 24 h nach Beginn der Infektion waren gekeimte Konidien (24 h, Pfeilkopf) sowie differenzierte Appressorien (24 h, Pfeil) auf der Pflanzenoberfläche sichtbar. Infektionsvesikel und Primärhyphen (32 h bzw. 48 h, Pfeile) beschränkten sich als charakteristische Strukturen der biotrophen Phase ausschließlich auf die erfolgreich penetrierte Epidermiszelle. Dagegen durchbrachen sekundäre Infektionshyphen die Zellwände benachbarter Pflanzenzellen und kennzeichneten so den Eintritt in die nekrotrophe Phase der Wirt-Parasit-Interaktion (72 h, Pfeil). Schließlich erschienen neu gebildete Konidien auf der Pflanzenoberfläche (120 h, Pfeil). Acervuli (120 h, obere Reihe) mit zahlreichen Konidien (Pfeil) und Setae (Pfeilkopf) konnten nach einer Infektion von Maisblättern beobachtet werden.

Dagegen erfolgte die Konidiogenese in infizierten Zwiebelepidermen hauptsächlich durch die Differenzierung lateraler Mycelien zu Konidien (120 h, untere Reihe, Pfeil).

GFP-Fluoreszenz des Reporterkonstrukts war in sämtlichen Infektionsstrukturen und zu jedem Zeitpunkt der Pathogenese sichtbar.

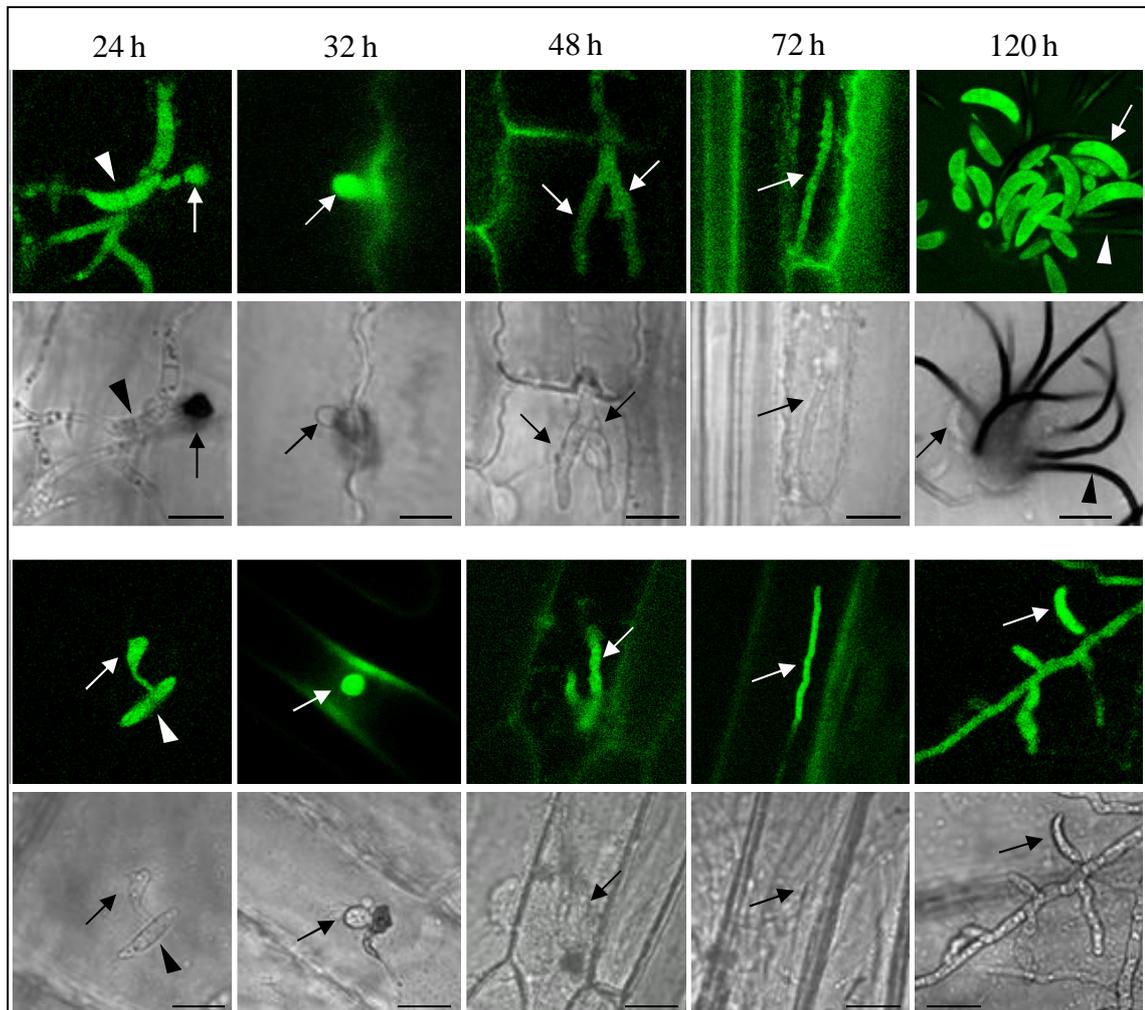


Abb. 12: Expression des *CgPPT1:eGFP*-Reporterkonstrukts

Expression des *CgPPT1:eGFP*-Fusionkonstrukts nach der Inokulation von Maisblättern (obere Doppelreihe) bzw. Zwiebelepidermen (untere Doppelreihe). Gekeimte Konidien (Pfeilkopf) und differenzierte Appressorien (Pfeil) waren 24 h nach Beginn der Infektion auf der Pflanzenoberfläche zu erkennen. Infektionsvesikel, Primär- und Sekundärhyphen waren nach 32 h, 48 h bzw. 72 h deutlich sichtbar (Pfeile). Etwa 120 h nach Beginn der Infektion markierten Sporenlager mit Konidien (obere Reihe, Pfeil) und Setae (obere Reihe, Pfeilkopf) bzw. vom Myzel gebildete Konidien (untere Reihe, Pfeil) den erfolgreichen Abschluss des Infektionszyklus (obere Reihen: Fluoreszenz, untere Reihen: Hellfeld; Balken=20 μ m).

Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf die konstitutive Expression von *CgPPT1* im Verlauf der Pathogenese und betonen die zentrale Rolle des Enzyms im fungalen Stoffwechsel.

III.1.2 *in vitro* 4'-Phosphopantetheinylierung

Um den experimentellen Nachweis der Phosphopantetheinyltransferaseaktivität von CgPPT1 führen zu können, wurden CgPPT1 und die ACP-Domäne von CgPKS1 als Fusionsproteine mit einem (His)₆-Tag ([His]₆-CgPPT1) bzw. GST-Tag (GST-CgPKS100) heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Proteinreinigung erfolgte durch Ionenaustausch-, Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie.

In qualitativen Reaktionsansätzen konnte die Transferaseaktivität von (His)₆-CgPPT1 direkt bestätigt werden (Abb. 13). Die Übertragung der fluoreszenzmarkierten Phosphopantetheinylgruppe von CoA-488 auf CgPKS100 durch (His)₆-CgPPT1 wurde einerseits durch die Größenverschiebung des phosphopantetheinylierten GST-CgPKS100 im SDS-Acrylamidgel (linke Bildhälfte, Pfeil), andererseits durch die kovalente Kopplung von fluoreszenzmarkierter Phosphopantetheinylgruppe und GST-CgPKS100 (rechte Bildhälfte, Pfeil) nachgewiesen.

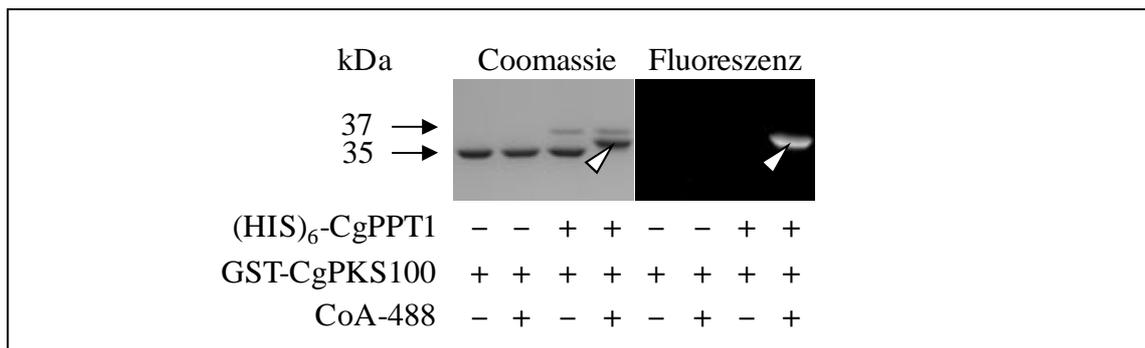


Abb. 13: *in vitro* 4'-Phosphopantetheinylierungsreaktion

Die Übertragung der fluoreszenzmarkierten Phosphopantetheinylgruppe von CoA-488 auf die ACP-Domäne der Polyketidsynthase CgPKS1 (CgPKS100) erfolgte ausschließlich, wenn (His)₆-CgPPT1 (37 kDa) und GST-CgPKS100 (35 kDa) zusammen mit CoA-488 inkubiert wurden. Die Größenverschiebung von GST-CgPKS100 im SDS-Gel (linke Bildhälfte, Pfeil) bzw. detektierte Fluoreszenz ($\lambda_{Em}=519$ nm) belegten die erfolgreiche 4'-Phosphopantetheinylierung des Substrats (vgl. rechte und linke Bildhälfte, Pfeilkopf).

Ein weiterer Nachweis der kovalenten Kopplung von PP-Gruppe und GST-CgPKS100 konnte durch MALDI-TOF/MS-Analysen tryptischer CgPKS100-Fragmente geführt werden. Phosphopantetheinylierte (CgPKS31-P, Abb. 14, untere Bildhälfte) und nichtmodifizierte (CgPKS31, Abb. 14, obere Bildhälfte) Fragmente von 31 Aminosäuren wiesen unterschiedliche molare Massen auf. Die ermittelte Differenz entsprach exakt der molaren Masse der biotinylierten PP-Gruppe.

Das tryptische Fragment CgPKS31 enthält ein konserviertes DSL-Motiv (CgPKS31, S: modifiziertes Serin, vgl. obere und untere Bildhälfte), welches als Phosphopantetheinylierungs-Konsensussignal identifiziert wurde (Mofid *et al.*, 2002).

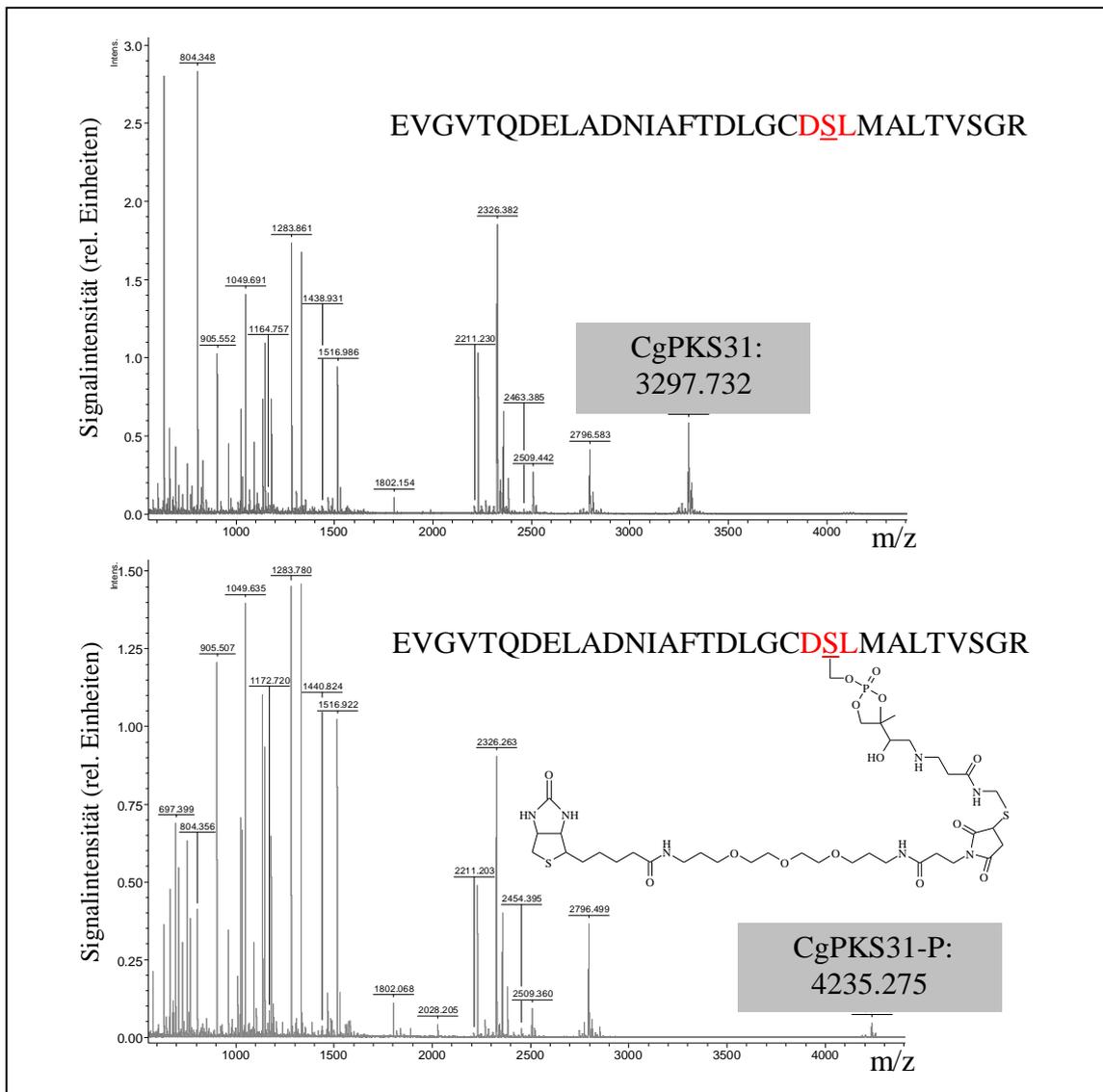


Abb. 14: MALDI-TOF/MS-Analyse tryptischer GST-CgPKS100-Fragmente

Analyse tryptischer GST-CgPKS100-Fragmente von phosphopantetheinyliertem und nichtmodifiziertem GST-CgPKS100. Die Phosphopantetheinyl-Gruppe konnte experimentell einem Fragment von 31 Aminosäuren (EVGVTQDELADNIAFTDLGDSLMALTVSGR, rot: konserviertes DSL-Motiv) zugeordnet werden. CgPKS31: nichtmodifiziertes Peptid; kalkuliert $m/z=3299,645$; gemessen: $m/z=3297,732$; Abweichung 0.058 Prozent; CgPKS31-P: phosphopantetheinyliertes Peptid (P: biotinylierter Phosphopantetheinylrest); kalkuliert $m/z=4237,705$; gemessen $m/z=4235,275$; Abweichung 0.057 Prozent.

III.1.3 Inaktivierung von *CgPPT1*

III.1.3.1 Deletionsmutagenese

Umfangreiche Informationen zur Bedeutung und Funktion eines Gens können durch dessen Inaktivierung und die phänotypische Charakterisierung von Deletionsmutanten gewonnen werden. Die im Rahmen von Deletionsstrategien generierten Konstrukte bestehen aus einem Selektionsmarker, der von DNA-Abschnitten mit Sequenzhomologie zum vorgesehenen Integrationsort flankiert wird. Abhängig von den flankierenden DNA-Bereichen können Gene durch die Integration der Resistenzkassette, eine partielle oder vollständige Deletion inaktiviert werden.

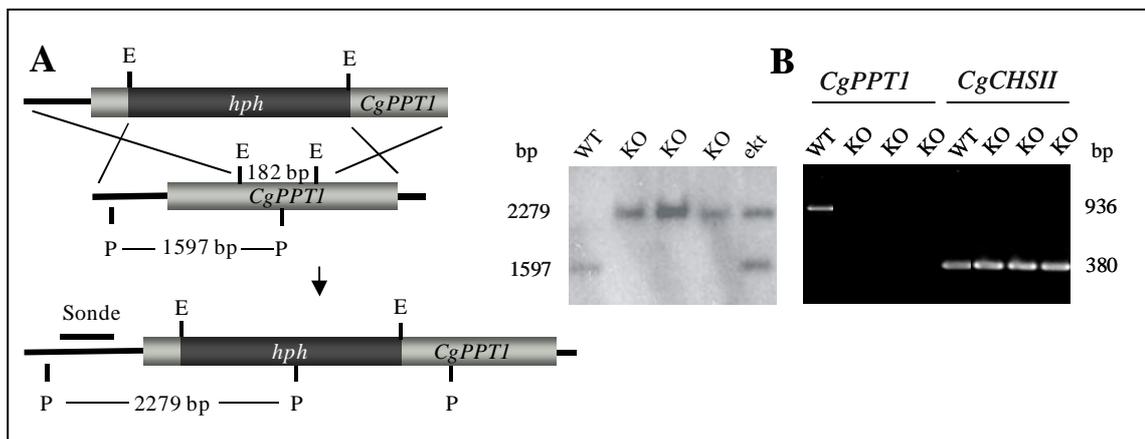


Abb. 15: *CgPPT1*-Deletionsmutagenese

(A) Ein 182 bp großes *Eco*8II- (E) Fragment aus *CgPPT1* wurde durch die 2,6 kb große Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) ersetzt. Die Southern-Analyse von Wildtyp (WT), einem Isolat mit ectopischer Integration (ekt) und drei Isolaten mit Integrationen durch homologe Rekombinationsereignisse (KO) zeigte eine Größenverschiebung von 1597 bp (WT) auf 2279 bp (KO), verursacht durch die Integration der Resistenzkassette. Der Restriktionsverdau genomischer DNA wurde mit *Pst*I (P) durchgeführt. Die verwendete Sonde ist komplementär zur Promoterregion von *CgPPT1* (Nukleotide 849 bis 163 vor ATG). (B) RT-PCR-Analysen zur Kontrolle der *CgPPT1*-Inaktivierung auf Transkriptebene erfolgten unter Verwendung spezifischer Primer für *CgPPT1* bzw. *CgCHSII*. Während ein 380 bp großes PCR-Produkt für das Fragment des Chitinsynthasegens *CgCHSII* in allen Proben nachweisbar war, bestätigte das Fehlen des PCR-Produkts für $\Delta Cgpp1$ -Isolate (KO) die erfolgreiche Geninaktivierung.

Im *CgPPT1* KO-Konstrukt wurde ein 182 bp großes *Eco*8II-Fragment des Gens durch die 2,6 kb große Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) aus dem Vektor pGEMhphBsuI ersetzt (Abb. 15 A). Erfolgreich transformierte Protoplasten bildeten Kolonien auf hygromycinhaltigem Selektionsmedium, welche nach der Gewinnung von Einzelspor-

isolaten mittels Southern-Analyse näher charakterisiert wurden. Für drei unabhängige Isolate (KO) zeigte die Größenverschiebung des detektierten DNA-Fragments (2279 bp, KO) gegenüber der Wildtypbande (1597 bp, WT) eine Integration des KO-Konstrukts durch homologe Rekombination an. Dagegen wiesen Isolate mit ektopisch integrierten Konstrukten (ekt) die Bande des KO-Konstrukts zusätzlich zur Wildtypbande auf (vgl. WT, KO, ekt).

Zur Bestätigung der Geninaktivierung auf Transkriptionsebene wurden RT-PCR-Experimente mit RNA des Wildtypisolats und der Deletionsmutanten durchgeführt (Abb. 15 B). Ein 936 bp großes *CgPPT1*-Fragment konnte in Ansätzen mit Wildtyp-RNA (WT), nicht jedoch in Reaktionsansätzen mit RNA aus den $\Delta Cgppt1$ -Isolaten (KO) amplifiziert werden (vgl. WT und KO). Kontrollreaktionen mit spezifischen Primern zur Amplifikation eines 380 bp großen Fragments des konstitutiv exprimierten *C. graminicola* Chitinsynthase II-Gens (*CgCHSII*; Werner *et al.*, 2007) ergaben für sämtliche Proben die erwartete Produktbande.

III.1.3.2 Wachstumsversuche und Siderophorproduktion

Die phänotypische Charakterisierung von $\Delta Cgppt1$ -Mutanten erfolgte zunächst in Wachstumsversuchen unter Verwendung unterschiedlicher Kulturmedien (Abb. 16 A). Synthetisches Minimalmedium (SMM) konnte von der lysinauxotrophen Deletionsmutante $\Delta Cgppt1$ (KO) nicht besiedelt werden, während das Hyphenwachstum des Wildtypisolats (WT) und eines Isolats mit ektopischer Integration des KO-Konstrukts (ekt) nicht beeinträchtigt war. Zugewetztes Lysin (SMM + Lys) kompensierte die Auswirkungen der nichtfunktionalen Lysinbiosynthese in $\Delta Cgppt1$ -Isolaten jedoch weitgehend (vgl. WT, KO, ekt; SMM und SMM + Lys). Auffällig war die fehlende Melanisierung der Hyphen von $\Delta Cgppt1$.

Bathophenanthrolindisulfonat (BPS) inhibierte das Wachstum von $\Delta Cgppt1$ auf synthetischem Kompletmedium (SCM) vollständig, während Wildtyp und ektopisches Isolat normale Wachstumsraten aufwiesen. BPS komplexiert Fe^{3+} -Ionen und kann darüber hinaus von Mikroorganismen nicht aufgenommen werden. Durch Zugabe des kommerziell verfügbaren fungalen Eisenchelators Desferri-Coprogen (Cop) konnte die inhibitorische Wirkung von BPS rückgängig gemacht werden (vgl. WT, KO, ekt; SCM,

SCM + BPS und SCM + BPS + Cop). Dieses Resultat war ein deutlicher Hinweis auf Probleme bei der Mobilisierung komplexierter Fe^{3+} -Ionen durch $\Delta\text{Cgpp}t1$ -Isolate.

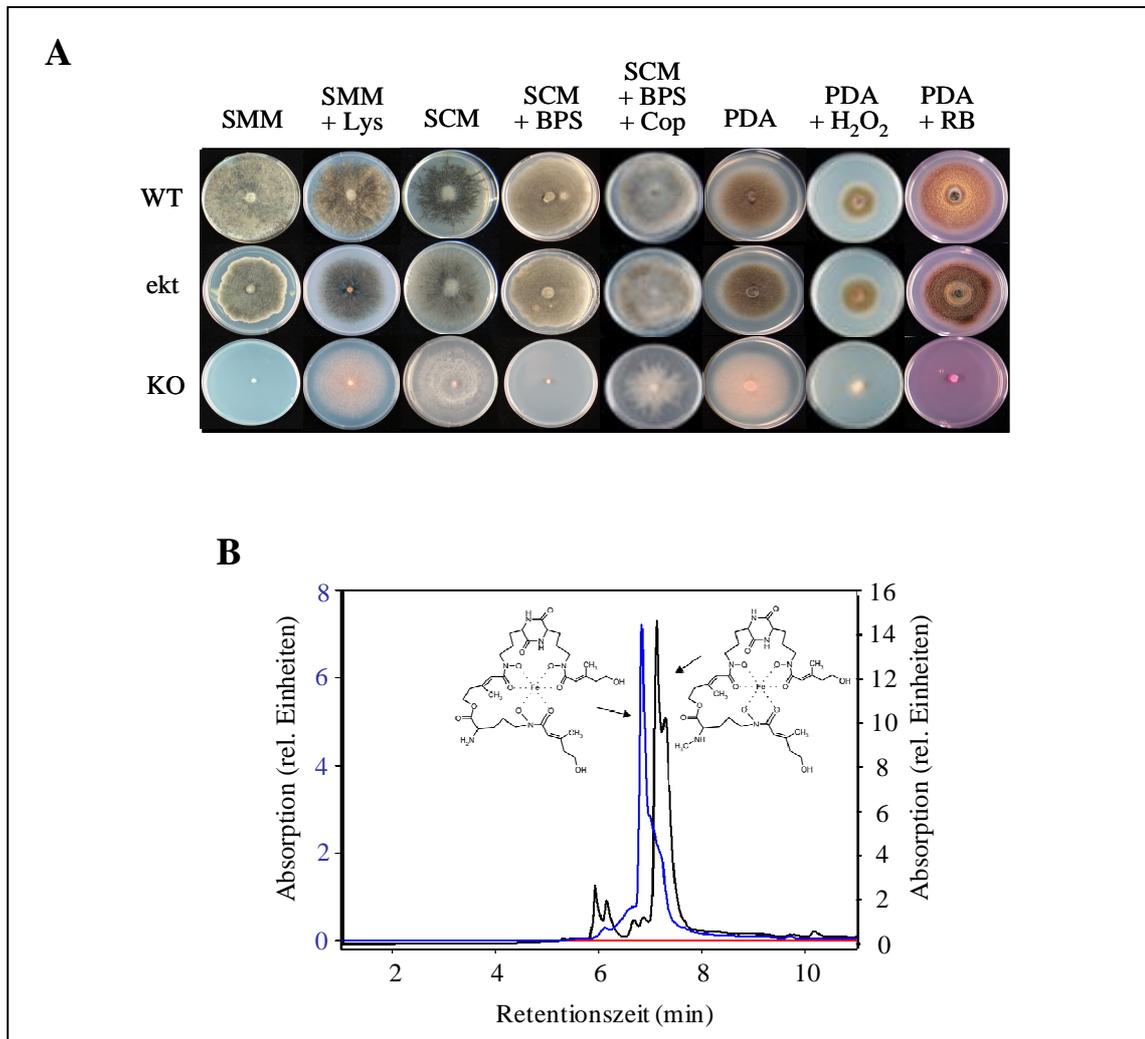


Abb. 16: Wachstumsversuche und Synthese von Siderophoren

(A) Im Gegensatz zum Wildtypisolat CgM2 (WT) und einem Isolat mit ektopischer Integration des KO-Konstrukts (ekt) war $\Delta\text{Cgpp}t1$ auxotroph für Lysin, wie Wachstumsversuche auf synthetischem Minimalmedium mit (SMM + Lys) und ohne (SMM) Zugabe von *L*-Lysin demonstrierten. $\Delta\text{Cgpp}t1$ war zudem nicht in der Lage, synthetisches Komplettmedium (SCM) mit zugesetztem Fe^{3+} -Chelator Bathophenanthrolindisulfonat (BPS) zu kolonisieren. Die Zugabe von Desferri-Coprogen (Cop) ermöglichte jedoch vegetatives Wachstum auf BPS-haltigem Medium. Sauerstoffradikale (Wasserstoffperoxid H_2O_2 bzw. Bengalrosa RB) inhibierten das Wachstum von $\Delta\text{Cgpp}t1$ wesentlich stärker als das der Referenzisolate, wie Wachstumsversuche auf Kartoffeldextroseagar (PDA) zeigten. Die schwache Graufärbung des $\Delta\text{Cgpp}t1$ -Myzels in SCM wird durch die Eigenfärbung des Mediums verursacht. (B) HPLC/MS-Analysen von Extrakten aus Flüssigkultur konnten eine Sekretion der Siderophore Coprogen B (blaue Linie) und 2-*N*-methyl-coprogen B (schwarze Linie) durch den Wildtyp CgM2, nicht jedoch durch $\Delta\text{Cgpp}t1$ nachweisen.

Tatsächlich konnten in HPLC/MS-Analysen (Abb. 16 B) die sekretierten Siderophore Coprogen B (blaue Linie) und 2-N-methylcoprogen B (schwarze Linie) in Kulturfiltraten des Wildtyps, nicht jedoch in Filtraten der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (rote Linie) nachgewiesen werden. Damit wurde deutlich, dass $\Delta Cgppt1$ diese hochaffinen Eisenchelatoren benötigt, um komplexierte Eisenionen zu mobilisieren.

Zudem war $\Delta Cgppt1$ gegenüber oxidativem Stress wesentlich anfälliger als die untersuchten Referenzisolate (Abb. 16 A). Wachstumsversuche auf Kartoffeldextroseagar (PDA) zeigten eine deutlich verringerte Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bzw. Superoxidradikalen, die von Bengalrosa (RB) unter Lichteinwirkung produziert werden (vgl. WT, KO, ekt; PDA, PDA + H_2O_2 und PDA + RB).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass *CgPPT1* von zentraler Bedeutung für die Lysinbiosynthese, die Synthese von Siderophoren und damit für die Akquirierung von Eisenionen, die Melanisierung fungaler Strukturen sowie für den Schutz gegenüber oxidativem Stress ist.

III.1.3.3 Konidienmorphologie und Keimraten

Der $\Delta Cgppt1$ -Phänotyp war gekennzeichnet durch das Ausbleiben der Konidiogenese bei einer Kultivierung auf festen Nährmedien. Dagegen wurde eine geringe Anzahl Konidien in Flüssigkultur gebildet. Um den Einfluss von *CgPPT1* auf die Konidiogenese zu untersuchen, wurden Konidien aus CM-Flüssigkulturen mikroskopisch analysiert (Abb. 17).

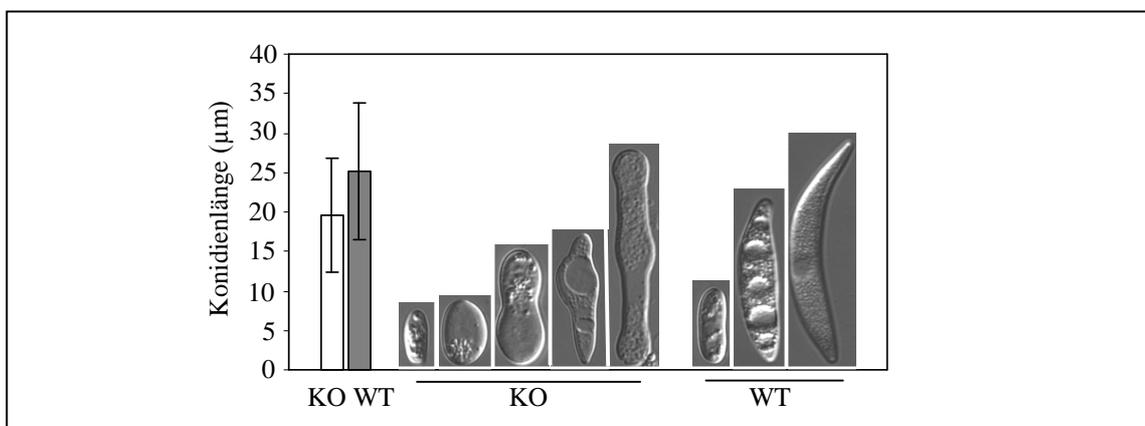


Abb. 17: Konidienmorphologie

Vergleich der Länge und Form asexuell gebildeter Sporen des Wildtypisolats CgM2 (WT) und der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO). $p < 0,05$

Konidien der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) waren signifikant kleiner als Konidien des Wildtypisolats (WT) und zeigten darüber hinaus deutliche morphologische Veränderungen wie runde bis ovale Zellformen, Ausbuchtungen und cytoplasmatische Aggregationen (vgl. Mikroskopbilder WT und KO). Die beobachteten morphologischen Veränderungen hatten jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Keimfähigkeit von $\Delta Cgppt1$ -Konidien (Abb. 18 A).

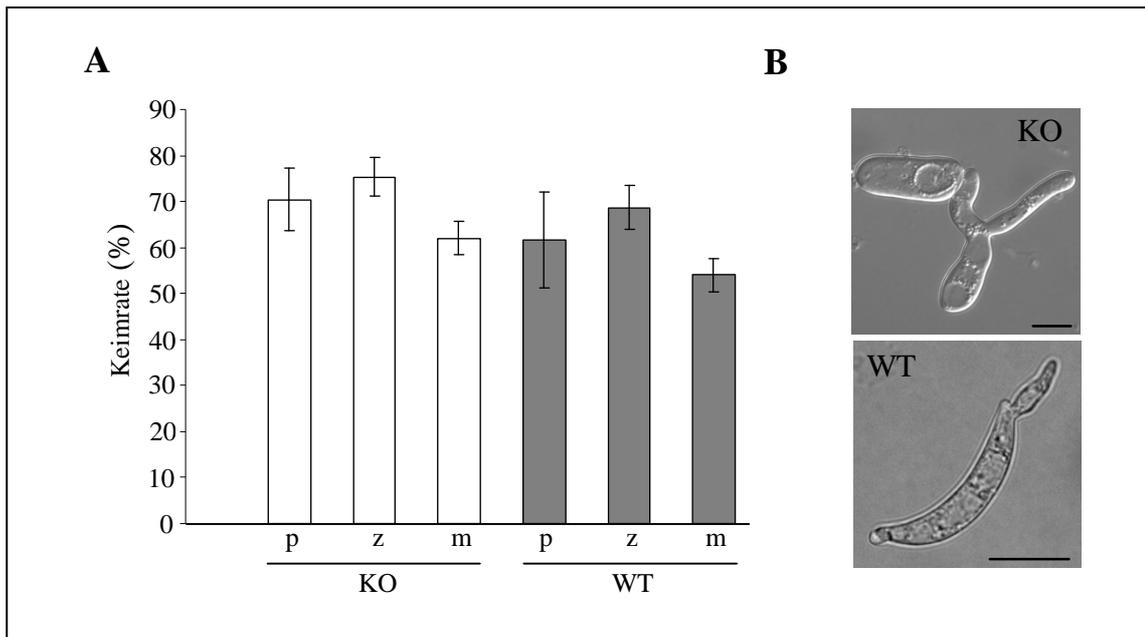


Abb. 18: Konidienkeimung auf unterschiedlichen Oberflächen

(A) Vergleich der Keimraten von Konidien des Wildtypisolats CgM2 (WT) und der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) auf Polyesterfolie (p), Zwiebelepidermis (z) und Maisblättern (m). Die Keimraten von WT und KO auf identischen Oberflächen unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$). (B) Konidienkeimung des Wildtypisolats (WT) und der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) auf Polyesterfolie. Balken=10 μm

Die ermittelten Keimraten von Konidien des Wildtyps (WT) und Konidien der Deletionsmutante $\Delta Cgppt1$ (KO) auf Polyesterfolie (p), Zwiebelepidermis (z) und Maisblättern (m) wiesen im direkten Vergleich keine signifikanten Unterschiede auf (vgl. p, z, m; WT und KO). In der frühen Phase der $\Delta Cgppt1$ -Konidienkeimung konnten jedoch häufig Verzweigungen des Keimschlauchs nah am Konidium beobachtet werden, während Konidien des Wildtyps (WT) Keimschläuche ohne Verzweigungen bildeten (vgl. KO und WT).

III.1.3.4 Appressoriendifferenzierung

Die Bildung von hochspezialisierten Infektionsstrukturen, sogenannten Appressorien, ist ein entscheidender Schritt im Lebenszyklus von *C. graminicola*, der den Übergang von der saprophytischen zur perthotrophen Lebensweise markiert.

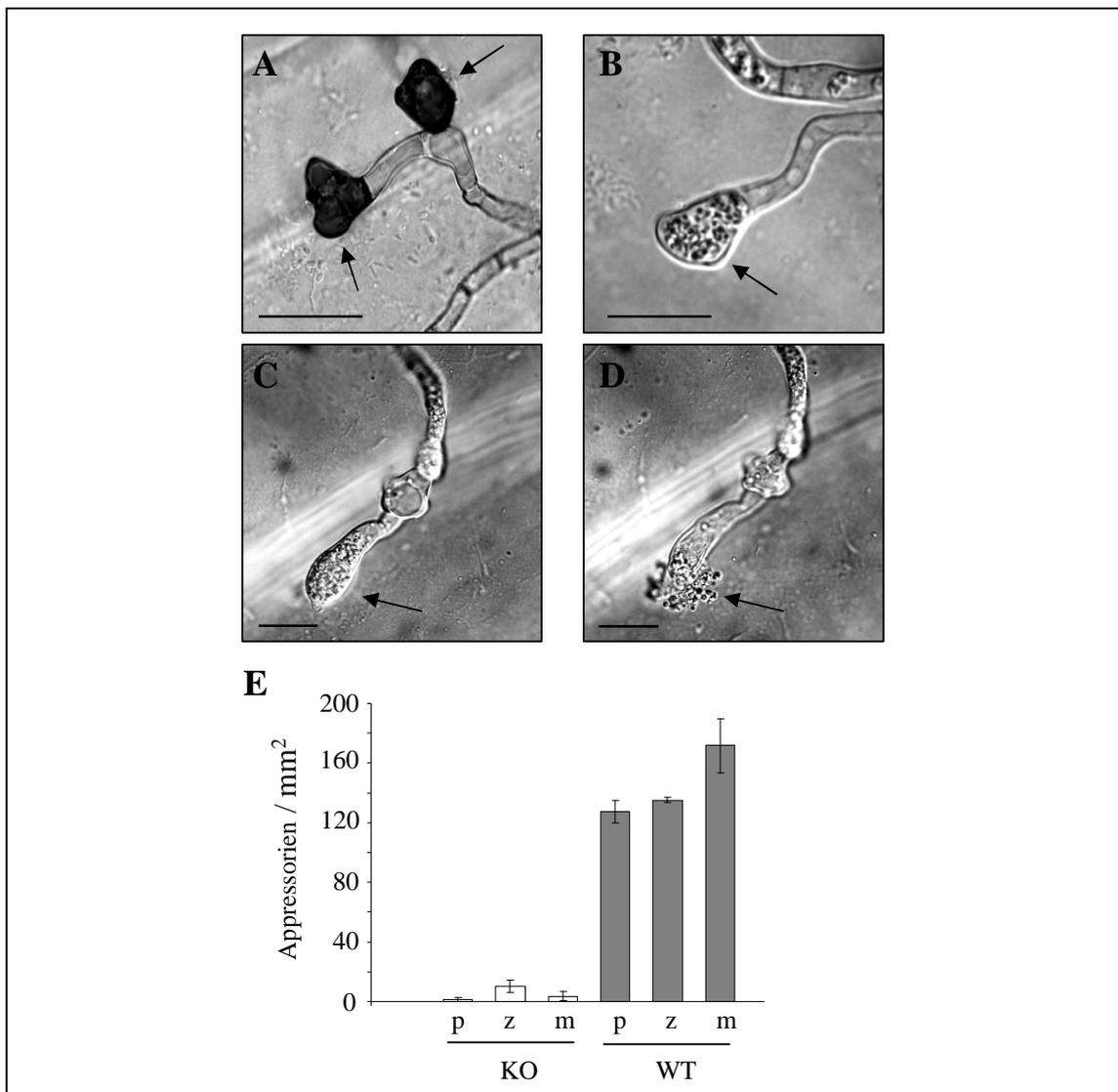


Abb. 19: Appressorienmorphologie und Appressoriendifferenzierung

(A-D) Appressorien des Wildtypisolats CgM2 (A, Pfeile) waren gekennzeichnet durch eine starke Melanisierung. Im Gegensatz dazu wiesen Appressorien der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (B, Pfeil) kein Melanin auf und lysierten häufig, wobei der cytoplasmatische Inhalt freigesetzt wurde (vgl. C, D Pfeil). Zwiebelepidermisinfektion, Balken=10 μm . (E) Vergleich der Anzahl differenzierter Appressorien des Wildtypisolats CgM2 (WT) und der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) auf Polyesterfolie (p), Zwiebelepidermis (z) und Maisblatt (m). Die Anzahl gebildeter Appressorien von WT und $\Delta Cgppt1$ (KO) auf identischen Oberflächen unterschied sich signifikant ($p < 0,05$).

Zwischen 130 und 170 Appressorien wurden nach einer Standardinokulation mit Konidien des Wildtypisolats CgM2 (WT) auf einem Quadratmillimeter Polyesterfolie (p), Zwiebelepidermis (z) oder Maisblattepidermis (m) gebildet (Abb. 19 E). Dagegen konnte nur in Einzelfällen die Differenzierung von Appressorien beobachtet werden, wenn mit Konidien der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante inokuliert wurde (vgl. p, z, m; WT und KO)

Appressorien der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (Abb. 19 B, Pfeil) waren im Gegensatz zu Wildtyp-Appressorien (Abb. 19 A, Pfeile) nicht melanisiert. Erstaunlicherweise lysierte ein Teil der $\Delta Cgppt1$ -Appressorien auf Zwiebelepidermen und Maisblättern, nicht jedoch auf Polyesterfolie. In Abbildung 19 wurde ein solcher Vorgang mikroskopisch dokumentiert. Deutlich zu erkennen sind die ausgetretenen granulären Bestandteile des Cytoplasmas (vgl. C und D, Pfeil).

Etwa 90 Prozent der differenzierten Wildtypappressorien penetrierten intaktes Blattgewebe (Abb. 33). Im Gegensatz dazu konnte keine erfolgreiche Penetration der Maisepidermis durch $\Delta Cgppt1$ -Appressorien beobachtet werden.

III.1.3.5 Pflanzeninfektion und *in vivo* Sporulation

Maispflanzen wurden durch das Aufsprühen einer Konidien suspension gleichmäßig mit hohen Sporenkonzentrationen inokuliert. Dadurch entstanden nicht einzelne Anthrakosen, sondern vollständig nekrotische Blattspreiten. Dieser Effekt ist deutlich in Abbildung 20 (A) zu sehen, sofern Konidien des Wildtypisolats CgM2 (WT) auf das Blatt gesprüht wurden. Dagegen bildeten sich keine makroskopisch sichtbaren Symptome als Reaktion auf eine Infektion mit Konidien von $\Delta Cgppt1$ -Isolaten (KO). Dieser Infektionsversuch zeigte anschaulich die Bedeutung von *CgPPT1* als notwendiger Pathogenitätsfaktor für die erfolgreiche Besiedlung intakter Wirtspflanzen.

Eine wichtige experimentelle Komponente im Rahmen der Charakterisierung von Deletionsmutanten ist die Wiederherstellung des ursprünglichen Phänotyps durch die Reintegration des entsprechenden Gens in das Genom von *C. graminicola*. $\Delta Cgppt1$ wurde daher durch ein Konstrukt, bestehend aus dem *CgPPT1*-ORF unter der Kontrolle des nativen Promoters und des *trpC*-Terminators aus *Aspergillus nidulans*, genetisch komplementiert (Abb. 20 B und C). Die Lysinauxotrophie von $\Delta Cgppt1$ konnte dabei als Selektionsmarker verwendet werden. $\Delta Cgppt1$ -Protoplasten bildeten auf lysinfreiem

Selektionsmedium nach der erfolgreichen Integration des *CgPPT1*-Komplementationskonstrukts Kolonien, während aus dem Kontrollansatz ohne zugesetztes DNA-Fragment keine Kolonien entstanden (vgl. B, +/-: Ansatz mit und ohne *CgPPT1*-Konstrukt). Genetisch komplementierte Isolate verursachten charakteristische Blattnekrosen, wobei das Ausmaß der Symptome und der zeitliche Verlauf der Infektion einer Maisinfektion mit Konidien des Wildtyp-Isolats entsprachen (Abb. 20 A, C; vgl. WT und KOM).

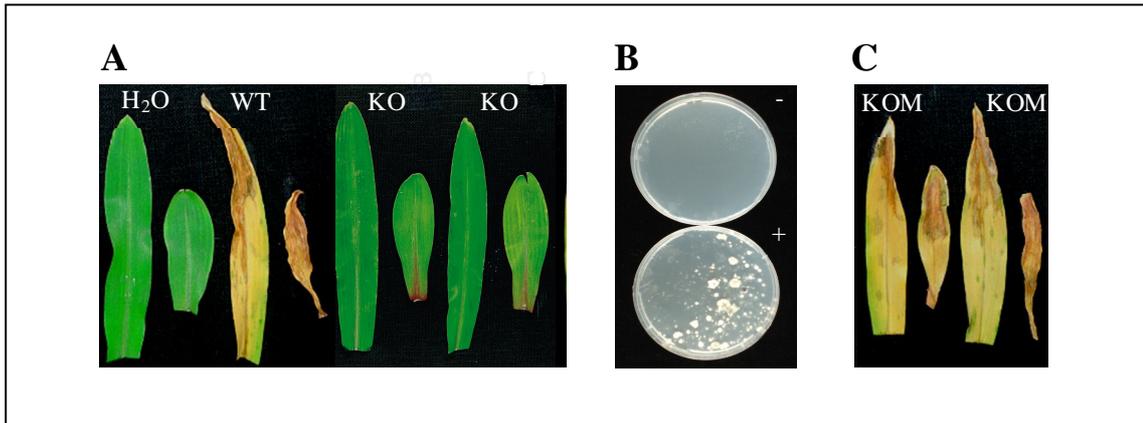


Abb. 20: Infektion intakter Maisblätter und genetische Komplementation

(A) Infektionsexperimente mit Maispflanzen zeigten, dass Konidien des Wildtypisolats CgM2 (WT), nicht jedoch Konidien der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) Anthraknose-Blattflecken verursachen. H₂O: Kontrollinokulation. (B) Genetische Komplementation von $\Delta Cgppt1$. +/-: Transformationsansatz mit und ohne *CgPPT1*-Komplementationskonstrukt (C) Wiederherstellung der Virulenz durch die genetische Komplementation von $\Delta Cgppt1$. Komplementierte Isolate (KOM) induzierten Blattnekrosen.

Aberrante $\Delta Cgppt1$ -Appressorien, die zudem in äußerst geringer Anzahl gebildet wurden, waren zweifellos eine Ursache der experimentell nachgewiesenen Apathogenität von $\Delta Cgppt1$. Inokulationsexperimente mit verletzten Maisblättern sollten darüber hinaus klären, ob neben dem Verlust der Penetrationskompetenz zusätzliche Defekte im weiteren Infektionsverlauf auftreten.

In Abbildung 21 (A) ist deutlich zu erkennen, dass Infektionshyphen des Wildtypisolats (48 h, WT) und der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (48 h, KO) etwa zwei Tage nach der Inokulation verletzter Maisblätter antikline Zellwände durchbrachen und in das Wirtsgewebe vorstießen. Auffällig sind die an Hyphopodien erinnernden bulbösen Hyphenstrukturen an den Durchbruchstellen zu benachbarten Epidermiszellen (48 h, WT und KO, Pfeil). Weitere 48 Stunden später waren weite Bereiche des Blattgewebes von Pilzhypen besiedelt (96 h, WT und KO). Etwa sechs Tage nach der Infektion mit CgM2-Konidien (144 h, WT) konnten schließlich Sporenlager mit zahlreichen Konidien

(Pfeilkopf) und melanisierten Setae (Pfeil) mikroskopisch beobachtet werden. Dagegen endete die $\Delta Cgpp1$ -Konidiogenese schon in einem sehr frühen Stadium (144 h, KO). Hyphenaggregationen und Knospungen (Pfeil) markierten die initiale Phase der Konidiogenese. Es wurden jedoch keine reifen Konidien gebildet (144 h, vgl. WT und KO).

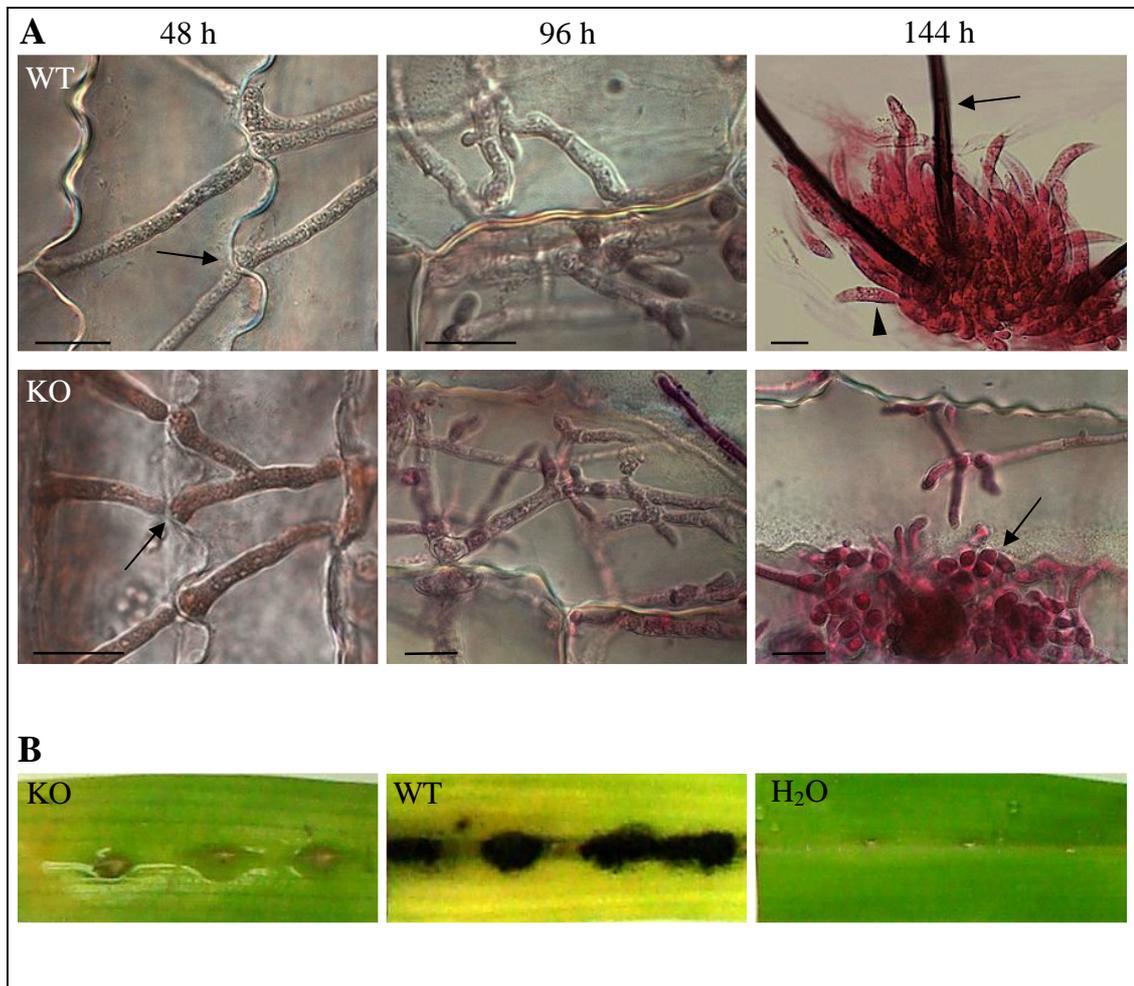


Abb. 21: Infektion verletzter Maisblätter

(A) Verletzte Maisblätter wurden von $\Delta Cgpp1$ (KO) und dem Wildtypisolat CgM2 (WT) invasiv besiedelt, wie die Penetration antikliner Zellwände von Epidermiszellen zeigt (48 h, Pfeil). Von zahlreichen Hyphen durchzogenes Blattgewebe markiert den Höhepunkt dieser Entwicklung (WT, KO 96 h). Sporenlager mit reifen Konidien wurden ausschließlich vom Wildtypisolat gebildet (144 h, WT, Pfeil weist auf Seta, Pfeilkopf markiert Konidium), während die Entwicklung der $\Delta Cgpp1$ -Sporenlager in einem frühen Stadium endete (144 h, KO, Pfeil markiert Konidien-Primordien). (B) Verletzte Maisblätter wiesen typische Anthraknose-Blattflecken nach der Infektion mit Konidien des Wildtyps auf. Dagegen verursachte $\Delta Cgpp1$ nur schwach ausgeprägte Chlorosen. H₂O: Kontrollinokulation, Balken=10 μ m

Makroskopisch wurden fünf bis sechs Tage nach Infektionsbeginn charakteristische Nekrosen und Chlorosen im Umkreis der CgM2-Inokulationsstelle sichtbar (Abb. 21 B,

WT). Die Infektion mit $\Delta Cgppt1$ führte dagegen lediglich zu schwachen Chlorosen (KO), obwohl das Blattgewebe im Bereich der epidermalen Verletzung stark mit Hyphen durchsetzt war.

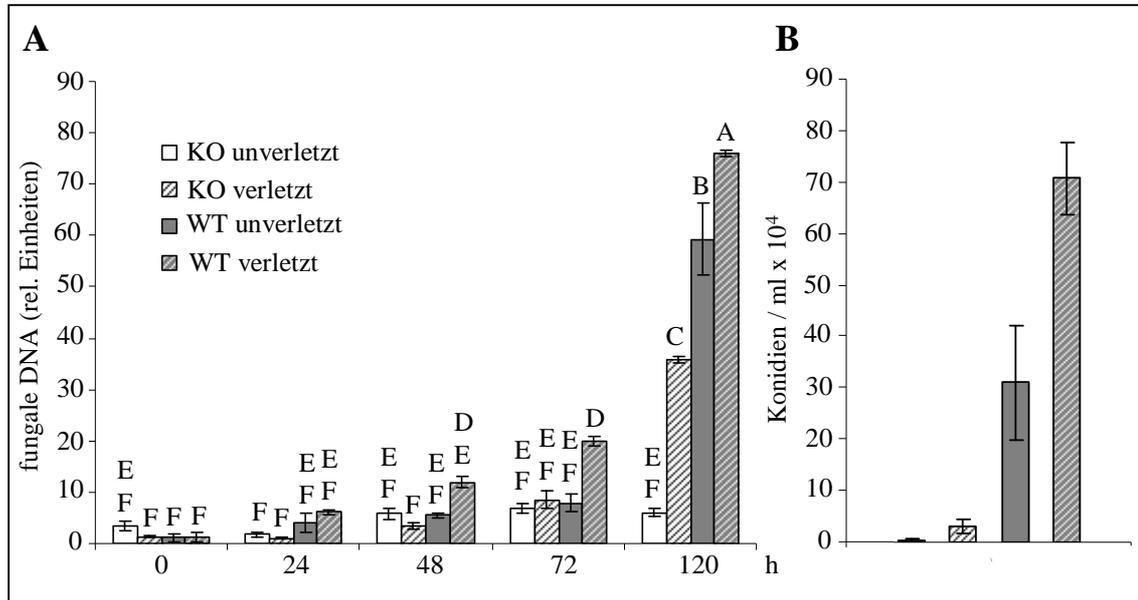


Abb. 22: Quantifizierung der fungalen Biomasse und Konidienbildung

(A) Vergleich der relativen DNA-Mengen des Wildtypisolats CgM2 (WT) und der $\Delta Cgppt1$ -Mutante (KO) im Zeitraum 0-120 Stunden nach der Inokulation verletzter und unverletzter Maisblätter. Die Großbuchstaben über den einzelnen Säulen geben die Zugehörigkeit zu den Signifikanzgruppen (ANOVA) an. (B) Die $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) produzierte weder auf verletzten noch auf unverletzten Blättern eine signifikante Anzahl von Konidien. Etwa 7×10^5 Konidien wurden dagegen vom Wildtypisolat (WT) auf verletzten und annähernd 3×10^5 Konidien auf unverletzten Blattsegmenten sechs Tage nach der Inokulation mit 5×10^3 Konidien/Blatt gebildet. Die Symbole in Abb. A gelten für die Diagramme A und B.

Verletzte und unverletzte Blattsegmente wurden zur Bestimmung der Anzahl neu gebildeter Konidien inokuliert und sechs Tage nach Beginn der Infektion sorgfältig abgespült. Anschließend erfolgte die mikroskopische Auszählung der Konidien im Überstand (Abb. 22 B). Während pro Blattsegment Sporenmengen von etwa 3×10^5 (unverletzt) bzw. 7×10^5 (verletzt) vom Wildtypisolat gebildet wurden, konnten lediglich $0,3 \times 10^4$ (unverletzt) bzw. 3×10^4 (verletzt) Konidien nach der Infektion durch $\Delta Cgppt1$ reisoliert werden. Da jedes Blattsegment mit etwa 5×10^3 Konidien inokuliert wurde, fand somit keine Netto-Neusynthese von Konidien nach der Infektion unverletzter Blattsegmente durch $\Delta Cgppt1$ statt. Auf verletzten Blattsegmenten wurden jedoch für jedes eingesetzte $\Delta Cgppt1$ -Konidium etwa sieben neue Konidien gebildet.

Da keine Sporenlager nachgewiesen werden konnten, erfolgte die $\Delta Cgppt1$ -Konidiogenese vermutlich durch Abschnürungen vom Myzel vegetativer Hyphen (s. Abb. 13, untere Reihe 120 h).

Diese quantitativen Ergebnisse bestätigen die mikroskopische Analyse der *in vivo* Konidiogenese und verweisen auf die Bedeutung von *CgPPT1* bzw. PPTase-abhängigen Enzymen für die Differenzierung von Konidien in der Wirtspflanze.

Um zu analysieren, ob die deutlich reduzierte Symptomausprägung bei Blattinfektionen mit Konidien der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante auf eine verringerte Biomasseproduktion des Pilzes im Wirtsgewebe zurückzuführen ist, wurden in quantitativen PCR-Experimenten die relativen DNA-Mengen von Wildtypisolat und $\Delta Cgppt1$ in verletzten und unverletzten Maisblättern über einen Zeitraum von fünf Tagen bestimmt (Abb. 22 A).

Die gewonnenen Resultate zeigten, dass Hyphen des Wildtypisolats CgM2 (WT) grundsätzlich in der Lage waren verletzte und unverletzte Blätter zu besiedeln. Der ermittelte quantitative Unterschied im Gehalt fungaler DNA verwundeter und intakter Blätter nach der Inokulation mit Wildtyp-Konidien, der als Biomasse-Indikator verwendet wurde, hatte seine Ursache vermutlich in der leichteren Verfügbarkeit von Nährstoffen bei der Infektion verletzter Blätter (vgl. 24 h - 120 h, WT verletzt und unverletzt). Ein signifikanter Anstieg der fungalen DNA-Menge konnte nach der Infektion unverletzter Blätter durch $\Delta Cgppt1$ nicht nachgewiesen werden, während verletzte Blätter kolonisiert wurden, wie die deutliche Zunahme der DNA-Menge belegte (vgl. 24 h - 120 h, KO verletzt und unverletzt).

Die starke Zunahme der pilzlichen Biomasse zwischen 72 h und 120 h korreliert mit der massiven Besiedlung des Wirtsgewebes, ein Vorgang, der charakteristisch für die nekrotrophe Infektionsphase ist (vgl. 72 h und 120 h, WT verletzt und unverletzt, KO verletzt).

Eine signifikante Zunahme der Biomasse von $\Delta Cgppt1$ in verletzten Blättern konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, wenn auch die ermittelte DNA-Menge zum Zeitpunkt 120 Stunden nur ungefähr der halben DNA-Menge der Wildtypinfektion verletzter Blätter bzw. ungefähr zwei Dritteln der DNA-Menge unverletzter Blätter nach einer Infektion mit Wildtyp-Konidien entsprach (vgl. 120 h; WT verletzt und unverletzt, KO verletzt).

Ein Vergleich der fungalen Biomasse von $\Delta Cgppt1$ in verletzten Maisblättern mit der makroskopischen Symptomausprägung legt den Schluss nahe, dass fehlende Nekrosen nicht auf ein drastisch verringertes invasiven Wachstums zurückzuführen sind.

Vielmehr erinnert die symptomlose Besiedelung verletzter Blätter durch $\Delta Cgppt1$ an einen endophytischen Lebensstil.

III.1.4 Metabolitanalyse

CgPPT1 aktiviert zahlreiche PKS und NRPS, welche wiederum eine Vielzahl strukturell diverser Metabolite synthetisieren. Die Deletion von *CgPPT1* sollte daher auch zu einer deutlich reduzierten Anzahl von Produkten des sekundären Stoffwechsels führen. Tatsächlich wiesen HPLC-Elutionsprofile von Extrakten, die aus dem Überstand von Flüssigkulturen des Wildtypisolats (Abb. 23, WT) bzw. der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutante (KO) gewonnen wurden, deutliche Unterschiede auf.

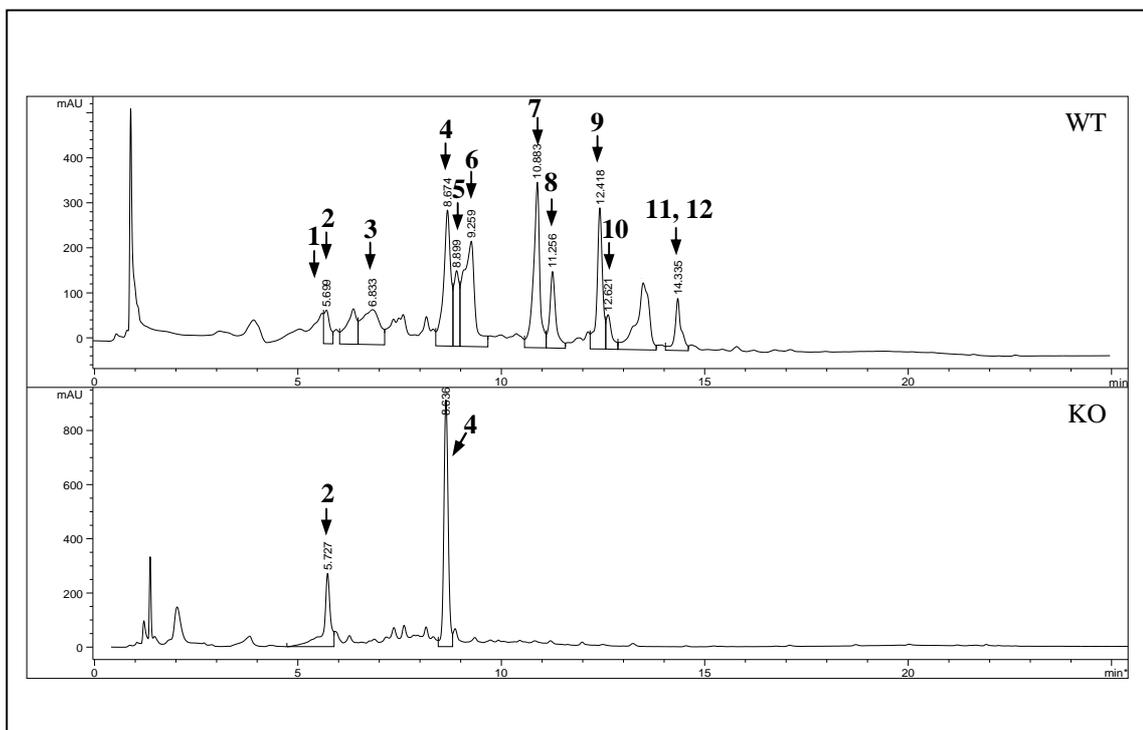


Abb. 23: HPLC-Profil von Extrakten aus CgM2- und $\Delta Cgppt1$ -Kulturüberständen

HPLC-Elutionsprofile von Ethylacetat-Extrakten aus Flüssigmedien, in denen Wildtypisolat (WT) bzw. $\Delta Cgppt1$ (KO) kultiviert wurden. Tyrosol (**2**) und 2-Phenylethanol (**4**) konnten in Extrakten von Wildtyp und $\Delta Cgppt1$ nachgewiesen werden. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte durch den Abgleich mit HPLC/MS-Daten von Referenzsubstanzen aus der Reinsubstanzenbibliothek des IBWF (Kaiserslautern) bzw. durch NMR-Strukturaufklärung. **1** Orcinol, **3** Indol-3-essigsäure, **5** Tryptophol, **6** Colletopyron B, **7** Colletochinon A, **8** Himanimid C, **9** Colletopyron C, **10** Colletochinon A, **11** Colletolacton A, **12** Colletochinon B

Extrakte der CgM2-Kultur enthielten eine wesentlich größere Anzahl unterschiedlicher Substanzen als Extrakte aus $\Delta Cgppt1$ -Flüssigkulturen (Abb. 23, vgl. WT und KO). Neben den extrazellulären Siderophoren Coprogen B und 2-N-methylcoprogen B (Abb. 16 B) sowie der intrazellulären Siderophore Ferricrocin (Daten nicht gezeigt) konnten mittels HPLC/MS und unterschiedlichen NMR-Methoden zwölf weitere Stoffwechselprodukte von *C. graminicola* identifiziert bzw. strukturell analysiert werden (vgl. Abb. 23 und Abb. 24). Darunter befinden sich fünf bisher unbekannte Naturstoffe, die Pyronderivate Colletopyron B und C, Colletochinon A, Colletoanthron A sowie Colletolacton A.

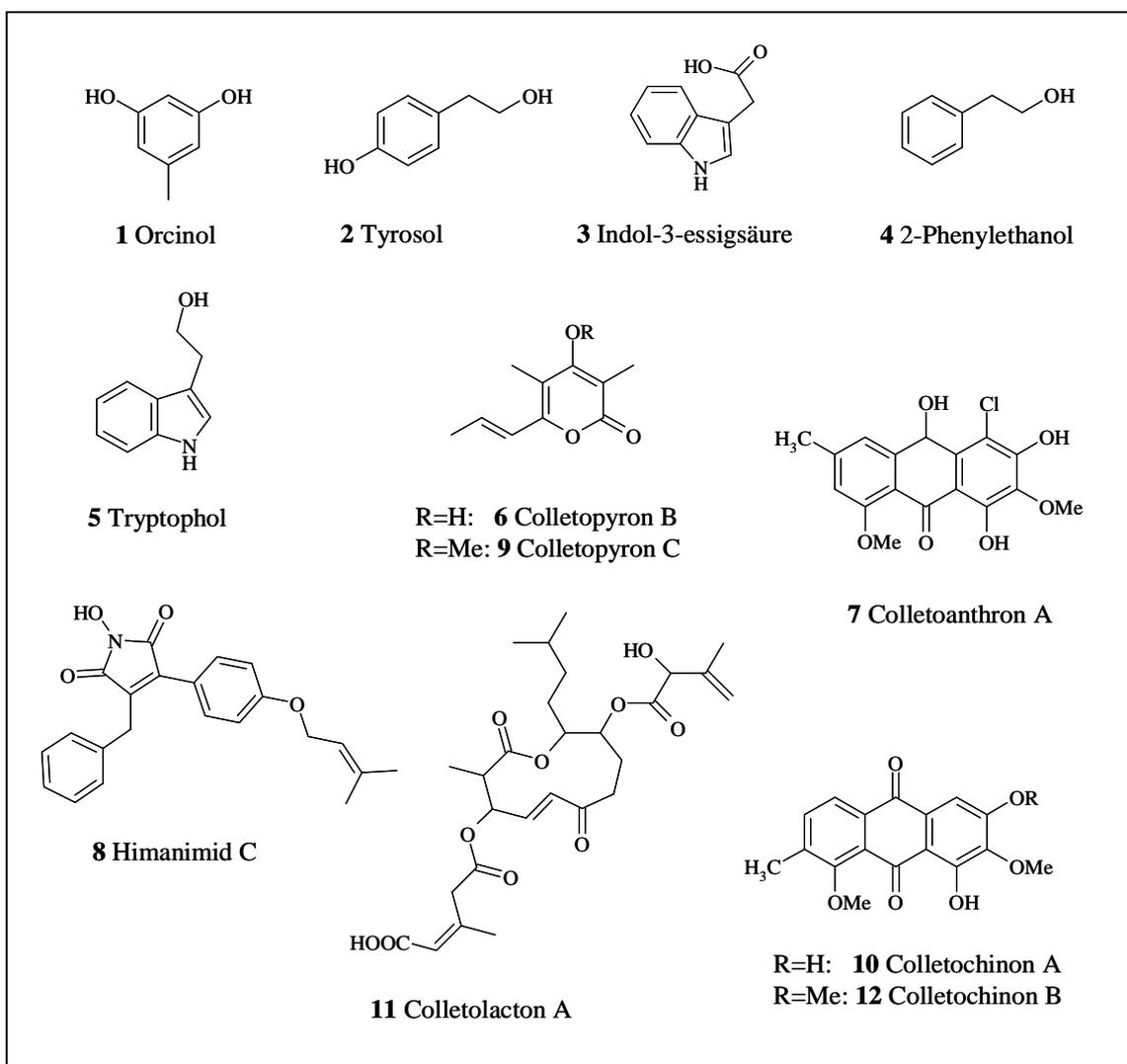


Abb. 24: Strukturen isolierter *C. graminicola*-Metabolite

Die Substanzen 6, 7, 9, 10 und 11 wurden bisher in der Fachliteratur nicht beschrieben. Die Nummerierung gibt die Elutionsreihenfolge der Verbindungen an (s. Abb. 23).

Zusätzlich wurden mit Orcinol, Tryptophol, Tyrosol, Indol-3-essigsäure, Himanimid C, Colletochinon B und 2-Phenylethanol sieben bereits bekannte Substanzen identifiziert (Strukturen Abb. 24).

Interessanterweise waren sieben der isolierten Verbindungen (Abb. 24; Strukturen 1, 6, 7, 9, 10, 11, 12) Polyketide, d. h., differentielle Metabolitanalysen von Wildtyp und PPTase-Deletionsmutanten können in der Tat zur gezielten Identifizierung pilzlicher Polyketide eingesetzt werden.

In Phytotoxizitätstests wurde untersucht, ob sekretierte Metabolite von *C. graminicola* für die Ausbildung nekrotischer bzw. chlorotischer Symptome auf Maisblättern verantwortlich sind. Dazu erfolgte die Inokulation verletzter und unverletzter Blattsegmente mit den isolierten Substanzen 1-12 (Abb. 24). Die visuelle Auswertung der Versuche ergab jedoch keinen Anhaltspunkt für eine toxische Wirkung der eingesetzten Substanzen. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnte keine signifikante Reaktion des Blattgewebes beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

III.2 Untersuchungen zur Bedeutung des *Magnaporthe oryzae* Sfp-PPTase-Gens *MoPPT1*

Die Bedeutung der Sfp-PPTase als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktor phytopathogener Pilze sollte in einem weiteren Wirt-Parasit-Interaktionssystem untersucht werden. Ausgewählt wurde dazu der Ascomycet *Magnaporthe oryzae*, der als Erreger der Reisverbräunung beträchtliche ökonomische Schäden verursacht.

PPTase-defiziente *M. oryzae*-Isolate wurden durch die Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette generiert (Abb. 25 A). Im Gegensatz zur Erzeugung PPTase-defizienter Isolate von *C. graminicola* erfolgte die Transformation der Konidien dabei mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, da die Transformationseffizienz protoplastierter Konidien von *M. oryzae* außerordentlich gering ist.

Erfolgreich transformierte Konidien bildeten Kolonien auf dem hygromycinhaltigen Selektionsmedium, die mittels Southern-Analyse näher charakterisiert wurden. Es konnten keine Einzelsporisolate gewonnen werden, da phänotypisch positive KO-Transformanten weder auf soliden Medien noch in Flüssigmedien Konidien bildeten.

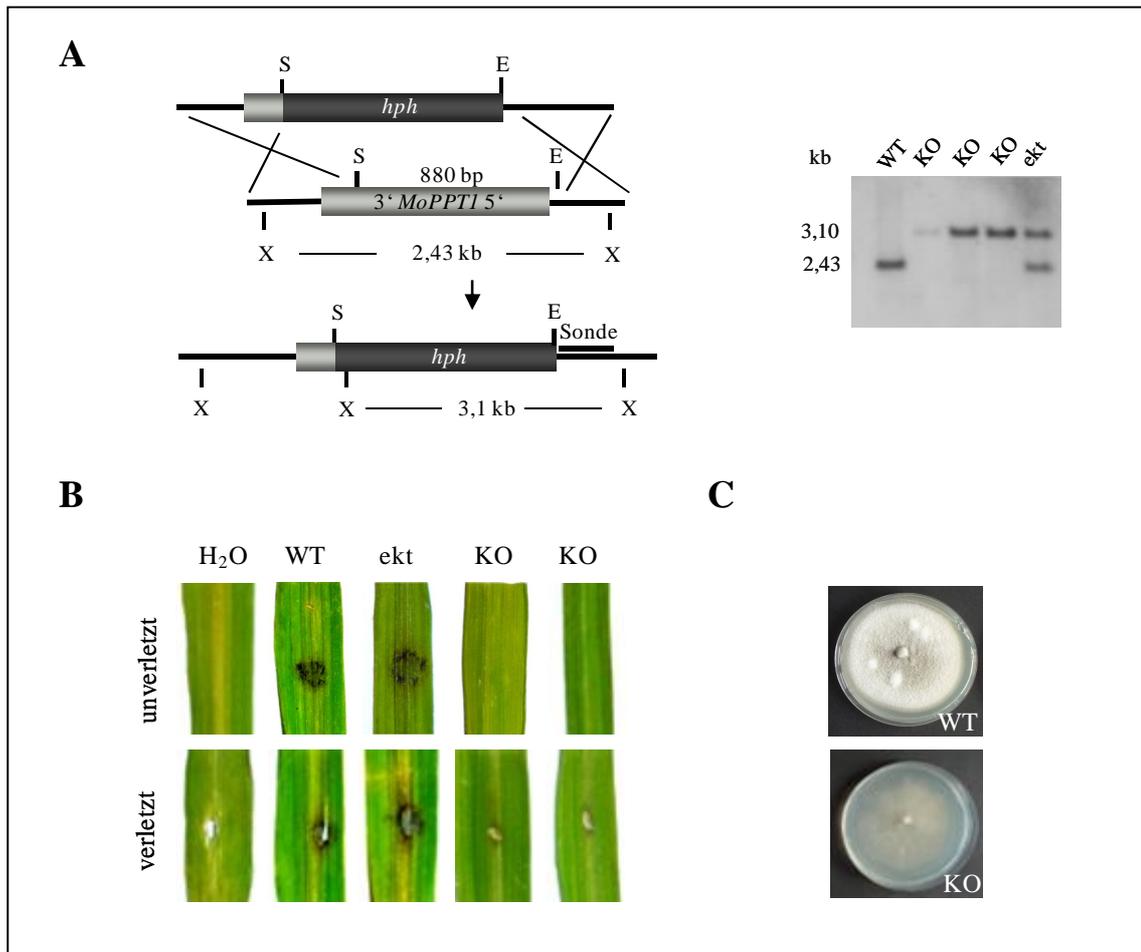


Abb. 25: *MoPPT1*-Deletionsmutagenese und phänotypische Charakterisierung

(A) Ein 870 bp großes *Eco8II* (E)/*StuI*- (S) Fragment aus *MoPPT1* (-60 bp bis 810 bp, relativ zu ATG) wurde durch eine 2,6 kb große Hygromycinresistenzkassette (*hph*) ersetzt. Die Southern-Analyse von Wildtyp (WT), einem Isolat mit ektopischer Integration (ekt) und drei Isolaten mit Integrationen, die durch homologe Rekombinationsereignisse (KO) entstanden, zeigte eine Größenverschiebung von 2,43 kb (WT) auf 3,1 kb (KO), verursacht durch die Integration der Resistenzkassette. Der Restriktionsverdau genomischer DNA wurde mit *XhoI* (X) durchgeführt. Die verwendete Sonde von 400 bp Länge war komplementär zur *MoPPT1*-Promoterregion. (B) Infektionsexperimente mit verletzten und unverletzten Reisblättern zeigten, dass sieben Tage nach Infektionsbeginn Myzel des *M. oryzae*-Wildtypisolats 70-15 (WT), nicht jedoch Myzel der $\Delta MoPPT1$ -Deletionsmutanten (KO) Symptome verursachte. H₂O: Kontrollinokulation (C) Der Phänotyp des *M. oryzae*-Wildtypisolats 70-15 (WT) war durch Melanisierung (grauer zentraler Bereich) und die Bildung von Luftmyzel gekennzeichnet, während nichtmelanisierendes $\Delta MoPPT1$ -Myzel (KO) ausschließlich im CM-Agar wuchs. Die schwache Graufärbung des $\Delta MoPPT1$ -Myzels wird durch die Eigenfärbung des Medium verursacht.

Für drei unabhängige Transformanten ergab die Southern-Analyse eine Größenverschiebung des detektierten DNA-Fragments (Abb. 25 A; 3,1 kb, KO) gegenüber der Wildtypbande (2,43 kb, WT) und zeigte damit ein durch homologe Rekombination integriertes KO-Konstrukt an. Dagegen wiesen Isolate mit ektopischen Integrationen

(ekt) die Bande des KO-Konstrukts zusätzlich zur Wildtypbande auf (vgl. WT, KO und ekt).

Infektionsexperimente mit verletzten und unverletzten Blattspreiten drei Wochen alter Reispflanzen zeigten deutliche Gewebsnekrosen nach der Inokulation mit Myzel des *M. grisea* Wildtyps (Abb. 25 B, WT) bzw. eines Isolat mit ektopischer Integration (ekt) der Resistenzkassette. Dagegen wiesen weder unverletzte noch verletzte Reisblätter, die mit Myzel der PPTase-Deletionsmutante (KO) inokuliert wurden, markante Infektionssymptome auf.

Deutliche morphologische Unterschiede zwischen Wildtyp (Abb. 25 C, WT) und $\Delta Moppt1$ (KO) zeigten sich bei der Kultivierung der Isolate in Petrischalen mit Kompletmedium. Im Gegensatz zu den schwach melanisierten vegetativen Hyphen des Wildtypisolats, die sich unterhalb eines dichten unpigmentierten Luftmyzelgeflechts befanden, durchzogen die hyalinen Hyphenstränge der $\Delta Moppt1$ -Deletionsmutante das Medium, ohne dass es zur Ausbildung von Luftmyzel kam (vgl. WT und KO).

Infektionstests und makroskopische Vergleiche der Morphologie PPTase-defizienter Isolate von *C. graminicola* und *M. oryzae* zeigten deutlich, dass die Deletion der Sfp-PPTasen beider Ascomyceten nahezu identische Phänotypen zur Folge hatte. Die apathogenen Deletionsmutanten beider Pilze konnten weder Lysin noch Melanin synthetisieren. Erstaunlicherweise produzierte die PPTase-defiziente Mutante von *C. graminicola* in Flüssigkultur Konidien, während für das entsprechende Isolat von *M. grisea* keinerlei Konidienproduktion nachgewiesen werden konnte.

III.3 Charakterisierung des *Colletotrichum graminicola*

α -Aminoadipat-Reduktase-Gens *CgAAR*

Im Mittelpunkt der Untersuchungen zur Bedeutung von *CgPPT1* stand die Frage, in welchem Umfang PPTase-abhängige Enzyme des Sekundärmetabolismus zur Virulenz bzw. Pathogenität beitragen. Neben PKS und NRPS wird jedoch auch die α -Aminoadipat-Reduktase *CgAAR*, ein essentielles Enzym der Lysinbiosynthese, durch *CgPPT1* aktiviert. Daher erschien es notwendig, *CgAAR*-Deletionsmutanten zu generieren und phänotypisch zu charakterisieren, um somit den Anteil der *CgAAR*-Inaktivierung vom beobachteten $\Delta Cgppt1$ -Phänotyp abzugrenzen.

Die Herstellung von *CgAAR*-defizienten *C. graminicola*-Isolaten erfolgte durch die Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette, wobei das KO-Konstrukt mittels DJ-PCR (Yu *et al.*, 2004) erzeugt wurde, so dass der vollständige putative ORF des Gens deletiert werden konnte (Abb. 26 A). Erfolgreich transformierte Konidien bildeten Kolonien auf dem hygromycinhaltigen Selektionsmedium, die nach der Gewinnung von Einzelsporisolaten mittels Southern-Analyse näher charakterisiert wurden.

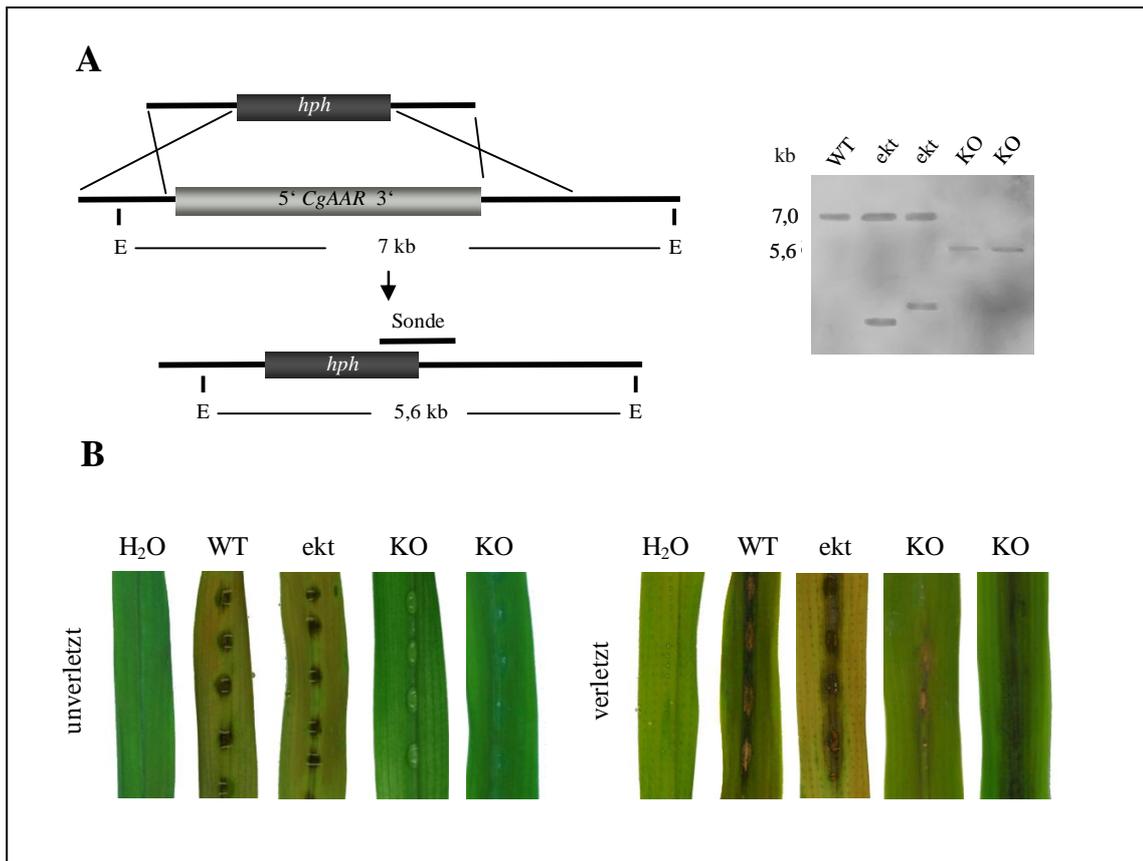


Abb. 26: *CgAAR*-Deletionsmutagenese und Maisinfektion

(A) Der vollständige *CgAAR*-ORF wurde mittels homologer Rekombination durch eine 2 kb große Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) ersetzt. Die Southern-Analyse von Wildtypisolat CgM2 (WT), zwei Isolaten mit ektopischer Integration des KO-Konstrukts (ekt) und zwei Isolaten mit Integrationen durch homologe Rekombinationsereignisse (KO) zeigte eine Größenverschiebung von 7 kb (WT) auf 5,6 kb (KO), verursacht durch die Integration der Resistenzkassette. Der Restriktionsverdau genomischer DNA aus den untersuchten Isolaten wurde mit *Eco8II* (E) durchgeführt. Die verwendete Sonde von 1000 bp Länge war komplementär zum 3'-Bereich des *hph*-ORF sowie zur Terminatorregion von *CgAAR*. (B) Infektionsexperimente mit unverletzten Maisblättern zeigten, dass sechs Tage nach Infektionsbeginn das Wildtypisolat CgM2 (WT), nicht jedoch die $\Delta Cgaar$ -Deletionsmutanten (KO) Anthraknosen verursachen. Nach der Inokulation verletzter Blätter mit $\Delta Cgaar$ konnte die Entstehung von Blattnekrosen beobachtet werden. Die Symptome waren jedoch schwächer ausgeprägt als bei der Wildtypinfektion. H₂O: Kontrollinokulation

Für zwei unabhängige Einzelsporisolate (KO) zeigte die Größenverschiebung des detektierten DNA-Fragments (5,6 kb; KO) gegenüber der Wildtypbande (7 kb, WT) eine Integration des KO-Konstrukts durch homologe Rekombination an. Dagegen wiesen Isolate mit ektopisch integriertem Konstrukt (ekt) eine Bande zusätzlich zur Wildtypbande auf (vgl. WT, KO und ekt).

Inokulationsexperimente mit verletzten und unverletzten Maisblättern wurden zur Untersuchung der Infektionsfähigkeit von $\Delta Cgaar$ -Isolaten durchgeführt (Abb. 26 B). Wildtypisolat (WT) und ektopische Transformante (ekt) verursachten auf intakten und artifiziell verletzten Blättern charakteristische Anthraknosesymptome, wobei verletzte Blätter deutlich stärkere Nekrosen aufwiesen (vgl. WT und ekt, verletzt und unverletzt).

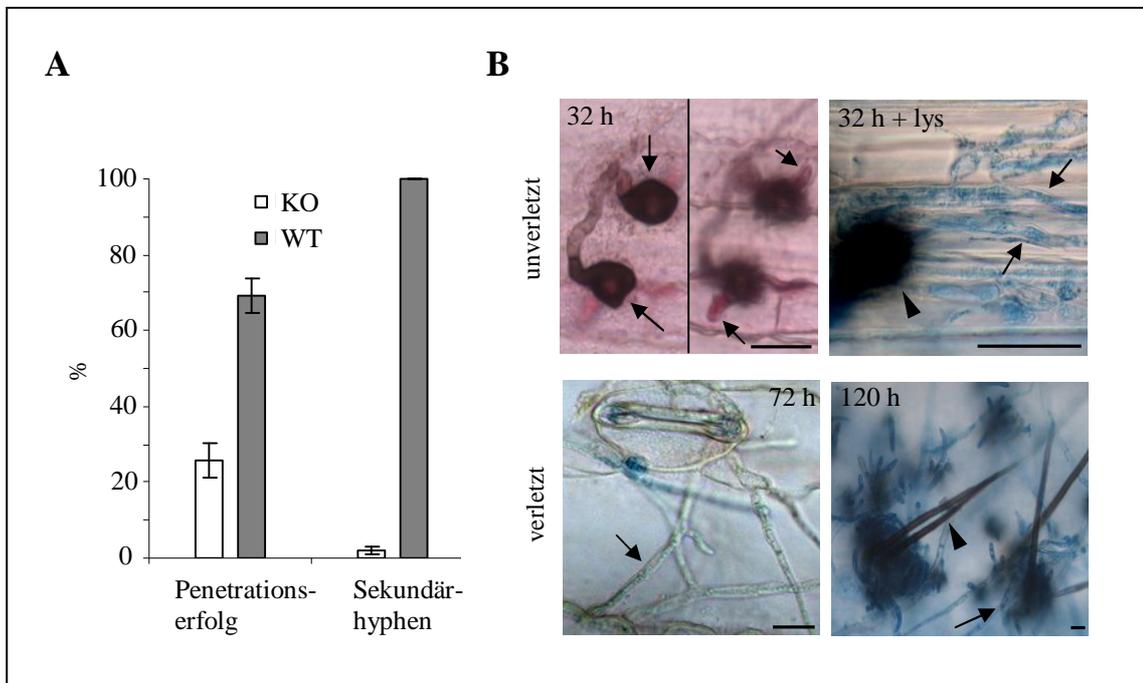


Abb. 27: Charakterisierung des $\Delta Cgaar$ -Infektionsphänotyps

(A) Nur etwa 25 Prozent der $\Delta Cgaar$ -Appressorien (KO) penetrierten erfolgreich die Maisepidermis. Vergleichswerte für CgM2-Appressorien lagen bei etwa 75 Prozent Penetrationserfolg. Nur in Ausnahmefällen konnten sekundäre $\Delta Cgaar$ -Infektionshyphen beobachtet werden, während eine erfolgreiche Penetration des Wirts durch den Wildtyp immer zur Bildung sekundärer Infektionsstrukturen führte ($n=600$, $p<0,05$). (B) Nach der erfolgreichen Penetration der Pflanzenepidermis durch $\Delta Cgaar$ -Appressorien (32 h, linke Bildhälfte, Pfeile) markierte die Differenzierung von Primärhyphen (32 h, rechte Bildhälfte, Pfeile) das Ende des Infektionsprozesses. Dieser frühe Arrest konnte durch Zugabe von Lysin aufgehoben werden, wie die Bildung sekundärer Infektionshyphen zeigte (32 h + lys, Pfeile; Pfeilkopf: Appressorium). Verletzte Blätter wurden von $\Delta Cgaar$ -Hyphen invasiv besiedelt (72 h, Pfeil). Etwa fünf Tage nach Infektionsbeginn wurde der Entwicklungszyklus mit der Differenzierung von Konidien in Acervuli abgeschlossen (Pfeil; Pfeilkopf: Seta). Balken=10 μm

Dagegen entwickelten unverletzte Maisblätter nach einer Inokulation mit $\Delta Cgaar$ -Konidien keinerlei Symptome, während auf verletzten Blättern relativ schwach ausgeprägte Nekrosen sichtbar wurden (vgl. WT und KO verletzt und unverletzt).

Mikroskopische Analysen der Penetrationskompetenz von $\Delta Cgaar$ -Appressorien führten zu unerwarteten Resultaten. Etwa 75 Prozent der differenzierten Appressorien (KO) waren nicht in der Lage die Epidermis von Maisblättern zu penetrieren (Abb. 27 A). Nach einer erfolgreichen Penetration endete der Infektionsverlauf in der frühen biotrophen Phase, wobei nur sehr kurze Primärhyphen ausgebildet wurden (Abb. 27 B 32 h, unverletzt, rechte Bildhälfte, Pfeile). Diese Blockade konnte durch Zugabe von Lysin zum Inokulationstropfen vollständig aufgehoben werden (Abb. 27 B, 32 h + lys, Pfeile: Sekundärhyphen, Pfeilkopf: Appressorium). Verletzte Maisblätter wurden von $\Delta Cgaar$ auch ohne exogen appliziertes Lysin besiedelt (Abb 27 B 72 h, Pfeil: Sekundärhyphen) und der asexuelle Reproduktionszyklus vollständig abgeschlossen, wie die Differenzierung von Acervuli mit zahlreichen Konidien zeigte (Abb 27 B 120 h, Pfeil: Acervulus, Pfeilkopf: Setae).

Der Infektionsphänotyp von $CgAAR$ -defizienten Mutanten ist somit einerseits durch den weitgehenden Verlust der Penetrationskompetenz, andererseits durch einen Arrest in der frühen biotrophen Phase gekennzeichnet. Auf artifiziell verwundeten Blättern konnte dagegen der Reproduktionszyklus abgeschlossen werden. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis auf die Notwendigkeit der *de novo* Synthese von Lysin im Verlauf der frühen biotrophen Phase der Wirt-Parasit-Interaktion.

III.4 Charakterisierung des *Colletotrichum graminicola*

Melaninsynthese-Gens *CgPKS1*

III.4.1 Struktur von *CgPKS1*

In einem subtraktiven Hybridisierungsansatz zur Identifizierung von Transkripten aus *C. graminicola*, die in der frühen Phase der Infektion verstärkt exprimiert werden, gelang die Identifizierung eines cDNA-Fragments, dessen Sequenz eine große Ähnlichkeit zu fungalen T4HN-Synthasen aufwies (Sugui & Deising, 2002). Damit war es möglich, die vollständige DNA-Sequenz einer Polyketidsynthase für die heterologe

Proteinexpression sowie Interaktionsstudien mit CgPPT1 zu isolieren. Darüber hinaus sollte die Charakterisierung von *CgPKS1* wichtige Informationen über die Bedeutung melanisierter Infektionsstrukturen für die Virulenz und Pathogenität von *C. graminicola* liefern.

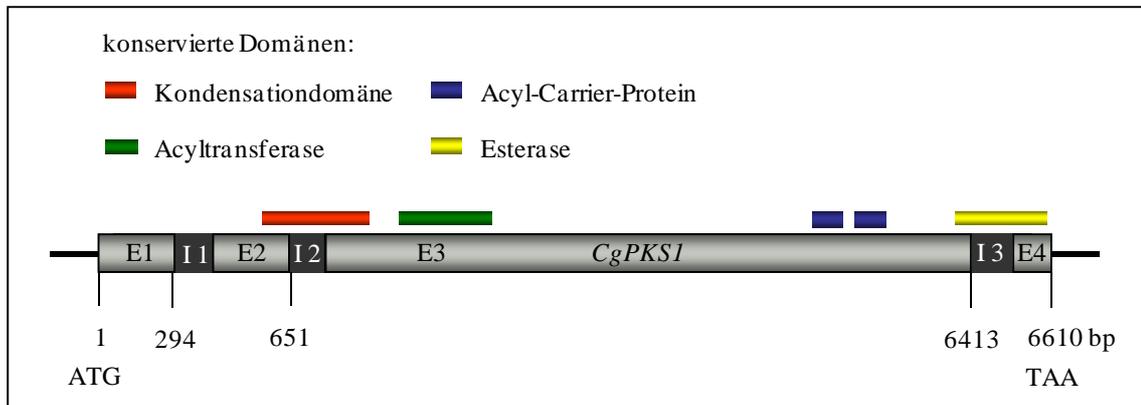


Abb. 28: Struktur von *CgPKS1*

Der kodierende Bereich von *CgPKS1* umfasst vier Exons (E1-4) von 294 bp, 292 bp, 5662 bp bzw. 153 bp Länge und wird durch drei Introns (I1-3) von 65 bp, 50 bp bzw. 54 bp Länge unterbrochen. Das abgeleitete Protein besteht aus 2146 Aminosäuren. Die Bereiche der funktionalen Domänen sind farblich markiert.

Ausgehend von einem 200 bp großen DNA-Fragment des Gens erfolgte die Isolierung des gesamten kodierenden Bereichs sowie etwa 5 kb flankierender DNA-Sequenz mittels Genome Walking (Liu & Baird, 2001).

Strukturelle Analysen und Sequenzvergleiche mit T4HN-Synthasen nah verwandter Ascomyceten ergaben einen putativen ORF von 6441 bp, der von drei Introns unterbrochen wird (Abb. 28). Das abgeleitete Protein umfasst 2146 Aminosäuren und besitzt eine molare Masse von 233697 g/mol. Die Anordnung und Anzahl der charakteristischen PKS-Domänen kennzeichnen *CgPKS1* als iterative Typ I-PKS. Der kalkulierte isoelektrische Punkt befindet sich bei einem pH-Wert von 6,08.

III.4.2 Expression des *CgPKS1:eGFP*-Reporterkonstrukts

Melanisierte Strukturen von *C. graminicola* treten in verschiedenen Phasen des Infektionszyklus in Erscheinung. Etwa 24 Stunden nach der Inokulation hydrophober Oberflächen mit Konidien können stark melanisierte Appressorien mikroskopisch

beobachtet werden. Weitere 72 Stunden später werden melanisierte Setae, nadelförmige Strukturen mit unbekannter Funktion, im Bereich der Acervuli sichtbar. Deutlich melanisiert erscheinen aber auch ältere vegetative Hyphen. Korreliert die Expression von *CgPKSI*-Transkripten mit der sichtbaren Melanisierung von Infektionsstrukturen, wäre dies ein Hinweis auf eine transkriptionelle Regulation dieses Schlüsselenzyms der Melaninbiosynthese.

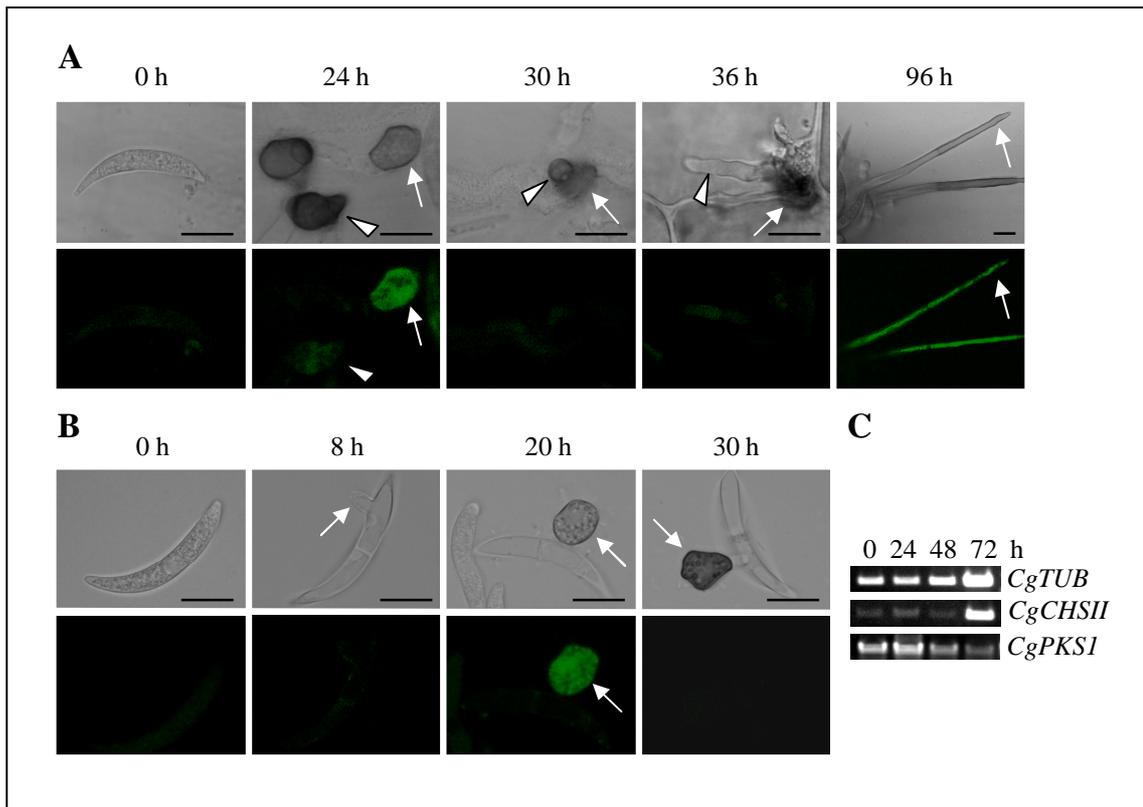


Abb. 29: Expression des *CgPKSI:eGFP*-Reporterkonstrukts

(A) Expression des *CgPKSI:eGFP*-Fusionkonstrukts nach der Inokulation von Maisblättern. Deutliche Fluoreszenz zeigten Appressorien (24 h, Pfeil) und Setae (96 h, Pfeil) bei einsetzender Melanisierung. Pfeilkopf: reifes Appressorium (24 h), Infektionsvesikel (30 h), Primärhyph (36 h). (B) Inokulierte Polyester-Folie. Pfeile: Keimschlauch (8 h), Appressorium mit beginnender Melanisierung (20 h), reifes Appressorium (30 h). A, B: Obere Reihe: Hellfeld, untere Reihe: Fluoreszenz; Balken=10 µm (C) Semi-quantitative RT-PCR mit spezifischen *CgPKSI*-Primern zur Abschätzung der relativen *CgPKSI*-Transkriptmenge im Zeitraum 0-72 h nach der Inokulation von Maisblättern. Spezifische Primer für die PCR-Amplifikation eines Fragments des β -Tubulin-Gens (*CgTUB*) bzw. des Chitinsynthase II-Gens (*CgCHSII*) wurden in Kontrollansätzen verwendet.

Die vollständige Isolierung von *CgPKSI* ermöglichte die Expression eines *CgPKSI:eGFP*-Fusionskonstrukts unter der Kontrolle des nativen Promoters (Abb. 29). Maisblätter (Abb. 29 A) bzw. Polyester-Folie (Abb. 29 B) wurden mit Konidien des *CgPKSI:eGFP*-Reporterstammes inokuliert. Etwa 20-24 Stunden nach dem Beginn des Experiments setzte die Melanisierung der Appressorienzellwand ein. Gleichzeitig fluoreszierten die Appressorien in dieser Phase des Entwicklungszyklus am stärksten (Abb. 29 A 24 h, bzw. B 20 h, vgl. Hellfeld- und Fluoreszenzbilder), während eine deutliche Abnahme der GFP-Fluoreszenz in stark melanierten Appressorien beobachtet werden konnte (Abb. 29 A 24 h, Pfeilkopf). Signifikante GFP-Fluoreszenz konnte jedoch nicht in Konidien (Abb. 29 A, B 0 h), Keimschläuchen (Abb. 29 B 8 h, Pfeil), Infektionsvesikeln (Abb. A 30 h, Pfeilkopf) und primären Infektionshyphen (Abb. 29 A 36 h, Pfeilkopf) nachgewiesen werden. Dagegen zeigten Setae mit einsetzender Melanisierung eine deutliche GFP-Fluoreszenz (Abb. 29 A 96 h, Pfeil).

Die Expression des *CgPKSI:eGFP*-Reporterkonstrukts korrelierte somit eindeutig mit dem Einsetzen der Melanisierung von Appressorien und Setae. Nichtmelanierte Infektionsstrukturen zeigten dagegen keine signifikante GFP-Fluoreszenz. Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf eine zeitliche und räumliche Transkriptionskontrolle von *CgPKSI* im Verlauf der Pathogenese.

In semiquantitativen RT-PCR-Analysen zur Bestimmung der relativen Transkriptmengen von *CgPKSI*-mRNA in infiziertem Blattgewebe konnte eine maximale Transkriptkonzentration etwa 24 Stunden nach Inokulationsbeginn nachgewiesen werden (Abb. 29 C). Dieser Wert korreliert mit dem Auftreten melanisierter Appressorien. Allerdings zeigte eine relativ starke PCR-Produktbande signifikante *CgPKSI*-Transkriptmengen in den Konidien zum Zeitpunkt 0 Stunden an. Zu diesem Zeitpunkt war jedoch keine GFP-Fluoreszenz sichtbar. RT-PCR und die Analyse der Expression eines GFP-Reporterkonstrukts führten in diesem Fall zu unterschiedlichen Resultaten, was eine klare Aussage zur *CgPKSI*-Expression in den Konidien verhindert.

Darüber hinaus wiesen die Ergebnisse der RT-PCR auf eine allmähliche Verringerung der *CgPKSI*-Transkriptmenge zwischen 24 und 72 Stunden hin, wohingegen GFP-Fluoreszenz nur bis etwa 24 Stunden nach Infektionsbeginn nachweisbar war. Möglicherweise ist die Ursache dieser Abweichung eine Asynchronität während der Appressoriendifferenzierung oder auch der Ausdruck einer geringeren Sensitivität des GFP-Reporterassays gegenüber der RT-PCR.

III.4.3 Inaktivierung von *CgPKS1*

III.4.3.1 Insertionsmutagenese

Zur funktionellen Charakterisierung von *CgPKS1* sowie zur Abgrenzung des $\Delta CgpkS1$ -Deletionsphänotyps vom Phänotyp der *CgPPT1*- bzw. *CgAAR*-defizienten Isolate erfolgte die gezielte Inaktivierung von *CgPKS1* durch die Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette in den ORF des Gens (Abb. 30 A).

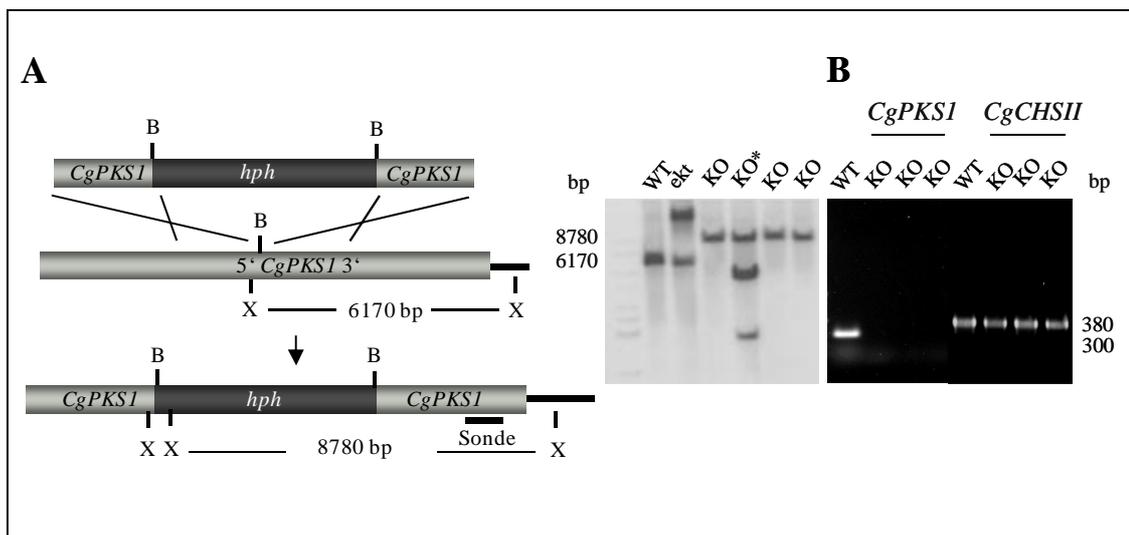


Abb. 30: *CgPKS1*-Deletionsmutagenese

(A) In die *Bsp119I*-Schnittstelle (B) eines 1689 bp großen PCR-Fragments von *CgPKS1* (Nukleotide 3557-5246) wurde die 3,7 kb große Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) kloniert und das vollständige Konstrukt für die Transformation fungaler Protoplasten verwendet. Die Southern-Analyse von Wildtyp (WT), einem Isolat mit ektopischer Integration (*ekt*) und drei Isolaten (KO) mit Integrationen, die durch homologe Rekombinationsereignisse entstanden, zeigte eine Größenverschiebung von 6170 bp (WT) auf 8780 bp (KO) bzw. etwa 10 kb (*ekt*), verursacht durch die Integration der Resistenzkassette. Ein untersuchtes Isolat enthielt neben einer Integration im *CgPKS1*-ORF multiple ektopische Integrationen (KO*). Der Restriktionsverdau von genomischer DNA aus den untersuchten Isolaten wurde mit *XhoI* (X) durchgeführt. Die verwendete Sonde ist komplementär zu den Nukleotiden 4424-4708 des *CgPKS1*-ORF. (B) RT-PCR Analysen zur Kontrolle der *CgPKS1*-Inaktivierung auf Transkriptebene erfolgten unter Verwendung spezifischer Primer für die Amplifikation von *CgPKS1*- bzw. *CgCHSII*-Fragmenten. Während ein 380 bp großes PCR-Produkt für das Fragment des Chitinsynthasegens *CgCHSII* in allen Proben nachweisbar war, bestätigte das Fehlen des PCR-Produkts für $\Delta CgpkS1$ -Isolate (KO) die erfolgreiche Geninaktivierung.

Erfolgreich transformierte Konidien bildeten Kolonien auf hygromycinhaltigem Selektionsmedium. Die DNA von Einzelsporisolaten der erhaltenen Kolonien wurde mittels Southern-Analyse näher charakterisiert. Für drei unabhängige Einzelsporisolate zeigte die Größenverschiebung des detektierten DNA-Fragments (8780 bp, KO) gegenüber der Wildtypbande (6170 bp, WT) eine Integration des KO-Konstrukts an, die auf ein homologes Rekombinationsereignis zurückzuführen war. Dagegen wies ein Isolat mit ektopisch integriertem Konstrukt (ekt) eine Bande zusätzlich zur Wildtypbande auf. Ein weiteres Isolat enthielt neben der korrekten Integration des KO-Konstrukts zusätzlich eine ektopische Integration (KO*) und wurde daher von weitergehenden Analysen ausgeschlossen (vgl. WT, KO, KO* und ekt).

Zur Bestätigung der Geninaktivierung auf Transkriptionsebene wurden RT-PCR-Experimente mit RNA aus Wildtyp und Deletionsmutanten durchgeführt (Abb. 30 B). Ein 300 bp großes *CgPKS1*-Fragment aus dem 5'-Bereich des ORF konnte in Ansätzen mit Wildtyp-RNA (WT), nicht jedoch in Ansätzen mit RNA aus $\Delta CgpkS1$ -Isolaten (KO) amplifiziert werden. Kontrollreaktionen mit spezifischen Primern zur Amplifikation eines 380 bp großen Fragments des konstitutiv exprimierten *C. graminicola* Chitinsynthase II-Gens (*CgCHSII*; Werner *et al.*, 2007) ergaben für sämtliche Proben die erwartete Produktbande.

III.4.3.2 phänotypische Charakterisierung von $\Delta CgpkS1$

Ein typisches Merkmal des Phänotyps von $\Delta CgpkS1$ -Insertionsmutanten (Abb. 31 A, KO) war die im Vergleich zum Wildtyp (WT) fehlende Melanisierung. Während Myzelien zehn Tage alter PDA-Kulturen des *C. graminicola*-Wildtypisolats (WT) und eines Isolats mit ektopisch integriertem KO-Konstrukt (ekt) eine dunkelbraune bis schwarze Pigmentierung aufwiesen, waren die vegetativen Hyphen der $\Delta CgpkS1$ -Insertionsmutante (KO) hyalin bzw. schwach orange gefärbt (vgl. WT, KO und ekt).

Die heterologe Expression von *CgPKS1* unter Kontrolle eines konstitutiven Promoters (KOM) komplementierte den makroskopisch sichtbaren Mutantenphänotyp. Im Vergleich zum Wildtyp bewirkte die konstitutive Expression von *CgPKS1* jedoch eine sehr frühe und starke Melanisierung der vegetativen Hyphen (vgl. WT, KO und KOM).

Die Fähigkeit nichtmelanisierter $\Delta CgpkS1$ -Isolate zur Infektion verletzter und unverletzter Maisblätter wurde in Inokulationsversuchen analysiert (Abb. 31 B).

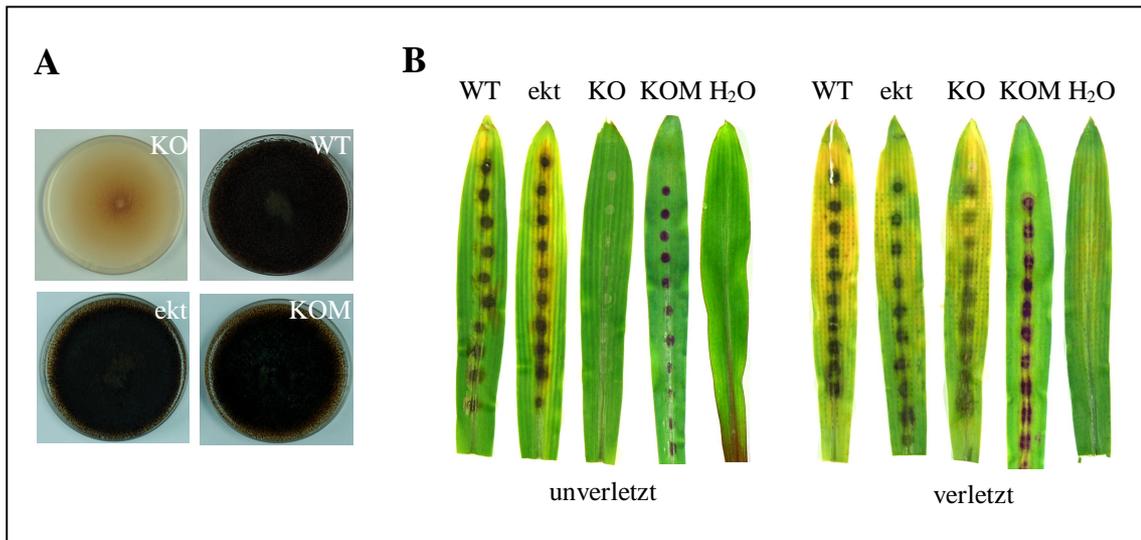


Abb. 31: Charakterisierung des $\Delta Cgpk1$ -Phänotyps

(A) Während das Wildtypisolat CgM2 (WT) und eine Transformante mit ektopischer Integration des KO-Konstrukts (ekt) stark melanisierte vegetative Hyphen aufwiesen, enthielten die nur schwach gefärbten Hyphen der $\Delta Cgpk1$ -Insertionsmutante (KO) gelbe bis orangefarbene Pigmente. Genetisch komplementierte $\Delta Cgpk1$ -Isolate (KOM) mit einer ektopischen Integration von *CgPKS1* unter der Kontrolle des konstitutiven *oliC*-Promoters aus *A. nidulans* wiesen stark melanisierte vegetative Hyphen auf. (B) Infektionsexperimente mit unverletzten Maisblättern zeigten, dass sechs Tage nach Infektionsbeginn das Wildtypisolat CgM2 (WT) und ein genetisch komplementiertes Isolat (KOM), nicht jedoch die $\Delta Cgpk1$ -Insertionsmutanten (KO) Blattantraknosen verursachten. Nach der Inokulation verletzter Blätter mit $\Delta Cgpk1$ konnte jedoch die Entstehung von Symptomen beobachtet werden. H₂O: Kontrollinokulation

Während das Wildtypisolat (WT) und eine ektopische Transformante (ekt) auf verletzten und intakten Blättern Anthraknose-Symptome hervorriefen, blieben unverletzte Maisblätter nach einer Inokulation mit Konidien der $\Delta Cgpk1$ -Insertionsmutante (KO) ohne sichtbare Krankheitssymptome. Dagegen wiesen artifiziell verletzte Blätter, die mit $\Delta Cgpk1$ -Konidien inokuliert wurden, charakteristische Nekrosen auf.

Die genetische Komplementation von $\Delta Cgpk1$ (KOM) führte zu stark melanisierten Isolaten, die aber im Vergleich zu den vom Wildtypisolat verursachten Chlorosen und Nekrosen wesentlich schwächer ausgeprägte Symptome auf intakten Blättern hervorriefen. Verletzte Blätter entwickelten dagegen charakteristische Symptome als Reaktion auf die Inokulation mit Konidien des komplementierten Isolats (vgl. WT, KO, ekt., KOM, verletzt und unverletzt).

Die Fähigkeit zur Synthese von Melanin ist somit eine unabdingbare Voraussetzung für die erfolgreiche Infektion von Wirtspflanzen. Gleichzeitig scheint aber auch die exakte räumliche und zeitliche Steuerung der Melaninsynthese von entscheidender Bedeutung

zu sein, wie mikroskopische Analysen von Appressorien des Wildtyps (Abb. 32, WT), der Melanin-defizienten $\Delta Cgpk1$ -Mutante (KO) und eines genetisch komplementierten $\Delta Cgpk1$ -Isolats (KOM) zeigten.

Wildtyp-Appressorien waren als gleichmäßig melanisierte Strukturen sichtbar, während Appressorien der $\Delta Cgpk1$ -Mutante keinerlei Melanin in ihren Zellwänden enthielten (vgl. WT und KO, Pfeile). Erstaunlicherweise waren Appressorien des genetisch komplementierten $\Delta Cgpk1$ -Isolats (KOM) weitaus schwächer melanisiert als Wildtyp-Appressorien. Darüber hinaus konnten auffällige morphologische Unterschiede beobachtet werden. Während das äußere Erscheinungsbild von Wildtyp-Appressorien durch kleine Einbuchtungen gekennzeichnet war, erschienen Appressorien des genetisch komplementierten Isolats unter dem Mikroskop als gleichmäßig runde bis ovale Strukturen mit glatten Rändern (vgl. WT und KOM, Pfeile).

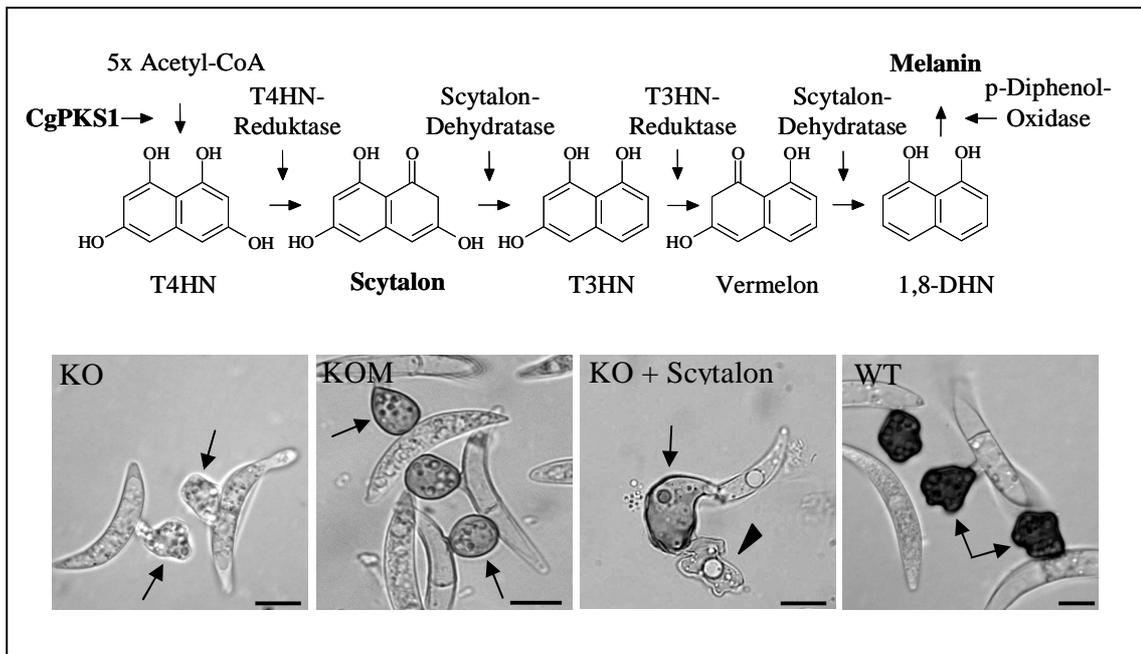


Abb. 32: Einfluss von Melanin auf die Appressorienmorphologie

Appressorien des Wildtyp-Isolats (WT, Pfeile) waren stark melanisiert, während die Zellwände von $\Delta Cgpk1$ -Appressorien (KO, Pfeile) kein Melanin enthielten. Schwach melanisiert waren Appressorien des genetisch komplementierten Isolats (KOM, Pfeile), in dem das ektopisch integrierte *CgPKS1*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven *oliC*-Promoters aus *A. nidulans* exprimiert wurde. Die chemische Komplementation von $\Delta Cgpk1$ führte zu stark vergrößerten Appressorien (KO + Scytalon, 1 mM), die unter Verlust des cytoplasmatischen Inhalts (Pfeilkopf) lysierten. Die Bilder wurden 30 Stunden nach der Inokulation von Polyester-Folie aufgenommen. Balken=10 µm

Scytalon entsteht im Verlauf der fungalen Melaninbiosynthese als Reduktionsprodukt von Tetrahydroxynaphthalen (T4HN, Abb. 32) und ist daher geeignet, den Ausfall der

T4HN-Synthese zu kompensieren. Tatsächlich waren in Anwesenheit von Scytalon gebildete $\Delta Cgpk1$ -Appressorien schwach melanisiert (KO + Scytalon, Pfeil). Darüber hinaus waren diese Appressorien aber auch deutlich voluminöser und wesentlich instabiler als Appressorien der Referenzisolate. So lysierten die chemisch komplementierten Appressorien häufig, wobei es zum Austritt des cytoplasmatischen Inhalts kam (KO + Scytalon, Pfeilkopf).

Durch die genetische und chemische Komplementation Melanin-defizienter $\Delta Cgpk1$ -Appressorien konnte der Phänotyp des Wildtyp-Isolats nur teilweise wiederhergestellt werden. Zwar verursachten genetisch komplementierte Isolate Anthraknosen auf Maisblättern, allerdings waren diese Symptome weit weniger stark ausgeprägt als bei der Wildtyp-Infektion. Die chemische Komplementation mit Scytalon führte dagegen zu vollständig funktionslosen Appressorien.

In mikroskopischen Analysen der frühen Infektionsphase konnte nachgewiesen werden, dass nichtmelanisierte Appressorien der $\Delta Cgpk1$ -Insertionsmutante nicht in der Lage waren, intakte Maisblätter zu penetrieren (Abb. 33 A). Häufig lysierten $\Delta Cgpk1$ -Appressorien auf der Blattoberfläche unter Freisetzung des cytoplasmatischen Inhalts (KO 36 h, Pfeil) oder es wurden Appressorienketten gebildet (KO 32 h, Pfeile). Nach der Infektion verletzter Blätter konnte jedoch der vollständige Entwicklungszyklus durchlaufen werden. Die Bildung von Acervuli mit Konidien (KO 120 h, Pfeil) auf der Blattoberfläche markierte den erfolgreichen Abschluss der Infektion. Dagegen penetrierten die melanisierten Appressorien des Wildtyps (WT) etwa 24 Stunden nach dem Beginn der Inokulation Epidermiszellen der Wirtspflanze (24 h, Pfeile) und differenzierten primäre Infektionshyphen (30 h und 34 h, Pfeil).

Quantitative Daten relevanter Parameter der frühen Infektionsphase von Wildtyp und $\Delta Cgpk1$ -Insertionsmutante zeigten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl gekeimter Konidien bzw. gebildeter Appressorien (Abb. 33 B). Es konnte jedoch keine erfolgreiche Penetration der Blattepidermis durch $\Delta Cgpk1$ -Appressorien beobachtet werden, wohingegen mehr als 80 Prozent der Wildtyp-Appressorien in der Lage waren die Wirtsepidermis zu penetrieren. Ungefähr 25 Prozent der $\Delta Cgpk1$ -Appressorien lysierten auf der Blattoberfläche.

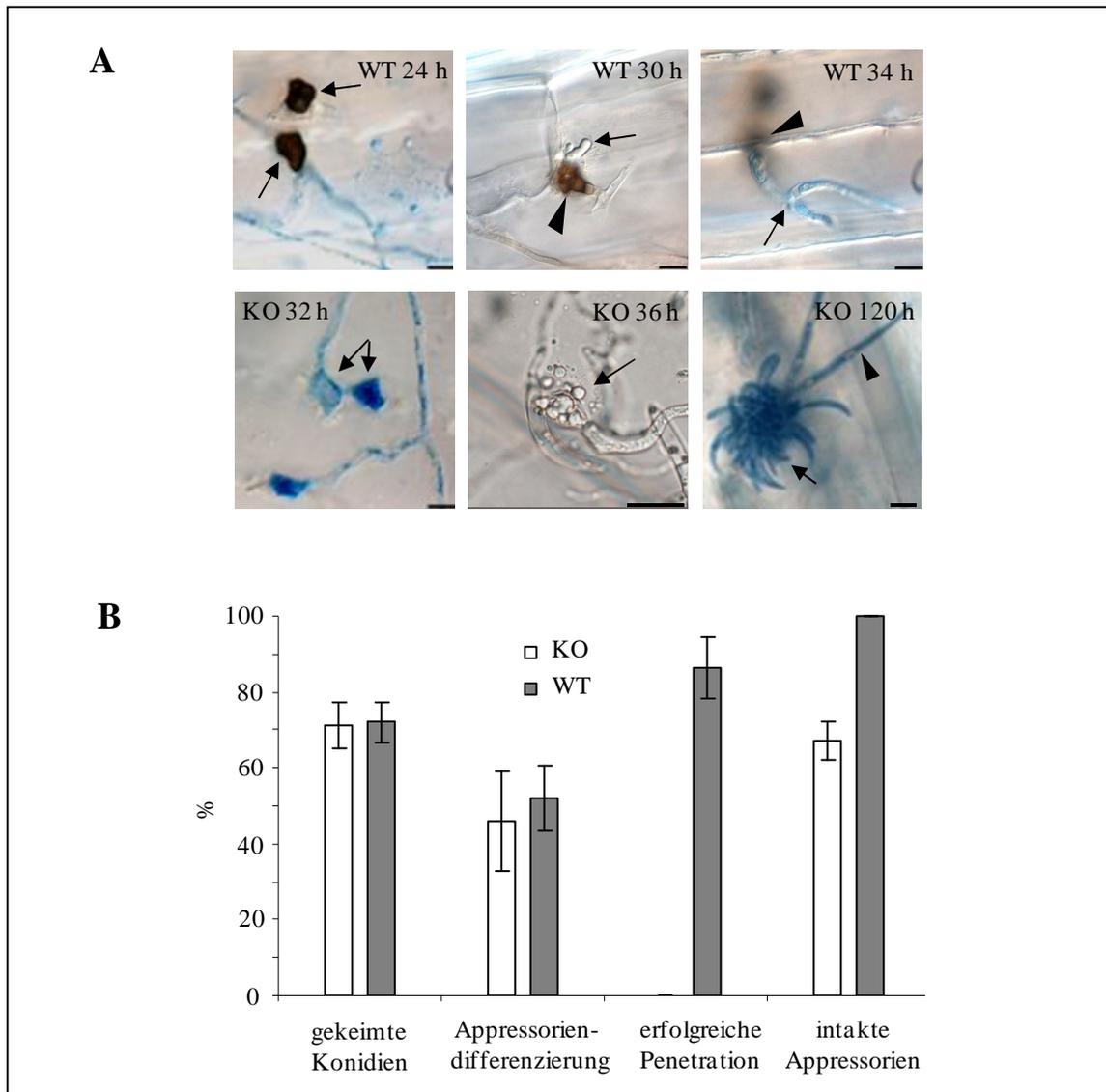


Abb. 33: Bedeutung von Melanin für die Penetrationskompetenz von Appressorien

(A) Vergleich der frühen Infektionsphase von Wildtyp und $\Delta Cgpk1$. Melanisierte Wildtyp-Appressorien (WT 24 h, Pfeile) penetrierten Maisblätter etwa 24 Stunden nach Beginn der Inokulation und bildeten Primärhyphen (WT 30 h und 34 h, Pfeil; Pfeilkopf weist auf Appressorium). Dagegen gelang $\Delta Cgpk1$ -Appressorien keine erfolgreiche Penetration der Epidermiszellen. Ein Teil der Appressorien lysierte, wobei es zum Verlust des cytoplasmatischen Inhalts kam (KO 36 h, Pfeil). Charakteristisch war eine multiple Appressorienbildung (KO 32 h, Pfeile). Die Infektion verletzter Blätter führte jedoch zum erfolgreichen Abschluss des Entwicklungszyklus, wie die Differenzierung von Acervuli mit Konidien zeigte (KO 120 h, Pfeil, Pfeilkopf weist auf Seta). Balken=10 μ m (B) Quantitative Analyse infektionsrelevanter Parameter. Etwa 70 Prozent der Wildtyp- und $\Delta Cgpk1$ -Konidien bildeten einen Keimschlauch, ca. 50 Prozent der gekeimten Konidien differenzierten Appressorien 24 Stunden nach Beginn der Infektion ($p < 0,05$). Während etwa 90 Prozent der Wildtyp-Appressorien die Wirtsepidermis erfolgreich penetrierten, konnte für $\Delta Cgpk1$ -Appressorien kein Penetrationserfolg nachgewiesen werden. Etwa ein Viertel aller $\Delta Cgpk1$ -Appressorien lag 48 Stunden nach Infektionsbeginn lysiert vor, während Wildtyp-Appressorien ohne Penetrationserfolg intakt blieben ($p < 0,05$; $n = 1600$).

Lysierte Appressorien der $\Delta Cgpk1$ -Mutante konnten auf Mais- bzw. Zwiebel-epidermen, nicht jedoch auf künstlichen Oberflächen beobachtet werden. Tatsächlich ergaben quantitative Analysen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Integrität von Wildtyp- bzw. $\Delta Cgpk1$ -Appressorien nach einer Inokulation von transparenten Polyester-Folien (Abb. 34). Wurden die ausdifferenzierten Appressorien beider Isolate jedoch in einer Lösung mit zellwandabbauenden Enzymen, darunter Chitinasen und Glucanasen, inkubiert, zeigten sich gravierende Unterschiede. Lediglich ein Viertel der $\Delta Cgpk1$ -Appressorien erschien äußerlich unversehrt, während die überwiegende Mehrheit lysiert vorlag. Melanisierte Appressorien des Wildtyps blieben dagegen größtenteils intakt (vgl. WT, KO +/- hydrolytische Enzyme).

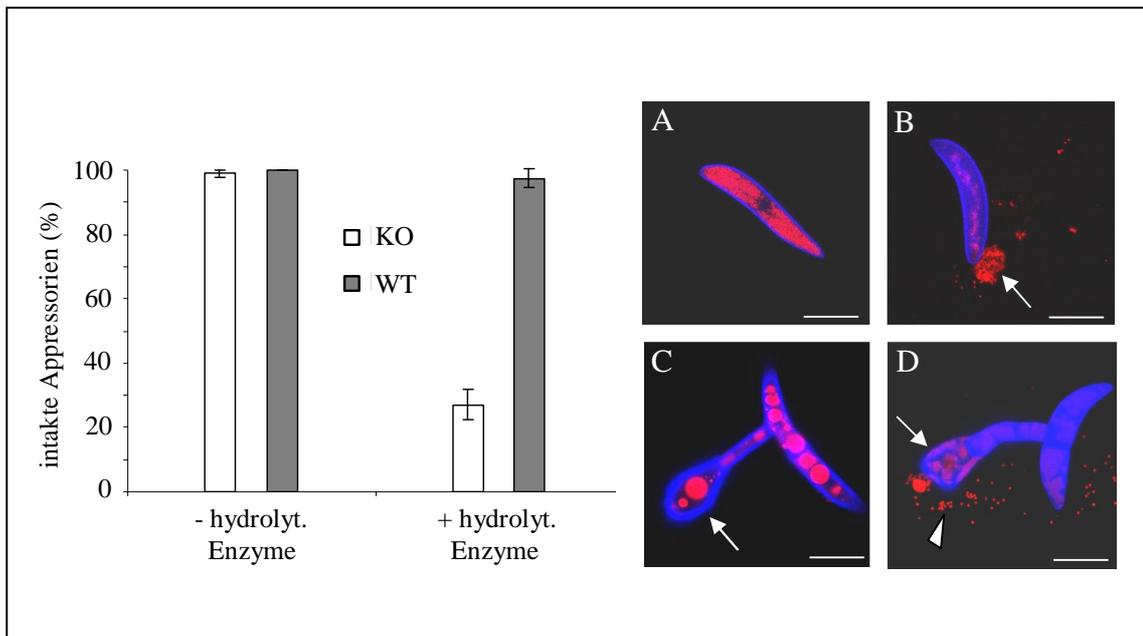


Abb. 34: Melanisierung erhöht die Widerstandsfähigkeit der Zellwand gegenüber hydrolytischen Enzymen

(A) Quantitative Bestimmung der Appressorienlyse. Auf Polyester-Folie differenzierte Appressorien von Wildtyp- und $\Delta Cgpk1$ waren 48 Stunden nach Beginn der Inokulation unversehrt. Die Zugabe von 5 mg/ml *Trichoderma harzianum* Lysing Enzymes 24 Stunden nach Inokulationsbeginn führte jedoch zur Lyse von etwa 75 Prozent der $\Delta Cgpk1$ -Appressorien ($p < 0,05$; $n = 400$). (B-E) Calcofluor White- (blau, Zellwand) und Nile Red- (rot, Liposomen) Doppelfärbung von Konidien ohne (B; Austritt von Cytoplasma, Pfeil) und mit (C) zugesetzte zellwandabbauende Enzyme. Appressorien des Wildtyps (D, Pfeil) blieben nach 24stündiger Inkubation in 5 mg/ml Lysing Enzymes intakt, während die Mehrzahl der $\Delta Cgpk1$ -Appressorien (E, Pfeil) unter Verlust des Zellinhalts (E, Pfeilkopf) lysierte. Balken=10 μ m

Der Einfluss hydrolytischer Enzyme auf die Stabilität der fungalen Zellwand konnte durch die Färbung der Zellwand mit Calcofluor White sowie die Färbung von Lipiden mit Nile Red sichtbar gemacht werden (Abb. 34 A-E). Intakte Konidien waren ausgefüllt von intrazellulären Lipidkörperchen, die blau gefärbte Zellwand wurde als dünne Linie unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (Bild A). Chitinasen und Glucanasen hydrolysierten kovalente Verknüpfungen von Zellwandbestandteilen und verursachten dadurch die Freisetzung des cytoplasmatischen Inhalts (Bild B, Pfeil). Mit dem Verlust des intrazellulären Turgors kollabierte die Konidie, wodurch die gefärbte Zellwand in ihrer vollen Gestalt sichtbar wurde.

Bild C der Abbildung 34 zeigt ein intaktes melanisiertes Appressorium des Wildtyp-Isolats (Pfeil) nach der Inkubation mit zellwandabbauenden Enzymen. Charakteristisch waren die rotgefärbten Vakuolen, in denen Lipide metabolisiert werden. Ein Teil dieser Vakuolen verblieb im Konidium, das in diesem späten Stadium der Appressorienentwicklung durch eine Zellwand vom Appressorium getrennt war.

Die Zellwandpolymere nichtmelanisierter Appressorien der $\Delta Cgpk1$ -Mutante (Bild D, Pfeil) wurden durch die Wirkung zellwandabbauender Enzyme hydrolysiert, so dass cytoplasmatische Bestandteile außerhalb des Appressoriums nachgewiesen werden konnten (Pfeilkopf). Der Verlust des Zellinnendrucks führte zum Kollaps der fungalen Strukturen.

Der Phänotyp von $\Delta Cgpk1$ ist gekennzeichnet durch die fehlende Melanisierung von Appressorien, Setae und vegetativen Hyphen. Intakte Maisblätter können nicht penetriert werden. Ein beträchtlicher Teil der nichtmelanisierten $\Delta Cgpk1$ -Appressorien lysiert auf der Pflanzenepidermis, nicht jedoch auf künstlichen Oberflächen. Verletzte Maisblätter können jedoch durch $\Delta Cgpk1$ -Isolate besiedelt und der Infektionszyklus abgeschlossen werden. Der Apathogenität von $\Delta Cgpk1$ ist somit auf den Verlust der Penetrationskompetenz zurückzuführen.

III.5 Cytorrhizie

Das osmotische Potential einer Zelle wird durch die innerzelluläre Konzentration gelöster Moleküle bestimmt. Da Wasser wesentlich leichter als osmotisch aktive Substanzen semipermeable Zellmembranen passiert, verlieren lebende Zellen in einer hypoosmotischen Umgebung Wasser. Dadurch verkleinert sich das symplastische Volumen, wobei die Zellmembran sich deutlich sichtbar von der Zellwand löst. Besonders in Pflanzenzellen ist dieser als Plasmolyse bekannte Vorgang gut zu beobachten. Kollabiert die Zellwand als Folge des fehlenden Turgors, spricht man von Cytorrhizie. Cytorrhizie-Induktoren sind osmotisch aktive Substanzen, die aufgrund ihrer Teilchengröße die Zellwand nicht passieren können.

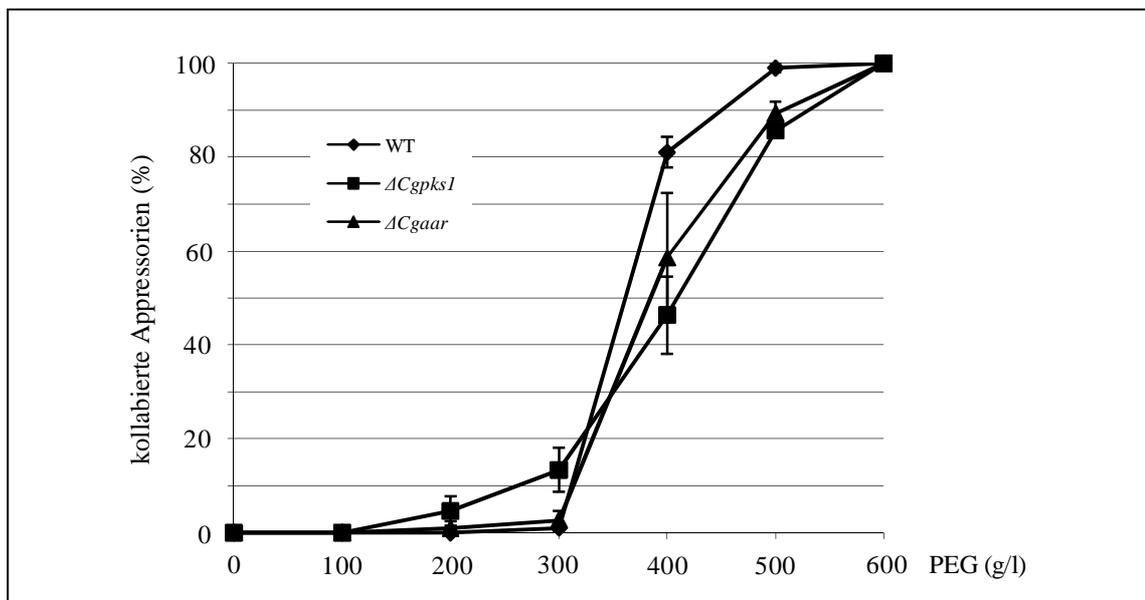


Abb. 35: Cytorrhizie

Prozentuale Anzahl kollabierter Appressorien des Wildtyps sowie der $\Delta Cgpk1$ - bzw. $\Delta Cgaar$ -Mutanten auf Polyesterfolie in PEG6000-Konzentrationen von 0-600 g/l.

Da der Eintritt von Plasmolyse bzw. Zellkollaps mikroskopisch gut beobachtet werden kann, ist es möglich, das osmotische Potential einer Zelle zu bestimmen. Dafür wird das Untersuchungsobjekt in Lösungen mit definierten Osmolytkonzentrationen inkubiert. Übersteigt das osmotische Potential der Lösung das der Zelle, kommt es zum Zellkollaps oder zur Plasmolyse.

Cytorrhizieexperimente mit Appressorien des Wildtyps und der $\Delta Cgpk1$ -Mutante sollten klären, ob die beobachtete Apathogenität von $\Delta Cgpk1$ tatsächlich auf einen

verringerten Turgor zurückgeführt werden kann. Zusätzlich sollte die Wirkung der Deletion von *CgAAR* auf die Generierung des Turgors in den Appressorien untersucht werden, da auch $\Delta Cgaar$ -Mutanten einen deutlichen Penetrationsdefekt aufwiesen.

Die experimentell bestimmten Daten der osmotisch bedingten Cytorrhizie ergaben keine Hinweise auf geringere Osmolytkonzentrationen in Appressorien der $\Delta Cgpksl$ - bzw. $\Delta Cgaar$ -Mutanten (Abb. 35). Fünfzig Prozent der Wildtyp-Appressorien kollabierten in einer PEG6000-Lösung von 358 g/l. Für $\Delta Cgpksl$ -Appressorien lag dieser Wert bei 408 g/l und für Appressorien der $\Delta Cgaar$ -Deletionsmutante bei 383 g/l. Die osmotischen Potentiale dieser PEG-Lösungen entsprachen nach Money (1989) 2,8 MPa (WT); 3,7 MPa ($\Delta Cgpksl$) und 3,24 MPa ($\Delta Cgaar$). Die beobachteten Penetrationsdefekte sind somit nicht auf einen reduzierten Turgor in den Appressorien der generierten Mutanten zurückzuführen.

Cytorrhiziedaten für $\Delta Cgppt1$ konnten nicht ermittelt werden, da keine hinreichend große Anzahl $\Delta Cgppt1$ -Appressorien auf Polyesterfolie gebildet wurde.

IV Diskussion

IV.1 *Colletotrichum graminicola* als Modellorganismus

Ascomyceten der Gattung *Colletotrichum* verursachen als weltweit verbreitete Pflanzenpathogene Anthraknosesympome, aber auch Blatt-, Stängel- und Fruchtfäulen an wirtschaftlich bedeutenden Nutzpflanzen. Damit einhergehende ökonomische Schäden gefährden einerseits die Existenz landwirtschaftlicher Unternehmen, andererseits eine ausreichende Nahrungsmittelversorgung, sofern keine wirkungsvollen Bekämpfungsmaßnahmen ergriffen werden. Charakteristisch für Pathogene der Gattung *Colletotrichum* ist deren breites Wirtsspektrum sowie die Besiedlung vielfältiger Lebensräume in tropischen, subtropischen und gemäßigten Klimaten. Besonders betroffen sind u. a. tropische Obstkulturen von Infektionen durch *C. gloeosporioides* und *C. musae*, Kaffeeplantagen durch *C. kahawae*, Kreuziferen durch *C. higginsianum*, Leguminosen durch *C. destructivum*, *C. capsici*, *C. trifolii*, *C. dematium* und *C. truncatum* und Hirse durch *C. sublineolum*.

Colletotrichum graminicola gehört neben *Ustilago maydis*, *Cochliobolus carbonum* und *Cochliobolus heterostrophus* zu den ausführlich charakterisierten pilzlichen Maispathogenen. Aufgrund seiner fakultativ saprophytischen Lebensweise kann *C. graminicola* in Nährmedien mit definierter Zusammensetzung kultiviert werden. Ein vollständiger Entwicklungszyklus, verbunden mit der Produktion großer Sporenmengen, wird *in vitro* innerhalb von drei bis vier Tagen durchlaufen. Genetische Manipulationen sind angesichts des haploiden Chromosomensatzes vegetativer Zellen und einer Genomgröße von 57,44 Mb einfach durchzuführen (<http://www.reeis.usda.gov/web/crisprojectpages>). Etablierte Transformationstechniken ermöglichen in diesem Zusammenhang eine effiziente und stabile Integration transgener DNA (Epstein *et al.*, 1998; Thon *et al.*, 2000; Floss, 2004; Flowers & Vaillancourt, 2005). Darüber hinaus stehen cDNA- (Graf, 2004) und genomische Bibliotheken (Rollins, nicht publiziert) zur Verfügung.

Die Sequenzierung des Genoms von *C. graminicola* wurde Ende 2008 erfolgreich abgeschlossen. Rohdaten des Sequenzierprojekts können unter <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> abgerufen werden. Gegenwärtig laufen die Arbeiten zur Annotierung der Sequenzdaten.

Vielfältige wissenschaftliche Arbeiten liefern umfassendes und informatives Material, auf das im Vorfeld der Planung von Experimenten zurückgegriffen werden kann (Bergstrom & Nicholson, 1999; Bechinger *et al.*, 1999; Chaky *et al.*, 2001; Schadeck *et al.*, 2003; Crouch *et al.*, 2006; Venard & Vaillancourt, 2007; Sukno *et al.*, 2008). Besonders intensiv erfolgte dabei die Erforschung von Genen mit Bedeutung für die Virulenz und Pathogenität (Thon *et al.*, 2002; Sugui & Deising, 2002; Wernitz, 2003; Tang *et al.*, 2006; Münch *et al.*, 2008; Krijger *et al.*, 2008) sowie der Zellwandbiosynthese (El Gueddari *et al.*, 2002; Amnuaykanjanasin & Epstein, 2006; Werner *et al.*, 2007). Ferner wurden Untersuchungen zur Entstehung und Verbreitung von Resistenzen gegenüber fungiziden Wirkstoffen durchgeführt (Avila-Adame *et al.*, 2003; Serfling *et al.*, 2007).

IV.2 C. *graminicola* ist ein landwirtschaftlicher Schaderreger mit erheblicher ökonomischer Bedeutung

Colletotrichum graminicola, der Erreger der Blattfleckenkrankheit (Anthraknose) und Stängelfäule, gehört weltweit zu den wirtschaftlich bedeutenden Maispathogenen (Hooker, 1976; White *et al.*, 1979). Besonders kontinental geprägte Klimate mit heißen Sommern bieten dem Pilz optimale Vermehrungsbedingungen. Diese klimatischen Voraussetzungen bieten die flächenmäßig größten Maisanbaugebiete der Welt im Mittleren Westen der USA (www.maiskomitee.de).

Anthraknose an Maiskulturen wurde vor 1970 in Nordamerika nur sporadisch beobachtet. Die dadurch verursachten Ertragsrückgänge waren gering (Dale, 1963; Leonard & Thompson, 1969). Anfang der 70er Jahre änderte sich diese Situation grundlegend. Verheerende Epidemien vernichteten große Teile der Maisernte in den zentralen und östlichen Anbaugebieten der Vereinigten Staaten (Hooker, 1976; Perkins & Hooker 1979; Wheeler *et al.*, 1974). Klimatische Veränderungen, die Entstehung stark virulenter Pathotypen und Modifikationen in der landwirtschaftlichen Anbaupraxis wurden als mögliche Erklärungen für das gestiegene Schadenspotential von *C. graminicola* angenommen (Bergstrom & Nicholson, 1999). Eine Stabilisierung der Situation konnte durch den Einsatz systemisch wirkender Fungizide und den Anbau widerstandsfähigerer Maissorten erreicht werden. Stängelfäule-Epidemien in den 80er und 90er Jahren korrelierten mit dem verstärkten Auftreten des europäischen Maiszünslers, welcher durch die

Verletzung des Pflanzengewebes den Weg für pilzliche Infektionen ebnet (Bergstrom *et al.*, 1983; Keller *et al.*, 1986; Muimba-Kankolongo, 1991).

IV.3 Sfp-Typ 4'-Phosphopantetheinyltransferasen als Pathogenitätsdeterminanten filamentöser Ascomyceten

IV.3.1 PPTasen aktivieren Enzyme des Sekundärmetabolismus

Sfp-Typ 4'-PPTasen aktivieren als zentrale Regulatoren des fungalen Stoffwechsels PKS und NRPS sowie PKS/NRPS-Hybride. Aufgrund ihrer strukturellen Variabilität übernehmen Polyketide und nichtribosomale Peptide vielfältige biologische Funktionen und ermöglichen Phytopathogenen dadurch die Erschließung von Nahrungsquellen sowie die Abwehr von Konkurrenten und Fressfeinden (Vining, 1990; Markham & Hille, 2001; Baker *et al.*, 2006; Howlett, 2006). Darüber hinaus besitzt ein Teil dieser Substanzen protektive Eigenschaften gegenüber biotischen und abiotischen Stressoren, wie z. B. UV-Strahlung, Hitze- und Trockenheit, reaktiven Sauerstoffspezies, zellwanddegradierenden Enzymen und toxischen Substanzen (Henson *et al.*, 1999 und Zitate darin; Nosanchuk & Casadevall, 2003; Oide *et al.*, 2006).

Eine relativ kleine Anzahl von PKS und NRPS pilzlicher Phytopathogene konnte bisher als Virulenz- bzw. Pathogenitätsdeterminanten identifiziert werden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Enzyme für die Synthese phytotoxischer Verbindungen (Markham & Hille, 2001; Howlett, 2006). Daneben besitzen Synthasen der Siderophor- und Melaninproduktion eine Funktion als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktor (Henson *et al.*, 1999; Oide *et al.*, 2006; Hof *et al.*, 2007).

Phytopathogene haben im Verlauf der Koevolution mit ihren Wirten eine Vielzahl individueller Infektionsstrategien und Entwicklungszyklen hervorgebracht (Burdon & Thrall, 2009). Ohne Zweifel spielen dabei Sekundärmetabolite für das Überleben und die erfolgreiche Vermehrung eine entscheidende Rolle.

Die Bedeutung der Gesamtheit aller PK und NRP im Lebenszyklus eines pathogenen Pilzes kann durch die Deletion eines einzigen Gens ermittelt werden. Eine relativ einfache genetische Manipulation, die zur Inaktivierung der 4'-PPTase führt, ermöglicht die Evaluierung der Funktion eines großen Teilbereichs des Sekundärmetabolismus.

Welche Bedeutung dabei Produkten von PKS/NRPS in den einzelnen Lebens- bzw. Infektionsphasen zukommt, kann u. U. durch die Zugabe verfügbarer PK oder NRP, d. h., mittels chemischer Komplementation, untersucht werden. Im Rahmen dieser Vorgehensweise lassen sich wertvolle Daten für die Grundlagenforschung gewinnen, die aber auch für eine Bewertung der fungalen PPTase als potentiell Target für fungizide Wirkstoffe oder Silencing-Strategien verwendet werden können (Nowara, 2008).

IV.3.2 Charakterisierung von *CgPPT1*

IV.3.2.1 Isolierung, Expressionsanalyse und *in vitro* 4'-Phosphopantetheinylierung

Die Aminosäuresequenz von Sfp-PPTasen zeichnet sich selbst bei phylogenetisch nah verwandten Arten durch einen geringen Konservierungsgrad aus. So sind die Aminosäuresequenzen der Sfp-PPTasen aus *M. oryzae*, *A. nidulans* bzw. *S. cerevisiae*, verglichen mit *CgPPT1* aus *C. graminicola*, lediglich zu 54, 32 bzw. 20 Prozent identisch. Außerdem erlauben konservierte Sequenzmotive von nur wenigen Aminosäuren Länge keine Ableitung degenerierter Primer, mit deren Hilfe die PCR-Amplifizierung zumindest eines Sequenzfragments möglich wäre. Da die Genomsequenz von *C. graminicola* zum Beginn dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung stand, wurde *CgPPT1* durch genetische Komplementation der *Saccharomyces cerevisiae* $\Delta lys5$ -Deletionsmutante isoliert. Untersuchungen zeigten, dass die konstitutive *CgPPT1*-Expression in *lys5*-defizienter Hefe den Wildtyp-Phänotyp wiederherstellt (Graf, 2004). Zur detaillierten Charakterisierung der 4'-PPTase aus *C. graminicola* wurde nach der Isolierung des *CgPPT1*-Promoterbereichs zunächst ein *CgPPT1:eGFP*-Reporterkonstrukt stabil in das Genom des Wildtyps integriert. Infektionsstudien an Maisblättern und Zwiebelepidermen wiesen GFP-Fluoreszenz in allen vitalen Pilzstrukturen und zu jedem untersuchten Zeitpunkt der Infektion nach. Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf eine konstitutive Expression von *CgPPT1* im Verlauf der Pathogenese und betonen die zentrale Rolle des Enzyms im fungalen Stoffwechsel.

Die Verwendung unpigmentierter Zwiebelepidermen, die als Häutchen bestehend aus einer Zellschicht präpariert werden, ermöglicht die Aufnahme qualitativ hochwertiger und sehr detaillierter Mikroskopbilder intrazellulärer Pilzstrukturen. Dabei entfällt die Notwendigkeit der Kontrastierung durch Färbetechniken, deren Anwendung zur Aus-

bildung von Artefakten führen kann. Die Infektion von Zwiebelepidermen stellt ein etabliertes Modellsystem in der Wirt-Parasit-Interaktionsforschung dar. *C. graminicola* ist in der Lage, einen vollständigen Entwicklungszyklus in infizierten Zwiebelepidermen zu durchlaufen.

Nachdem die Funktionalität der isolierten PPTase aus *C. graminicola* bereits in *S. cerevisiae* nachgewiesen wurde, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die direkte Bestätigung des Transfers von Phosphopantetheinyl zur ACP-Domäne der Polyketidsynthase CgPKS1 sowie die kovalente Verknüpfung der prosthetischen Gruppe mit einem konservierten Serin durch die katalytische Wirkung von CgPPT1. Dazu wurde in *E. coli* exprimierte und gereinigte *C. graminicola*-PPTase im zellfreien Ansatz mit CgPKS100, der 100 Aminosäuren großen ACP-Domäne von CgPKS1 sowie CoA-488 inkubiert. Ein erfolgreicher PP-Transfer konnte durch die Größenverschiebung des phosphopantetheinylierten CgPKS100 im SDS-Gel sowie die Fluoreszenzdetektion des markierten Reaktionsprodukts nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis wurde durch vergleichende MALDI-TOF Analysen unmodifizierter und phosphopantetheinylierter Fragmente von CgPKS100 bestätigt. Untersucht wurde dabei ein tryptisches CgPKS100-Fragment (CgPKS31, 31 As), welches das konservierte DSL-Phosphopantetheinylierungsmotiv enthielt (Yin *et al.*, 2005). Für Markierungsreaktionen von CgPKS100, deren Erfolg mittels MALDI-TOF bzw. MALDI-TOF/TOF bestätigt werden konnte, erfolgte die Verwendung von Biotin-CoA als Substrat, da die chemische Struktur des Fluoreszenzfarbstoffs Atto-488 vom Hersteller bisher nicht offengelegt wurde.

Die Resultate von Hefe-Komplementation, biochemischen Untersuchungen und Interaktionsstudien zeigen, dass CgPPT1 in der Lage ist, PP-abhängige Enzyme durch die Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe zu aktivieren. Die gewonnenen Daten stimmen mit den Ergebnissen weiterer Untersuchungen zur Funktionsweise von Sfp-PPTasen, darunter CfwA aus *A. nidulans*, überein (Neville *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005; Marquez-Fernandez *et al.*, 2007).

IV.3.2.2 Deletionsmutagenese und phänotypische Charakterisierung

Die gezielte Inaktivierung von Genen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden, verbunden mit der phänotypischen Charakterisierung der generierten Deletionsmutanten, gehört zu den erfolgreichsten Strategien bei der Aufklärung von Genfunktionen (Giaever *et al.*, 2002; Moerman & Barstead, 2008). Eine Vielzahl von Pathogenitäts- bzw. Virulenzgenen phytopathogener Pilze konnte bisher auf diese Weise identifiziert werden, wodurch ein besseres Verständnis der Vorgänge von Wirt-Parasit-Interaktionen auf molekularer Ebene ermöglicht wurde (Idnurm & Howlett, 2001, Jeon *et al.*, 2007).

Ein zentraler Teil des *CgPPT1*-ORF wurde mittels homologer Rekombination durch ein Markergen, die Hygromycin-Phosphotransferase aus *E. coli*, ersetzt. Die Bestätigung der erfolgreichen Gendeletion erfolgte sowohl in Southern-Analysen als auch auf Ebene der Transkription mittels RT-PCR.

Untersuchungen zur Auswirkung der *CgPPT1*-Inaktivierung auf das vegetative Hyphenwachstum wurden zunächst unter Verwendung definierter Kulturmedien durchgeführt. Die generierten $\Delta Cgpp1$ -Mutanten waren auxotroph für die Aminosäure Lysin, d. h., Wachstum in lysinfreiem Medium konnte nicht beobachtet werden. In Medien mit zugesetztem Lysin erreichten die Deletionsmutanten jedoch eine dem Wildtyp vergleichbare Wachstumsgeschwindigkeit. Die Ursache der Lysin-Auxotrophie liegt in der fehlenden Aktivierung der α -Aminoacidat-Reduktase *CgAAR*, einem Gen mit essentieller Funktion in der fungalen Lysinbiosynthese (Xu *et al.*, 2007).

Die Unfähigkeit von $\Delta Cgpp1$ zum Wachstum in lysinfreiem Medium wurde in die experimentelle Planung der genetischen Komplementation von $\Delta Cgpp1$ einbezogen. Protoplasten der Deletionsmutante wurden mit einem PCR-Fragment, das den *CgPPT1*-ORF, etwa 1,2 kb Promoterregion des Gens sowie den *trpC*-Terminator aus *A. nidulans* umfasste, transformiert und anschließend auf definiertem Selektionsmedium ohne Lysin ausplattiert. Sämtliche erhaltenen Isolate wiesen sowohl eine Integration von *CgPPT1* als auch die phänotypische Identität des Wildtyps auf. Eine ähnliche Strategie führte bereits zur erfolgreichen Isolierung von *CgPPT1* (Graf, 2003).

CgPPT1 wäre folglich ein geeigneter Selektionsmarker mit dem Vorteil der Restauration des Wildtyp-Zustands gegenüber der Expression eines Fremdgens bei der Verwendung klassischer pilzlicher Transformationsmarker. Allerdings produziert $\Delta Cgpp1$ ausschließlich in Flüssigmedium relativ geringe Mengen der für die Proto-

plastierung und Transformation notwendigen Konidien. Daher stellen andere Enzyme der fungalen Lysinsynthese, wie z. B. Homoaconitase oder Saccharopin-Reduktase vermutlich geeignetere Selektionsmarker dar.

Sekretierte Eisenchelatoren, sogenannte Siderophore, werden von pilzlichen NRPS synthetisiert und dienen der Versorgung mit essentiellen Eisenionen. Die Auswirkungen der *CgPPT1*-Deletion auf die Fähigkeit zur Mobilisierung von Eisen sollte in Kulturmedien mit komplexierten Fe^{3+} -Ionen untersucht werden. Dazu wurde den verwendeten Medien Bathophenanthrolindisulfonat (BPS) zugesetzt. BPS komplexiert Fe^{3+} -Ionen und kann darüber hinaus von Zellen nicht aufgenommen werden. $\Delta Cgppt1$ zeigte keinerlei vegetatives Wachstum in Medium mit 50 mM BPS. Dieser inhibitorische Effekt konnte durch die Zugabe von kommerziell erworbenem Coprogen, einem weit verbreiteten fungalen Siderophor, fast vollständig aufgehoben werden. Vermutlich stellt sich zwischen BPS und dem äquimolar vorhandenen Coprogen ein Verteilungsgleichgewicht komplexierter Eisenionen ein, so dass aufgrund der hohen Fe^{3+} -Affinität von Coprogen ausreichend biologisch verfügbare Eisenionen vorhanden sind.

HPLC-Analysen extrahierter Kulturüberstände bzw. Myzelfractionen wiesen anhand von Referenzsubstanzen die sekretierten Siderophore Coprogen B und 2-*N*-methylcoprogen B sowie das hauptsächlich intrazellulär vorkommende Ferricrocin nach. Hierbei handelt es sich um die erste Beschreibung von Siderophoren aus *C. graminicola*. Verwandte Ascomyceten synthetisieren strukturell identische bzw. ähnliche Siderophore (Haas *et al.*, 2008).

Ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit zur Produktion von Siderophoren und der Stresstoleranz phytopathogener Pilze gegenüber ROS wurde bereits in Wirt-Parasit-Interaktionssystemen untersucht. Das Wachstum von *C. heterostrophus* $\Delta nps6$, einer Deletionsmutante mit defizienter Coprogensynthese, war in Medien mit KO_2 und H_2O_2 im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Oide *et al.*, 2006). Ähnliche Resultate erzielten Hof *et al.* (2009) durch die Deletion des Coprogen-Synthasegens *SSM2* bzw. durch die gezielte Inaktivierung des Gens für die *L*-Ornithin-N5-Monooxygenase *OMOI* in *M. oryzae*. Das *OMOI*-Genprodukt katalysiert die Hydroxylierung von *L*-Ornithin, eine Voraussetzung für die Synthese aller Siderophore des Reispathogens *M. oryzae*. Tatsächlich konnte auch für $\Delta Cgppt1$ -Isolate von *C. graminicola* im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber H_2O_2 und Superoxid-Radikalen nachgewiesen werden.

Von besonderem Interesse waren die Auswirkungen der *CgPPT1*-Deletion auf die Pathogenität von *C. graminicola*. Zahlreiche Parameter, die den Infektionsverlauf beeinflussen, wurden daher eingehend analysiert. Ein erster entscheidender Punkt war dabei die Frage nach der Keimfähigkeit der produzierten Konidien. Obwohl die ausschließlich in Flüssigkultur gebildeten $\Delta Cgppt1$ -Konidien sich morphologisch deutlich von Wildtyp-Konidien unterschieden, zeigten quantitative Analysen der Keimfähigkeit keine signifikanten Unterschiede zur Keimrate von Wildtyp-Konidien. Sporulationsdefekte auf solidem Medium als Folge der Deletion eines fungalen 4'-PPTase-Gens konnten bereits Marquez-Fernandez *et al.* (2007) nachweisen. Die asexuelle Sporenproduktion PPTase-defizienter Isolate ($\Delta cfwA$) von *Aspergillus nidulans* war drastisch reduziert. Allerdings liegen keine Daten zur Sporulation in Flüssigmedien sowie zur morphologischen Charakterisierung der Konidien vor. Die Deletion der L-Ornithin-N5-Monooxygenase *OMO1* in *M. oryzae* resultierte in Siderophor-defizienten Isolaten, die nicht in der Lage waren, asexuelle Sporen zu produzieren. Coprogen-defiziente $\Delta ssm2$ -Isolate wiesen dagegen nur eine reduzierte Anzahl asexueller Sporen auf (Hof *et al.*, 2009). Die beobachteten *in vitro* Sporulationsdefekte sind somit vermutlich auf fehlende NRPS-Produkte zurückzuführen.

Ein besonders kritischer Punkt im Infektionszyklus von *C. graminicola* ist die Penetration der Wirtsepidermis durch das Appressorium. Die Differenzierung funktionaler Appressorien entscheidet schon in der ersten Phase der Interaktion über Erfolg oder Misserfolg der Infektion (Deising *et al.*, 2000).

Untersuchungen zur Appressoriendifferenzierung auf artifiziellen und natürlichen Oberflächen zeigten, dass die Anzahl der gebildeten $\Delta Cgppt1$ -Appressorien dramatisch reduziert war. Darüber hinaus lysierte ein Teil der Appressorien, wobei der cytoplasmatische Inhalt freigesetzt wurde. Erfolgreiche Penetrationen der Wirtsepidermis konnten bei Infektionsversuchen mit $\Delta Cgppt1$ nicht beobachtet werden, $\Delta Cgppt1$ -Isolate sind demzufolge apathogen. Dagegen konnten verletzte Blätter durch $\Delta Cgppt1$ besiedelt werden. Dabei wurden antikline Zellwände durchbrochen, was auf unterschiedliche Mechanismen bei der initialen Penetration der Epidermiszelle und dem Durchbruch in benachbarte Zellen hindeutet.

Ein weiteres Merkmal der $\Delta Cgppt1$ -Infektion verletzter Blätter war das Fehlen der charakteristischen Symptome. Obwohl die relative Quantifizierung der fungalen Biomasse fünf Tage nach der Inokulation verletzter Maisblätter eine signifikante Besiedelung des Pflanzengewebes durch $\Delta Cgppt1$, d. h., etwa 50 Prozent der fungalen Biomasse im

Vergleich zur CgM2-Infektion verletzter Blätter bzw. etwa 70 Prozent, verglichen mit der CgM2-Infektion unverletzter Blätter, ergab, konnten auf der Blattoberfläche nur schwache Chlorosen beobachtet werden. Diese Art der symptomlosen Interaktion erinnert an eine endophytische Lebensweise, bei der latente Pilzinfektionen ohne negative Folgen für die betroffene Pflanze bleiben (Carroll, 1988). Möglicherweise verursachen toxische Syntheseprodukte von PKS oder NRPS die charakteristischen Anthraknose-Symptome, die während der nekrotrophen Phase der Wildtyp-Infektion sichtbar werden.

Der Infektionszyklus von *C. graminicola* findet seinen Abschluss in der Produktion großer Mengen asexueller Sporen, die in speziellen Sporenlagern auf der Blattoberfläche gebildet werden. Der fast vollständige Verlust der Fähigkeit zur Konidiogenese war nicht allein auf *in vitro* Kulturen von $\Delta Cgppt1$ beschränkt, sondern konnte auch in Infektionsversuchen nachgewiesen werden. Verletzte Maisblätter wurden zwar durch $\Delta Cgppt1$ besiedelt, allerdings endete diese Entwicklung stets in der initialen Phase der Konidiogenese. Angelegt wurden lediglich Acervuli-Primordien, d. h., Hyphen aggregierten und bildeten zahlreiche kugelförmige Abschnürungen, welche das Endstadium der Entwicklung markierten.

Eventuell spielen, wie von Marquez-Fernandez *et al.* (2007) vermutet, PKS- oder NRPS-Produkte eine wichtige Rolle für den Eintritt in die Konidiogenese. Untersuchungen zur Sporulation *in vitro* (s. oben) weisen auf fehlende Siderophore als Ursache der gestörten Konidiogenese hin. Eine ungenügende Versorgung mit Lysin könnte *in vivo* durchaus eine Rolle spielen, obwohl Lysinkonzentrationen von 0,12 mM in Maisblättern bzw. 0,29 mM in Plastiden (Chapman & Leech, 1979) nicht unbeträchtlich erscheinen. Gegen einen Zusammenhang von Lysinmangel und ausbleibender Sporulation spricht aber auch die Tatsache, dass ausreichend (50 µg/ml) Lysin in den Medien der *in vitro* Versuche vorhanden war, ohne dass dies einen positiven Effekt auf die Konidiogenese ausgeübt hätte.

IV.3.3 Deletion der *M. oryzae* Sfp-PPTase

Die Bedeutung der Sfp-PPTase als Virulenz- bzw. Pathogenitätsfaktor phytopathogener Ascomyceten sollte in einem weiteren Wirt-Parasit-Interaktionssystem untersucht werden. Ausgewählt wurde dazu der Ascomycet *Magnaporthe oryzae*, da dieses Reis-

pathogen als molekularbiologisch gut zugängliches und ausführlich charakterisiertes Forschungsobjekt auch wirtschaftlich eine bedeutende Rolle spielt (Talbot, 2003).

Der *MoPPT1*-ORF wurde mittels homologer Rekombination durch ein Markergen, die Hygromycin-Phosphotransferase aus *E. coli*, ersetzt. Die Bestätigung der erfolgreichen Gendeletion erfolgte mittels Southern-Analyse.

Der sichtbare Phänotyp der Δ *Moppt1*-Isolate war durch das Fehlen von Melanin gekennzeichnet. Im Gegensatz zu PPTase-defizienten Isolaten von *C. graminicola* bildete Δ *Moppt1* auch in Flüssigmedium keine Konidien. Infektionsversuche wurden daher mit vegetativem Myzel durchgeführt.

Untersuchungen zur Auswirkung der *MoPPT1*-Inaktivierung zeigten, dass die 4'-PPTase ein Pathogenitätsfaktor für *M. oryzae* ist. Verletzte und unverletzte Reisblätter wiesen sieben Tage nach der Inokulation mit Δ *Moppt1* keine sichtbaren Symptome auf. Obwohl die Daten der phänotypischen Charakterisierung von Δ *Moppt1* weitaus weniger umfangreich sind als die entsprechenden Daten der PPTase-defizienten *C. graminicola*-Isolate, wurden deutliche Parallelen hinsichtlich des Verlusts essentieller Fähigkeiten sichtbar. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da beide Phytopathogene identische Strategien verfolgen, in denen melanisierten Appressorien eine Hauptrolle bei der Infektion des Wirts zukommt. Ob 4'-PPTasen ein allgemeiner Faktor der fungalen Pathogenität sind, kann anhand der gewonnenen Erkenntnisse nicht mit Sicherheit gesagt werden. Dafür sprechen aber die beobachteten pleiotropen Effekte, die nicht nur die Wirtspenetration, sondern auch die Auxotrophie für Lysin, die Mobilisierung von komplexiertem Eisen sowie die Bildung von Konidien umfassen.

IV.4 Metabolitanalyse

IV.4.1 Metabolite aus Ascomyceten der Gattung *Colletotrichum*

Etwa 50 unterschiedliche Metabolite wurden bisher aus verschiedenen Vertretern der Gattung *Colletotrichum* isoliert und charakterisiert (Garcia-Pajon & Collado, 2003). Diese Zahl erscheint gering angesichts der zahlreichen Species und der signifikanten ökonomischen Bedeutung von phytopathogenen Vertretern der Gattung.

C. gloeosporioides produziert neben Aspergillomarasmin A und B (Bousquet *et al.*, 1971) und den Inhibitoren der Konidienkeimung Gloeosporone (Meyer *et al.*, 1983), (*E*)- und (*Z*)-3-ethyliden-1,3-dihydroindol-2-on sowie (2*R*)-(3-indolyl)-propionsäure (Tsurushima *et al.*, 1995) auch als phytotoxisch beschriebene Substanzen, wie z. B. Phenoxyessigsäure und Indol-3-essigsäure (Hirota *et al.*, 1992), Diketopiperazin und Ferricrocin (Ohra *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte mit Colletotrinsäure auch ein antibakterieller Wirkstoff identifiziert werden (Zou *et al.*, 2000).

Unter den bekannten Metaboliten aus *C. capsici* befinden sich Verbindungen wie Colletodiol, ein vierzehngliedriges Makrodiolid mit immunsuppressiven Eigenschaften (MacMillan & Simpson, 1973; Fujimoto *et al.*, 1998) sowie Colletodiolderivate mit z. T. antibakterieller Wirkung (Ronald & Gurusiddaiah, 1980).

Das Metabolitspektrum von *C. nicotianae* wurde verhältnismäßig ausführlich analysiert. So konnten zahlreiche phytotoxische Substanzen, darunter Colletochlorin A-D, Colletotrichin A-C und Colletopyron identifiziert werden (Garcia-Pajon & Collado, 2003 und Zitate darin).

Weitere Metabolite, wie z. B. 5,4-dihydroxy-3,7,8-trimethoxy-6*C*-methylflavon und 5,4-dihydroxy-3,6,7-trimethoxy-8*C*-methylflavon aus *C. dematium* (Abou-Zaid *et al.*, 1997), *meso*- und *D*(-)-butan-2,3-diol, 2-hydroxymethylhexa-2,4-dienol sowie Colletruncoinsäuremethylester aus *C. truncatum* (Stoessl & Stothers, 1986) und das Antiauxin 2-pyruvylaminobenzamid aus *C. lagenarium* (Kimura *et al.*, 1973) wurden ebenfalls isoliert und charakterisiert.

IV.4.2 Metabolite aus *Colletotrichum graminicola*

Die Sekretion von Stoffwechselprodukten ermöglicht es Pilzen, Einfluss auf ihre unmittelbare Umgebung zu nehmen. Einerseits stehen sekretierte Toxine, Enzyme und Chelatoren im Dienste der Gewinnung von Nährstoffen und Spurenelementen, andererseits inhibieren toxische Produkte Nahrungskonkurrenten und Fressfeinde. Ausgeschieden werden aber auch Endprodukte des Stoffwechsels (Keller *et al.*, 2005). Nicht zuletzt kommunizieren Pilze mit Hilfe sekretierter Substanzen (Schachtschabel *et al.*, 2008).

Bisher führten Analysen von Metaboliten aus *C. graminicola* lediglich zur Identifizierung von Mycosporin-Alanin, einem Inhibitor der Sporenkeimung im Acervulus

(Leite & Nicholson, 1992). Daher sollten umfassendere Untersuchungen zur Identität und Funktion der sekundären Verbindungen aus *C. graminicola* durchgeführt werden. Metabolite aus dem Kulturüberstand einer axenischen *C. graminicola*-Kultur wurden durch die Extraktion mit Ethylacetat und die Anwendung chromatographischer Verfahren isoliert. Die Strukturen unbekannter Substanzen wurden anschließend mit Hilfe von NMR-Messungen bestimmt. Dabei konnten insgesamt 15 Metabolite identifiziert werden, von denen fünf bisher unbekannte Verbindungen darstellen.

Himanimid C wurde erstmalig am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF, Kaiserslautern) aus dem Basidiomyceten *Serpula himantoides*, einem Braunfäuleerreger an Gymnospermen, isoliert. Der Nomenklatur chemischer Verbindungen folgend, stellt Himanimid C ein Maleimid-Derivat dar.

Die isolierte Reinsubstanz zeigte in Standard-Testsystemen eine deutliche fungizide Wirkung gegenüber *Alternaria porri*, *Aspergillus ochraceus* und *Pythium irregulare* (MIC 25 µg/ml) sowie fungistatische Effekte gegenüber *Absidia glauca*, *Cladosporium cladosporioides*, *Curvularia lunata*, *Zygorhynchus moelleri*, *Nadsonia fulvescens* und *Saccharomyces cerevisiae*. Zusätzlich wurden moderate bis schwache antibakterielle Eigenschaften gegenüber gram-positiven Bakterien nachgewiesen (Aqueveque *et al.*, 2002). Diese Resultate konnten in einer weiteren Studie jedoch nicht bestätigt werden. Synthetisches Himanimid C und Strukturanaloga zeigten in dem verwendeten Testsystem keinerlei fungizide Wirkung gegenüber phytopathogenen Pilzen. Darüber hinaus wurde die Verbindung innerhalb von 24 Stunden fast vollständig metabolisiert (Sells, 2005). Der Grund für diese stark abweichenden Resultate liegt in der Verwendung unterschiedlicher Testsysteme.

Mit der Isolierung von Himanimid C aus Überständen einer axenischen *C. graminicola*-Kultur konnte erstmals ein Ascomycet als Produzent dieser Substanz identifiziert werden.

2-Phenylethanol ist eine relativ einfach strukturierte Verbindung, die im Kulturüberstand zahlreicher Pilze vorkommt. Die synthetisierte Substanz findet Verwendung als industrieller Duftstoff (Etschmann *et al.*, 2002).

Pilzkulturen in Nährmedien mit Phenylalanin als Stickstoffquelle erzeugen Produktmengen von bis zu 3,8 g 2-Phenylethanol je Liter Kulturmedium (Albertazzi *et al.*, 1994; Serp *et al.*, 2003).

2-Phenylethanol bewirkt *in vitro* eine signifikante Reduktion des Wachstums von *Phellinus tremulae*, dem Verursacher der Weißfäule an Espen (Trifonov *et al.*, 1992).

Lingappa *et al.* (1969) beschreiben 2-Phenylethanol als Autoantibiotikum für *Candida albicans*. Allerdings erreicht diese volatile Verbindung vermutlich nur unter artifiziellen Fermentationsbedingungen inhibitorische Konzentrationen.

Rostpilze des *Puccinia monoica*-Komplexes infizieren Pflanzen der Gattung *Brassicaceae*. Nach der erfolgreichen Besiedlung des Wirts bilden Hyphenstrukturen des Pathogens auf der Pflanze sogenannte Pseudoblüten, die leicht flüchtige Substanzen, darunter 2-Phenylethanol, sekretieren. Dadurch angelockte Insekten verbreiten die Sporen des Pathogens und erschließen somit neue Wirte bzw. transportieren Gameten für die sexuelle Fortpflanzung (Raguso & Roy, 1998). Es bleibt jedoch ungeklärt, in welchem Umfang strukturelle Mimikry und sekretierte Duftstoffe zur Attraktivität der Pseudoblüten beitragen.

Indol-3-essigsäure (IES) ist eine heterozyklische Verbindung und besteht aus einem Benzol- und Pyrrolring, die zusammen das Indolgrundgerüst bilden. Die natürliche Synthese verläuft wahrscheinlich hauptsächlich über die enzymatische Desaminierung der Aminosäure Tryptophan (Glawischnig *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2001).

IES und strukturell verwandte Auxine bewirken in ihrer Funktion als Phytohormone u. a. Apikaldominanz, Zellstreckungswachstum, Fruchtreife, Blattseneszenz und Zellteilung (Fawcett, 1961; Robinson *et al.*, 1998; Woodward & Bartel, 2005; Guilfoyle, 2007). Darüber hinaus reguliert IES die Entwicklung von Wurzelhaaren und Seitenwurzeln (Casimiro *et al.*, 2001). Auxine werden von zahlreichen pflanzenassoziierten Mikroorganismen produziert. Die mikrobielle IES-Synthese in axenischen Kulturen ist jedoch häufig von exogen zugeführtem Tryptophan abhängig (Tuomi *et al.*, 1993; Furukawa *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 1997).

In der mutualistischen Interaktion zwischen *Trichoderma virens* und haarwurzelloser *rhd6*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die eine Störung der IES-Signaltransduktion aufweisen, komplementiert die Besiedelung der Pflanze durch *T. virens* den Mutantenphänotyp. Die Interaktion zwischen Wildtyp *A. thaliana* und *T. virens* bewirkt außerdem eine leichte Erhöhung der pflanzlichen Biomasseproduktion. Dieser Zuwachs entfällt, wenn Auxin-Transportmutanten durch *T. virens* besiedelt werden. Möglicherweise sind von *T. virens* produzierte Auxine für diesen Effekt verantwortlich (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009). Es bleibt jedoch unklar, ob tatsächlich pilzliche Auxine eine erhöhte Biomasseproduktion bewirken oder andere Einflüsse eine Rolle spielen.

Auxine sind in Pflanzen neben ihren vielfältigen Funktionen auch an der Pathogenabwehr beteiligt (Noel *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2006). Phytopathogene könnten diese Abhängigkeit nutzen und durch die *in planta* Synthese hochwirksamer Auxine die Steuerung der pflanzlichen Abwehr beeinflussen.

Während der Infektion von *Aeschynomene virginica* durch das hemibiotrophe Pathogen *C. gloeosporioides* erreicht die IES-Konzentration ein Maximum in der biotrophen Phase der Wirt-Parasit-Interaktion (Maor *et al.*, 2004). Es liegen jedoch keine Ergebnisse über die Herkunft der IES vor, so dass eine pflanzliche Synthese von IES als Reaktion auf die Infektion genauso wahrscheinlich ist, wie eine IES-Synthese durch das Pathogen.

Darüber hinaus sind einfache Schlussfolgerungen in komplexen Wirt-Parasit-Beziehungen oftmals nicht möglich. Pflanzliche IES-Synthese als Reaktion auf eine Pathogeninfektion kann einerseits auf eine wichtige Bedeutung von Auxin im Rahmen der pflanzlichen Abwehrreaktion hindeuten, andererseits könnte die Ursache erhöhter IES-Produktion aber auch in der pathogeninduzierten Modifikation des Wertsstoffwechsels liegen.

Eine sinnvolle Strategie zur Untersuchung der Bedeutung von IES für fungale Pathogene besteht in der Deletion von Genen der IES-Synthese. Im Maispathogen *Ustilago maydis* wurden Gene deletiert, die an der Auxinsynthese beteiligt sind. Dadurch konnten Mutanten mit stark reduzierter IES-Produktion erzeugt werden. Obwohl in Maisblättern, die mit diesen Deletionsmutanten infiziert wurden, deutlich reduzierte Auxinkonzentrationen auftraten, war die qualitative und quantitative Ausbildung von Tumoren unverändert (Reineke *et al.*, 2008).

Pythium aphanidermatum verursacht an *Agrostis palustris* und weiteren Gräsern als Pythium Red Blight bezeichnete Symptome, die zum Absterben der gesamten Pflanze führen. Identische Symptome konnten durch das Besprühen von Blattspreiten mit synthetischer IES in einer Konzentrationen von 1 g/l generiert werden (Shimada *et al.*, 2000). Obwohl *Pythium aphanidermatum* IES *in vitro* produziert, fehlt der Nachweis, dass Konzentrationen ähnlicher Höhe tatsächlich im Verlauf der Interaktion *in planta* erreicht werden. Darüber hinaus wurde die herbizide Wirkung von Auxinen bereits ausführlich beschrieben (Grossmann, 2000; Grossmann *et al.*, 2001).

Genetische Manipulationen an *Fusarium oxysporum* und *F. arthrosporioides* zur Erhöhung der IES-Produktion führten zu Hypervirulenz gegenüber dem obligaten Phytoparasiten *Orobanche aegyptiaca* (Cohen *et al.*, 2002). Die Autoren dieser Studie

konnten damit zumindest indirekt nachweisen, dass IES ein Virulenzfaktor für beide *Fusarium*-Species in der Interaktion mit *O. aegyptica* ist. Interessant wären in diesem Zusammenhang zusätzliche Untersuchungen mit Isolaten, die eine reduzierte IES-Produktion aufweisen.

Die Bedeutung von IES und den strukturell verwandten Auxinen als Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor phytopathogener Pilze ist schwer abzuschätzen. Obwohl vermutlich die überwiegende Mehrheit phytopathogener Pilze Auxine synthetisieren kann, scheinen diese Wirkstoffe nicht generell für eine stabile Etablierung der Wirt-Parasit-Interaktion notwendig zu sein. Da Auxine potentiell in unterschiedlichen und unabhängigen Synthesewegen gebildet werden können, sind multiple Gendelektionen in Pilzen notwendig, um Auxin-defiziente Mutanten zu generieren (Bartel, 1997; Normanly, 1997; Spaepen *et al.*, 2007).

Hohe Auxinkonzentrationen in Kulturmedien spiegeln nicht unbedingt die biologische Relevanz dieser Verbindungen wieder. Vielmehr könnte dies ein Ausdruck des Tryptophanüberangebots in Kulturmedien sein.

Tryptophol bzw. Indol-3-ethanol ähnelt strukturell IES. Die Biosynthese verläuft vermutlich analog zur IES-Synthese über Tryptophan und die Intermediate Indol-3-pyruvat und Indol-3-acetaldehyd. Von Indol-3-aldehyd ausgehend, entsteht die entsprechende Säure durch Oxidation, während durch einfache Reduktion Tryptophol gebildet wird (Kaper & Veldstra, 1958; Glawischnig *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1978). Tryptophol wurde gemeinsam mit IES in den Kulturüberständen von zahlreichen Mikroorganismen nachgewiesen (Erdogan *et al.*, 2000; Rosazza *et al.*, 1973; Rey *et al.*, 2001).

Colletotrichum acutatum, der Verursacher von Anthraknose an *Fragaria ananassa* und anderen Kulturpflanzen, produziert eine ganze Reihe von Indolderivaten, darunter Tryptophol, sofern Tryptophan im Medium vorhanden ist. Die biologische Funktion der Substanz ist jedoch unklar (Shilts *et al.*, 2005).

Eine Reihe weiterer Wirkungen und Effekte von Tryptophol sind in der Literatur dokumentiert. So beschreiben Lingappa *et al.* (1969) Tryptophol als Autoantibiotikum für *Candida albicans*.

Eine schwache Auxinwirkung der Verbindung konnte experimentell bestätigt werden. So förderte Tryptophol in geringem Umfang das Wachstum der Alge *Chlorogloea fritschii* in Konzentrationen von 10^{-7} und 10^{-8} M (Ahmad & Winter, 1970).

In *S. cerevisiae*-Kulturen bewirkt Tryptophol als Signalsubstanz die Umstellung auf filamentöses Wachstum (Chen & Fink, 2006).

Darüber hinaus sind phytotoxische Eigenschaften von Tryptophol gegenüber *Sorghum vulgare*, *Hordeum vulgare*, *Poa annua*, *Cirsium arvense* und *Galium aparine* (Sugawara & Strobel, 1987) sowie antibakterielle Eigenschaften gegenüber grampositiven Bakterien beschrieben (Buckingham, 1994).

Tyrosol bzw. 4-Hydroxyphenylethanol ist eine phenolische Substanz, die im Kulturüberstand zahlreicher Pilze vorkommt (Guzman-Lopez *et al.*, 2007; Rukachaisirikul *et al.*, 2007; Sumarah *et al.*, 2008).

Tyrosol entsteht in *S. cerevisiae* als Abbauprodukt der Aminosäure Tyrosin (Sentheshanmuganathan & Elden, 1958). Fuganti *et al.* (1996) konnten in biochemischen Analysen von Stoffwechselprodukten des Ascomyceten *Beauveria bassiana* eine PKS-abhängige Synthese von Tyrosol nachweisen. Da Kulturfiltrate von CgM2 und PPTase-defizienter Mutante gleichermaßen Tyrosol enthielten, verläuft die Tyrosolsynthese im Metabolismus von *C. graminicola* aber vermutlich über den Shikimatweg (Herrmann & Weaver, 1999).

Als Signalmolekül fördert Tyrosol den Übergang vom Hefestadium zum filamentösen Wachstum in *Candida albicans*-Kulturen (Alem *et al.*, 2006).

Die biologische Funktion der Verbindung in filamentösen Pilzen ist unbekannt, möglicherweise vermittelt Tyrosol Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies. Die antioxidativen Eigenschaften von Tyrosol wurden wiederholt experimentell nachgewiesen. Besonders hohe Tyrosolkonzentrationen enthalten u. a. Olivenöl und Weißwein (Giovannini *et al.*, 1999; Mateos *et al.*, 2003).

Im Rahmen der erfolgreichen chemischen Synthese von **Orcinol** bzw. 1,3-Dihydroxy-5-methylbenzen aus Acetateinheiten (Collie & Myers, 1893) wurde der Begriff (Poly-)Ketid durch J. N. Collie geprägt: „...they should be placed in a new class called polyketides. Its members being characterized by the repetitive occurrence of a -CH₂-CO- ‘motif’, which he named ketide” (Bentley & Bennett 1999; Staunton & Weissman, 2001).

Orcinol wird in filamentösen Pilzen wahrscheinlich als Ausgangsverbindung für die Synthese komplexer Polyketide verwendet (Martin *et al.*, 1972; Verachtert & Hanssens, 1975; Packter, 1969).

Colletochinon A und **Colletochinon B** sind strukturell sehr ähnliche Anthrachinone, die sich lediglich durch ihren Substituenten, eine Hydroxy- (A) bzw. Methoxy-Gruppe

(B) an Position zwei der Anthracen-Grundstruktur unterscheiden. Die Struktur der Verbindung Colletochinon B wurde erstmalig 1981 als Produkt der Reaktion von 3-chloro-5,6,7-trimethoxynaphthochinon mit dem Vinylketen-Acetal 1-methoxy-3-methyl-1-(trimethylsiloxy)-1,3-butadien und anschließender Pyrolyse bei 120°C beschrieben (Roberge & Brassard, 1981). Die biologische Funktion der beiden Verbindungen ist unbekannt.

Die Verbindung **Colletoanthron A** ist ein chloriertes 10-Hydroxyanthron. Eine strukturell ähnliche Substanz wurde aus Kulturüberständen von *Phialophora alba* gewonnen. Die Isolierung des Pilzes erfolgte dabei aus Espenholz, das nicht von phytopathogenen Pilzen infiziert war. Ein Teil der identifizierten *P. alba*-Metabolite zeigte in Wachstumsstudien fungizide Aktivität gegenüber dem Espen-Feuerschwamm *Phellinus tremulae*. So bewirkten zwei von vier isolierten Anthrachinon- bzw. 10-Hydroxyanthron-Verbindungen eine Wachstumshemmung des Pilzes (Ayer & Trifonov, 1994). Die *in vitro* eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen von etwa 1mg/ml erscheinen jedoch sehr hoch und werden vermutlich in der Pflanze nicht erreicht.

Die Pyronderivate **Colletopyron B** und **Colletopyron C** wurden bisher in der Fachliteratur nicht beschrieben. Strukturell ähnliche Verbindungen konnten aus dem mykoparasitischen Pilz *Cladobotryum varium* isoliert werden. Derivate mit einer Formylgruppe am C5-Atom der Pyrongrundstruktur zeigten eine signifikante inhibitorische Wirkung gegenüber dem Basidiomyceten *Ganoderma lucidum* (Tezuka *et al.*, 1994).

Colletolacton A ist ein bisher nicht beschriebenes elfgliedriges Makrolacton. Strukturell verwandte Sekundärmetabolite, wie z. B. Zearalenon aus *Gibberella zeae* (Zhou *et al.*, 2008), Radicol aus *Cylindrocarpon radicolica* (Evans & White, 1966) oder Pochonin aus *Pochonia chlamydosporia* (Hellwig *et al.*, 2003) mit vielfältigen biologischen Wirkungen wurden bereits isoliert und charakterisiert (Winssinger & Barluenga, 2006).

Siderophore, wie z. B. **Coprogen B** und **2-N-methylcoprogen B**, werden von zahlreichen Pilzen mit Hilfe von NRPS synthetisiert und anschließend sekretiert. Als hochaffine Chelatoren mobilisieren sie Fe³⁺-Ionen und gelangen in der beladenen Ferri-Form über spezifische Transportsysteme in die Zellen (Haas *et al.*, 2008).

Die gezielte Inaktivierung der Coprogensynthese in filamentösen Pilzen führt zur Wachstumsreduktion, zu größerer Anfälligkeit gegenüber ROS und zu Sporulationsdefekten. Coprogen wurde als Virulenzfaktor phytopathogener Pilze, darunter *Cochliobolus heterostrophus*, *Cochliobolus miyabeanus*, *Gibberella zeae*, *Alternaria*

brassicicola und *Magnaporthe oryzae*, identifiziert (Oide *et al.*, 2006; Hof *et al.*, 2009). Exogen appliziertes Eisencitrat stellte die Virulenz eines Coprogen-defizienten *C. heterostrophus*-Isolats wieder vollständig her (Oide *et al.*, 2006). Vermutlich tragen extrazelluläre Siderophore durch die Versorgung ihres Produzenten mit essentiellen Eisenionen zur Besiedlung der Wirtspflanze bei. Allerdings sind Siderophore nicht für alle phytopathogenen Pilze ein Virulenzfaktor. Die Deletion der L-Ornithin-N5-Monooxygenase *sid1* in *Ustilago maydis* führte zu Mutanten, die keine Siderophore produzierten, aber dennoch uneingeschränkt virulent waren (Mei *et al.*, 1993).

Ferricrocin fungiert vorwiegend als intrazellulärer Speicher und interzellulärer Transporter für Eisenionen (Haas *et al.*, 2008, Wallner *et al.*, 2009). Dass ein Ausfall dieser Funktion auch zu Virulenzdefekten führen kann, wurde durch die Deletion des Ferricrocin-Synthasegens *SSM1* in *Magnaporthe oryzae* nachgewiesen. Eine drastisch verringerte Penetrationsrate der Appressorien sowie die im Vergleich zur Infektion mit dem Wildtyp deutlich reduzierte Anzahl der Blattläsionen belegten eine deutlich verminderte Virulenz der Deletionsmutante (Hof *et al.*, 2007).

Phytotoxische Eigenschaften von Ferricrocin wurden von Ohra *et al.* (1995) beschrieben. Ferricrocin verursachte in Infektionsversuchen nekrotische Blattflecken auf Blättern der Kuhbohne *Vigna unguiculata*. Die biologische Relevanz dieser Ergebnisse ist aber umstritten, da Ferricrocin als intrazelluläre Substanz normalerweise nicht in Kontakt mit pflanzlichen Zellen kommt.

IV.4.3 Phytotoxizitätstests

Zahlreiche Phytopathogene synthetisieren wirtsspezifische und nichtwirtsspezifische Toxine, um die Zellen der Wirtspflanzen abzutöten oder zu schädigen und unterbinden dadurch auch einen großen Teil der möglichen Abwehrreaktionen. Die geschädigten Gewebebereiche stehen im weiteren Verlauf der Infektion als Nährstoffquelle zur Verfügung. Toxinsynthesen stellen somit besonders für nekrotrophe Parasiten Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren dar. Das Wirkungsspektrum der toxischen Substanzen reicht von der Störung der Membranintegrität bis hin zur spezifischen Inhibition von Enzymen des Wirtsmetabolismus (Markham & Hille, 2001; Howlett, 2006).

Obwohl *C. graminicola* als Forschungsobjekt der Phytopathologie schon seit Jahrzehnten intensiv untersucht wird, ist es bisher nicht gelungen, phytotoxische Substanzen

aus Kulturen des Pilzes zu isolieren. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Reinsubstanzen sollten daher auf eine mögliche Toxizität gegenüber Blattgeweben von Maispflanzen untersucht werden.

Verletzte und unverletzte Maisblätter wurden mit den isolierten Metaboliten aus *C. graminicola* inokuliert. Anschließend erfolgte die visuelle Bonitur der Inokulationsstellen über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die Auswertung des Experiments ergab für keine der getesteten Reinsubstanzen eine signifikante Toxinwirkung, d. h., die Bildung von Blattnekrosen oder -chlorosen konnten nicht beobachtet werden.

Zahlreiche Ursachen können diesem negativen Resultat zugrunde liegen. Voraussgesetzt, *C. graminicola* produziert tatsächlich phytotoxische Sekundärmetabolite, könnten diese ausschließlich im Verlauf der Pathogenese gebildet werden. Untersuchungen zur stadienspezifischen Synthese von HC-Toxin zeigten, dass dieses Toxin in *Cochliobolus carbonum*-Appressorien synthetisiert wurde, nicht jedoch in Konidien oder Hyphen, die keine Appressorien differenzierten (Weiergang *et al.*, 1996). Eventuell sind die charakteristischen Anthraknosen, die im Verlauf der *C. graminicola*-Infektion auf der Blattoberfläche entstehen, auch Ausdruck der pflanzlichen Abwehrreaktion (Heath, 2000, Lam *et al.*, 2001). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage nach potentiellen Elicitoren. Verantwortlich für die beobachtete Inaktivität der pilzlichen Metabolite könnte auch ein zu artifizielles Testsystem sein, eine schlechte Aufnahme der Substanzen durch die Epidermiszellen oder die Instabilität der Verbindungen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass aktive Sekundärmetabolite sich nicht mit der verwendeten Extraktionsmethode isolieren lassen.

IV.5 Untersuchungen zur Funktion PP-abhängiger Enzyme

IV.5.1 Untersuchungen zur Bedeutung von CgAAR

Im Rahmen der Untersuchungen zur Funktion von *CgPPT1* sollte auch die Bedeutung ausgewählter PP-abhängiger Enzyme für die Virulenz und Pathogenität von *C. graminicola* erforscht werden. Von besonderem Interesse war dabei die α -Aminoacidat-Reduktase CgAAR, ein essentielles Enzym der Lysinbiosynthese, das durch CgPPT1 aktiviert wird. Da CgAAR als Bestandteil des primären Metabolismus einen vermutlich wichti-

gen Beitrag zur Vitalität von *C. graminicola* in allen Lebensphasen leistet, erschien es durchaus notwendig, *CgAAR*-Deletionsmutanten zu generieren und phänotypisch zu charakterisieren, um somit den Beitrag der *CgAAR*-Inaktivierung am beobachteten $\Delta Cgppt1$ -Phänotyp abzuschätzen.

Die Herstellung *CgAAR*-defizienter *C. graminicola*-Isolate erfolgte durch die Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette, wobei das KO-Konstrukt mittels DJ-PCR (Yu *et al.*, 2004) generiert wurde, so dass der vollständige putative ORF des Gens deletiert werden konnte. Bestätigt wurde die erfolgreiche Inaktivierung von *CgAAR* durch Southern-Analysen.

Mikroskopische Untersuchungen des Infektionsverlaufs führten zu unerwarteten Resultaten. Etwa zwei Drittel der $\Delta Cgaar$ -Appressorien war nicht in der Lage, Epidermiszellen von Maisblättern zu penetrieren. Nach erfolgreichen Penetrationsversuchen endete die Infektion in der frühen biotrophen Phase. Das terminale Stadium der $\Delta Cgaar$ -Infektion war durch auffällig kurze Primärhyphen gekennzeichnet. $\Delta Cgaar$ -Isolate waren weitestgehend avirulent. Exogen appliziertes Lysin stellte jedoch die Virulenz wieder vollständig her.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die *de novo* Synthese von Lysin eine essentielle Voraussetzung für die Pathogenität von *C. graminicola* ist. Gleichzeitig wird deutlich, dass *C. graminicola* zumindest in der frühen Phase der Infektion den Lysinbedarf nicht durch die Aufnahme pflanzlichen Lysins decken kann. Offen bleibt, aus welchen Gründen eine ausreichende Aufnahme von Lysin über die fungalen Transportsysteme für Aminosäuren zu diesem Zeitpunkt der Infektion nicht möglich ist. Interessant wären sicherlich auch entsprechende Untersuchungen weiterer Aminosäure-Auxotrophien.

Nach der Inokulation verletzter Blätter mit $\Delta Cgaar$ verlief der Infektionszyklus bis hin zur Konidienbildung vollkommen normal. Die gestörte Konidiogenese der $\Delta Cgppt1$ -Deletionsmutanten steht daher höchstwahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Lysin-Auxotrophie. Gleichzeitig belegt die erfolgreiche Bildung von Konidien durch $\Delta Cgaar$, dass in der späten Phase des Infektionszyklus ausreichend Lysin aus dem Gewebe der Wirtspflanze mobilisiert werden kann.

IV.5.2 Untersuchungen zur Bedeutung von CgPKS1

Die Bedeutung von Melanin als Pathogenitätsfaktor phytopathogener Pilze, welche mit Hilfe von Appressorien die Epidermis ihrer Wirtspflanzen penetrieren, wurde schon in zahlreichen wissenschaftlichen Studien nachgewiesen. Dies gilt besonders für pathogene Vertreter der Gattungen *Colletotrichum* und *Magnaporthe* (Henson *et al.*, 1999 und Zitate darin). Darüber hinaus konnte Melanin auch als Virulenzfaktor für den Erreger des Apfelschorfs *Venturia inaequalis* identifiziert werden. Dieses Resultat war erstaunlich, da Appressorien von *V. inaequalis* im Gegensatz zu Appressorien von *Magnaporthe*- bzw. *Colletotrichum*-Species nicht vollständig melanisiert sind, sondern lediglich an der Basis des Appressoriums eine melanisierte Ringstruktur im Kontaktbereich zur Wirtsoberfläche aufweisen (Steiner & Oerke, 2007).

Andererseits beeinflusst die Melanisierung von Infektionsstrukturen nicht notwendigerweise den Erfolg der Infektion. Melanin-defiziente Isolate von *Gaeumannomyces graminis*, dem Erreger der Schwarzbeinigkeit an zahlreichen Gräsern, entwickelten einen weitaus geringeren Turgor in den nichtmelanisierten Hyphopodien als der melanisierte Wildtyp. Trotzdem zeigten sich keine Unterschiede in der Penetrationsfähigkeit intakter Wirtsoberflächen (Frederick *et al.*, 1999).

Melanin wurde erstmals von Rasmussen & Hanau (1989) als Virulenzfaktor für *C. graminicola* beschrieben. Unpigmentierte UV-Mutanten verursachten in Infektionsexperimenten deutlich weniger Blattnekrosen als der Wildtyp. Durch Zugabe von Scytalton konnte die Virulenz jedoch vollständig wiederhergestellt werden. Die erfolgreiche Komplementation bestätigte damit, dass Melanin in *C. graminicola* über den Pentaketidweg synthetisiert wird. Dessen markantester Reaktionsschritt, die Bildung von Tetrahydroxynaphtalen (T4HN) aus fünf Einheiten Acetyl-CoA, erfolgt durch die katalytische Wirkung einer Polyketidsynthase.

In einem subtraktiven Ansatz zur Identifizierung von Transkripten aus *C. graminicola*, die in der frühen Phase der Infektion verstärkt exprimiert werden, gelang die Identifizierung eines cDNA-Fragments, dessen Sequenz eine große Ähnlichkeit zu fungalen T4HN-Synthasen aufwies (Sugui & Deising, 2002). Da zu diesem Zeitpunkt noch keine Daten der Sequenzierung des *C. graminicola*-Genoms vorlagen, erfolgte die Isolierung des gesamten kodierenden Bereichs sowie etwa 5 kb flankierender DNA-Sequenz mittels Genome Walking (Liu & Baird, 2001). Durch strukturelle Analysen und Sequenzvergleiche mit T4HN-Synthasen nah verwandter Ascomyceten konnte ein

putativer ORF von 6441 bp ermittelt werden, der von drei Introns unterbrochen wird. Das abgeleitete Protein umfasst 2146 Aminosäuren.

Mikroskopischen Untersuchungen zur Expression eines *CgPKSI:eGFP*-Reporterkonstrukts zeigten deutlich, dass die beobachteten Fluoreszenzmaxima zeitlich stets mit dem Einsetzen der Melanisierung pilzlicher Strukturen korrelierten. Vollständig melanierte Appressorien und Setae wiesen eine schwache GFP-Fluoreszenz auf, während in allen weiteren Infektionsstrukturen praktisch keine Expression des Reporterkonstrukts nachweisbar war.

Semi-quantitative RT-PCR-Ansätze zur Bestimmung der relativen *CgPKSI*-Transkriptmenge deuteten auf ein Transkriptionsmaximum etwa 24 Stunden nach dem Beginn der Infektion hin. Dieser Zeitpunkt stimmt mit der sichtbaren Appressorienmelanisierung überein. Allerdings endete die *CgPKSI*-Transkription danach nicht abrupt, sondern verlief in abgeschwächter Form weiter bis 72 Stunden nach Beginn der Infektion. Dieses Ergebnis, das scheinbar im Widerspruch zu den Resultaten der GFP-Expressionsanalyse steht, ist vermutlich auf eine Asynchronität bei der Differenzierung von Infektionsstrukturen zurückzuführen. RT-PCR-Ansätze könnten in dem Fall die *CgPKSI*-Transkription in sehr spät differenzierten Appressorien oder Hyphopodien anzeigen. Daher führt die Analyse der Expression eines Reporterkonstrukts in individuellen Infektionsstrukturen unter Umständen zu detaillierteren Informationen.

Andererseits wurde mit Hilfe von RT-PCR eine signifikante Menge an *CgPKSI*-Transkripten in ungekeimten Sporen detektiert, die wiederum keine GFP-Fluoreszenz aufwiesen. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein präformierter *CgPKSI*-mRNA in den Konidien sein, deren Translation erst zum Zeitpunkt der Appressorienmelanisierung erfolgt.

Eine sehr frühe Expression der orthologen T4HN-Synthase *PKSI* und weiterer Gene der Melaninbiosynthese aus *Colletotrichum lagenarium* wurde von Takano *et al.* (1997) mittels Northern-Analyse nachgewiesen. Schon zwei Stunden nach Beginn der Inokulation, und damit etwa vier Stunden vor der Appressoriendifferenzierung, erreichte die *PKSI*-Transkriptkonzentration ein Maximum.

Zur funktionellen Charakterisierung von *CgPKSI* sowie zur Abgrenzung des $\Delta CgpkSI$ -Deletionsphänotyps vom Phänotyp der *CgPPTI*- bzw. *CgAAR*-defizienten Isolate von *C. graminicola* erfolgte die Generierung von $\Delta CgpkSI$ -Mutanten durch die gezielte Integration einer Hygromycin-Resistenzkassette in den ORF des Gens. Bestätigt wurde die erfolgreiche Inaktivierung von *CgPKSI* durch Southern-Analysen und RT-PCR.

Die Analyse des Infektionsverlaufs zeigte, dass der Wildtyp und ein Isolat mit ektopischer Integration der KO-Kassette, nicht jedoch Melanin-defiziente $\Delta Cgpksl$ -Mutanten Anthraknosen auf unverletzten Maisblättern verursachen. Dagegen wurden nach der Inokulation verletzter Maisblätter mit $\Delta Cgpksl$ -Konidien die charakteristischen Symptome sichtbar.

Mikroskopische Untersuchungen zur Morphologie der $\Delta Cgpksl$ -Appressorien konnten das Fehlen von Melanin in der Appressorienzellwand bestätigen. Darüber hinaus lysierten $\Delta Cgpksl$ -Appressorien häufig, wie auch Appressorien der $\Delta Cgppt1$ -Mutanten, auf der Wirtsoberfläche bzw. bildeten mehrfach hintereinander Appressorien, ohne dass diese erfolgreich die Wirtsepidermis penetrierten.

Die beobachtete Apathogenität gegenüber unverletzten Maisblättern ist somit auf den Verlust der Penetrationsfähigkeit zurückzuführen. In verletzten Maisblättern wurde dagegen der vollständige Infektionszyklus durchlaufen. Keimfähigkeit und Appressoriendifferenzierung der $\Delta Cgpksl$ -Integrationsmutante entsprachen dem Wildtyp.

Die Apathogenität von $\Delta Cgpksl$ steht im Widerspruch zur beschriebenen Reduktion der Symptome nach der Infektion intakter Maispflanzen mit Melanin-defizienten Isolaten (Rasmussen & Hanau, 1989). Möglicherweise sind Unterschiede in den verwendeten Maissorten und Inokulationstechniken für diese abweichenden Resultate verantwortlich. Ein entscheidender Faktor für reproduzierbare Ergebnisse im Zusammenhang mit der $\Delta Cgpksl$ -Infektion war die Unversehrtheit der Blattoberfläche. Schon minimale Beschädigungen führten zur Infektion und Symptombildung.

Das Myzel genetisch komplementierter Isolate, in denen *CgPKSI* unter der Kontrolle eines konstitutiven Promoters exprimiert wurde, erschien deutlich stärker melanisiert als vegetatives Myzel des Wildtyps. Zudem setzte die Melanisierung der Hyphen früher ein. Allerdings verursachten die genetisch komplementierten Isolate nur sehr schwache Blattnekrosen. Hypermelanisierte Isolate mit reduzierter Virulenz wurden auch für *Gaeumannomyces graminis* beschrieben (Frederick *et al.*, 1999).

Mikroskopische Untersuchungen der Appressorienmorphologie zeigten eine drastisch verringerte Einlagerung von Melanin in die Zellwand. Trotz konstitutiver Expression von *CgPKSI* waren die Appressorien der genetisch komplementierten Isolate wesentlich schwächer pigmentiert als Wildtyp-Appressorien.

Ähnliche Resultate konnten durch die Zugabe von Scytalon, dem Produkt der T4HN-Reduktion, erzielt werden. $\Delta Cgpksl$ -Appressorien wiesen nach der chemischen Komplementation schwach melanisierte Zellwände auf. Gleichzeitig waren diese Ap-

pressorien stark hypertroph und lysierten häufig. Darüber hinaus führte die Zugabe von Scytalon aber auch zu einer ungleichmäßigen Melanisierung. Bestimmte Bereiche der Zellwand erschienen stärker pigmentiert, wobei die Verteilung dieser stark melaniserten Abschnitte keinem bestimmten Muster folgte.

Die Resistenz nichtmelanisierter Appressorien gegenüber zellwanddegradierenden Enzymen wurde experimentell durch Zugabe von *Trichoderma harzianum* Lysing Enzymes, einem Gemisch unterschiedlicher Chitinasen, Glucanasen und Cellulasen, untersucht. Etwa 75 Prozent der $\Delta Cgpk1$ -Appressorien lysierten unter dem Einfluss der hydrolytischen Enzyme, während nahezu alle melanierten Wildtyp-Appressorien intakt blieben.

Die Funktion von Melanin als protektives Element fungaler Zellwände gegenüber der Wirkung lytischer Enzyme wurde bereits für andere Pilze, darunter *G. graminis*, *Monilinia fructicola* und *Aspergillus nidulans*, beschrieben (Frederick *et al.*, 1999; Rehnstrom & Free, 1996; Kuo & Alexander, 1967). Denkbar wäre eine stärkere Vernetzung der Zellwandkomponenten durch Melanin. Interessant sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen mit Hilfe von Solid-State-NMR, die deutliche Hinweise für eine kovalente Bindung von Kohlenhydraten der Zellwand und Melanin ergaben (Zhong *et al.*, 2008).

Lysierte Appressorien der $\Delta Cgpk1$ -Mutante wurden, von Einzelfällen abgesehen, ausschließlich nach der Inokulation von Zwiebelepidermen bzw. Maisblättern beobachtet. Dagegen blieben nichtmelanierte Appressorien auf artifiziellen Oberflächen fast ausnahmslos intakt. Eventuell schwächen sekretierte Hydrolasen oder andere pflanzliche Abwehrreaktionen die Struktur der nichtmelanierten Appressorienzellwand, so dass der gewaltige Zellinnendruck schließlich zur Lyse des Appressoriums führt. In diesem Szenario bestünde die primäre Aufgabe des Melanins nicht in der Eindämmung niedermolekularer Osmolyte, sondern in der Gewährleistung mechanischer Stabilität während der Phase extremen Turgors.

Untersuchungen zur Physiologie von Appressorien weisen der Melaninschicht eine Funktion als Barriere für niedermolekulare Osmolyte zu. Die ausbleibende Melanisierung verursacht demnach einen Efflux von Osmolyten. Dadurch kann der notwendige Turgor für die Penetration der Wirtsepidermis nicht aufgebaut werden, was zur Apathogenität der betroffenen Isolate führt (Bechinger *et al.*, 1999; Wilson & Talbot, 2009).

Die in Cytorrhizieexperimenten ermittelten osmotischen Potentiale von Appressorien des Wildtyps und der $\Delta Cgpk1$ -Mutante zeigten deutlich, dass $\Delta Cgpk1$ -Appressorien

keinen reduzierten Turgor aufweisen. Vielmehr kollabierte die Hälfte dieser Appressorien in einer PEG-Lösung mit einem osmotischen Potential von 3,7 MPa, während 50 Prozent der Wildtyp-Appressorien schon bei 2,8 MPa kollabiert vorlagen. Dieses Resultat steht im direkten Widerspruch zu den Untersuchungsergebnissen von nichtmelanierten Appressorien der phytopathogenen Ascomyceten *Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum lagenarium* und Hyphopodien von *Gaeumannomyces graminis*. Melanin-defiziente Appressorien dieser Pilze wiesen einen deutlich verringerten intrazellulären Turgor auf (Howard, 1997; Money *et al.*, 1998; Kubo *et al.*, 1999; Wilson & Talbot, 2009).

Möglicherweise verursacht die fehlende Einlagerung von Melanin in die Zellwand von Appressorien phytopathogener Pilze nicht in jedem Fall eine Reduktion des Turgors. Zusätzliche Untersuchungen mit weiteren Messmethoden, wie z. B. Kryoskopie oder die direkte Bestimmung der Zusammensetzung und Konzentration des Appressorieninhalts durch GC/MS-Analysen, könnten Aufschluss über den Einfluss von Melanin auf die Turgorgenerierung in Appressorien geben.

IV.6 PPTasen als Wirkort fungizider Verbindungen und Entwicklung eines Inhibitor-Assays

Sfp-Typ PPTasen aktivieren als zentrales Element des fungalen Primär- und Sekundärstoffwechsels zahlreiche PP-abhängige Enzyme mit essentiellen Funktionen, darunter die Biosynthese von Lysin und die Mobilisierung von Fe^{3+} -Ionen. Darüber hinaus spielen PPTase-abhängige PKS und NRPS eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung asexueller Konidien. Ein großer Anteil der fungalen Sekundärmetabolite wird durch PKS und NRPS synthetisiert. Die Penetrationsfähigkeit und damit die Pathogenität bestimmter phytopathogener Ascomyceten, wie z. B. *M. oryzae* und *C. graminicola*, ist abhängig von melanierten Infektionsstrukturen. Schließlich entscheiden Polyketide oder nichtribosomale Peptide als wirtsspezifische oder nichtwirtsspezifische Toxine in vielen Wirt-Parasit-Interaktionen über den Erfolg der Infektion. Sfp-Typ 4'-PPTasen sind somit unentbehrlich für Wachstum, Entwicklung und Pathogenität fungaler Schaderreger und daher ein attraktives Target für die Entwicklung fungizider Verbindungen. Der geringe Konservierungsgrad von PPTasen unterschiedlicher Organismengruppen

eröffnet dabei die Möglichkeit der Entwicklung spezifisch wirkender Substanzen, die weitgehend ungefährlich für andere Lebewesen sind. Nicht zuletzt könnten potentielle PPTase-Inhibitoren helfen, die Kontamination von Lebensmitteln mit PKS/NRPS-abhängigen Mykotoxinen zu reduzieren (Bennett & Klich, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion der 4'-PPTase aus *C. graminicola* detailliert charakterisiert. Phänotypische Untersuchungen zur Auswirkung der Inaktivierung von *CgPPT1* zeigten deutlich, dass Inhibitoren der PPTase die Pathogenität, vermutlich sogar die Lebensfähigkeit von *C. graminicola*, unterdrücken können (Abb. 36).

Die Anzahl differenzierter Appressorien der PPTase-defizienten Mutanten von *C. graminicola* war im Vergleich zum Wildtyp drastisch verringert. Gleichzeitig verhinderte der Ausfall der Melaninsynthese die erfolgreiche Penetration der Wirtsepidermis. Asexuelle Sporen wurden *in planta* nicht gebildet. Vegetatives Wachstum erforderte Lysin und leicht mobilisierbare Eisenionen im Medium. Der Infektionsphänotyp *CgAAR*-defizienter Mutanten war durch Penetrationsdefekte und einen Entwicklungsarrest in der frühen biotrophen Phase gekennzeichnet.

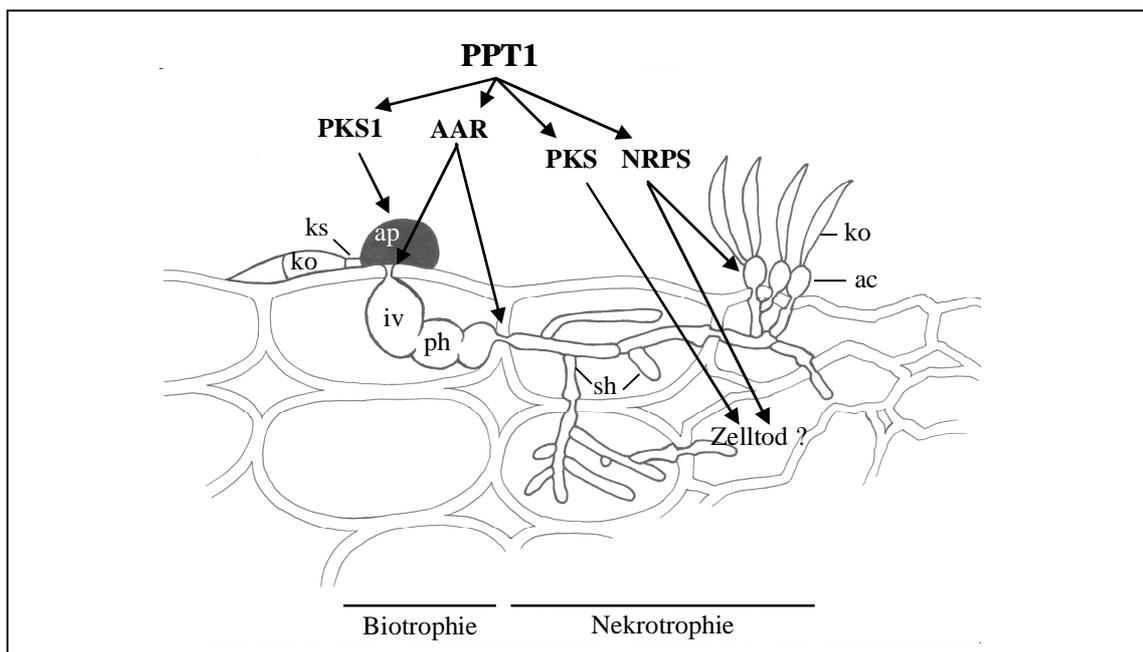


Abb. 36: CgPPT1 ist ein zentraler Regulator der Pathogenität

CgPPT1 aktiviert PKS, NRPS und AAR. *CgPKS1* ist für die Melanisierung der Appressorien und die Penetration der Wirtsepidermis von entscheidender Bedeutung, *CgAAR* für die Wirtspenetration und den Übergang zur Nekrotrophie. NRPS-Produkte sind unentbehrlich für die Bildung von Konidien. Offen bleibt, ob phytotoxische NRPS- oder PKS-Produkte zum Absterben von Epidermis- und Mesophyllzellen beitragen.

Für die Suche nach PPTase-Inhibitoren ist es notwendig, die Übertragung von Phosphopantetheinyl auf einen Akzeptor im zellfreien System durchführen zu können. Daher wurden CgPPT1 und die ACP-Domäne von CgPKS1 in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt. Die erfolgreiche *in vitro* Phosphopantetheinylierung von CgPKS100 durch die heterolog exprimierte PPTase CgPPT1 wies die Funktionalität beider Proteine nach. Alle benötigten Komponenten für die Entwicklung eines Assays zur Suche nach Inhibitoren der PPTase aus *C. graminicola* stehen damit zur Verfügung.

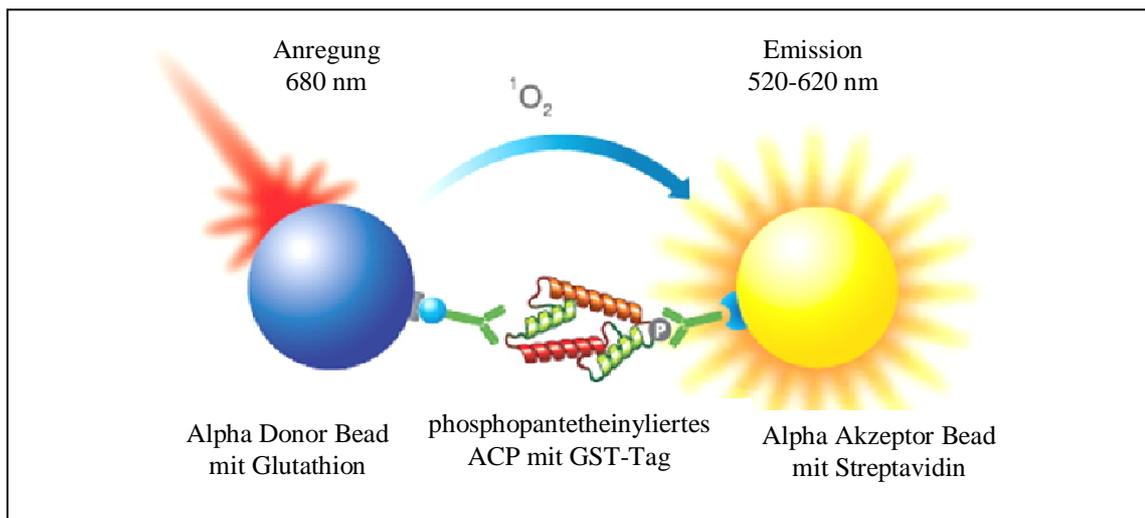


Abb. 37: AlphaScreen-Assay

Die ACP-Domäne von CgPKS1 wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und an Alpha Donor Beads mit Glutathion gebunden. Durch die katalytische Wirkung der PPTase übertragenes Phosphopantetheinyl-Biotin (P) ermöglicht die Bindung an das Streptavidin der Alpha Akzeptor Beads. Dadurch gelangen Akzeptor und Donor Beads in räumliche Nähe, eine Voraussetzung für die Übertragung des instabilen Singulett-Sauerstoffs und die daraus resultierende Lichtemission. Potentielle Inhibitoren blockieren im Reaktionsansatz die PP-Übertragung. Dadurch kommt es nicht zur Kopplung der Akzeptor Beads und die Lichtemission bleibt aus.

Besonders geeignet erschien dabei das AlphaScreen-Verfahren. Mit einem speziellen Phthalocyanin-Photosensibilisator überzogene Donor Beads erzeugen nach der Anregung durch eine Laserdiode instabilen Singulett-Sauerstoff, der innerhalb seiner Lebensdauer etwa 200 nm Strecke zurücklegen kann. Nur wenn sich Akzeptor Beads in unmittelbarer räumlicher Nähe zu den Donor Beads befinden, wird Energie vom Singulett-Sauerstoff zur Thioxen-Beschichtung der Akzeptor Beads transferiert und somit Licht emittiert.

Gegenwärtig laufen Versuche zur Optimierung der Reaktion. Für die Suche nach potentiellen PPTase-Inhibitoren stehen Metabolite von etwa 12000 weltweit gesammelten Pilzen im Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF) zur Verfügung.

V Zusammenfassung

Sfp-Typ 4'-Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) aktivieren in filamentösen Pilzen Enzyme des primären (α -Aminoadipat-Reduktase, AAR) und sekundären Metabolismus (Polyketidsynthasen, PKS und Nichtribosomale Peptidsynthasen, NRPS) durch die Übertragung der Phosphopantetheinylgruppe (PP) vom Coenzym A auf ein konserviertes Serin von Acyl- bzw. Peptidyl-Carrier-Proteinen. Die Genome phytopathogener Ascomyceten enthalten zahlreiche PKS und NRPS. Einige dieser Enzyme sind von essentieller Bedeutung für die erfolgreiche Etablierung der kompatiblen Wirt-Parasit-Interaktion. Daher sind PPTasen nicht nur für das vegetative Wachstum notwendig, sondern stellen zentrale Regulatoren der fungalen Pathogenität dar.

PPTase-defiziente Mutanten ($\Delta Cgppt1$) des hemibiotrophen Maispathogens *Colletotrichum graminicola* wurden generiert und phänotypisch charakterisiert. $\Delta Cgppt1$ -Isolate waren auxotroph für Lysin, hypersensitiv gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies und nicht in der Lage, auf Medien mit komplexierten Eisenionen zu wachsen bzw. Siderophore oder Polyketide zu synthetisieren. In differentiellen Metabolitanalysen von Wildtyp und $\Delta Cgppt1$ konnten fünf bisher unbekannte Polyketide isoliert und mit Hilfe von NMR-Methoden strukturell charakterisiert werden. Darüber hinaus wurden zehn weitere Metabolite aus dem Kulturüberstand von *C. graminicola* isoliert.

Untersuchungen zum Infektionsverlauf zeigten, dass die in geringer Anzahl gebildeten $\Delta Cgppt1$ -Appressorien auf intakten Mais- und Zwiebelepidermen lysierten. Verletzte Maisblätter wurden dagegen invasiv besiedelt, wobei es jedoch nicht zur Entstehung von Symptomen und zur Bildung asexueller Sporen kam.

Um den pleiotropen Phänotyp von $\Delta Cgppt1$ detaillierter zu analysieren, wurden Lysin- ($\Delta Cgaar$) sowie Melanin-defiziente Mutanten ($\Delta Cgpks1$) generiert und charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten, dass CgPPT1-abhängige Enzyme in ganz bestimmten Phasen des Infektionsverlaufs benötigt werden. So verleiht die Melanisierung der Appressorienzellwand Festigkeit und ist damit für die Funktionalität dieser Infektionsstrukturen von essentieller Bedeutung, während die Fähigkeit zur Lysinsynthese ausschlaggebend für den Übergang zur Nekrotrophie ist.

Um zu zeigen, dass es sich bei Sfp-PPTasen um generelle pilzliche Pathogenitätsfaktoren handelt, wurde das Sfp-PPTase-Gen des Reispathogens *Magnaporthe oryzae*

deletiert. Auch diese Mutanten wiesen Sporulationsdefekte auf, waren unpigmentiert und apathogen.

Sfp-PPTasen von zwei phytopathogenen Ascomyceten wurden in der vorliegenden Arbeit als neue fungale Pathogenitätsfaktoren identifiziert. Aufgrund ihrer zentralen Stellung als Aktivatoren PP-abhängiger Enzyme sind Sfp-PPTasen attraktive Targets für antifungisch wirkende Verbindungen. Die *in vitro* Phosphopantetheinylierung eines PP-Akzeptorproteins konnte in Interaktionsstudien mit heterolog exprimiertem CgPPT1 nachgewiesen werden. Unter Verwendung der AlphaScreen-Technologie sollen im weiteren Verlauf der Arbeit potentielle PPTase-Inhibitoren identifiziert werden, die im chemischen Pflanzenschutz oder als Antimykotikum in der Human- oder Tiermedizin eingesetzt werden können.

VI Literatur

- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H. & Riley, R. T.** (1994). Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* **106**, 1085-1093.
- Abbas, H. K., Paul, R. N., Riley, R. T., Tanaka, T. & Shier, W. T.** (1998). Ultrastructural effects of AAL-toxin Ta from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon* **36** (12), 1821-1832.
- Abe, Y., Suzuki, T., Ono, C., Iwamoto, K., Hosobuchi, M. & Yoshikawa, H.** (2002). Molecular cloning and characterization of an ML-236B (compactin) biosynthetic gene cluster in *Penicillium citrinum*. *Mol Genet Genomics* **267**, 636-646.
- Abou-Zaid, M., Dumas, M., Chauret, D., Watson, A. & Thompson, D.** (1997). C-Methyl flavonols from the fungus *Colletotrichum dematium* f. sp. *epilobii*. *Phytochemistry* **45**, 957-961.
- Ahmad, M. R. & Winter, A.** (1970). The effect of weak auxins on the growth of blue-green algae. *Hydrobiologia* **36** (2), 305-316.
- Ahn, J.-H. & Walton, J. D.** (1996). Chromosomal organization of *TOX2*, a complex locus controlling host- selective toxin biosynthesis in *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* **8**, 887-897.
- Akamatsu, H., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K.** (1997). AAL-toxin deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology* **87**, 967-972.
- Akamatsu, H., Otani, H. & Kodama, M.** (2003). Characterization of a gene cluster for host-specific AAL-toxin biosynthesis in the tomato pathotype of *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Newsl* **50**, 355.
- Albertazzi, E., Cardillo, R., Servi, S. & Zucchi, G.** (1994). Biogenesis of 2-Phenylethanol and 2-Phenylethylacetate Important Aroma Components. *Biotechnol Lett* **16**, 491-496.
- Alem, M. A. S., Oteef, M. D. Y., Flowers, T. H. & Douglas, J.** (2006). Production of Tyrosol by *Candida albicans* Biofilms and Its Role in Quorum Sensing and Biofilm Development. *Eukaryot Cell* **5** (10), 1770-1779.
- Amnuaykanjanasin, A. & Epstein, L.** (2007). A class Vb chitin synthase in *Colletotrichum graminicola* is localized in the growing tips of multiple cell types, in nascent septa, and during septum conversion to an end wall after hyphal breakage. *Protoplasma* **227** (2-4), 155-64.
- Anderson, D. W. & Nicholson, R. L.** (1996). Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **88**, 996-1002.

- Aqueveque, P., Anke, T. & Sterner, O.** (2002). The Himanimides, New Bioactive Compounds from *Serpula himantoides* (Fr.) Karst. *Z Naturforsch* **57c**, 257-262.
- Arosio, P., Rosaria, I., & Cavadini, P.** (2009). Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et biophysica acta* **1790** (7), 589-99.
- Austin, M. B. & Noel, J. P.** (2003). The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **20**, 79-110.
- Austin, M. B., Izumikawa, M., Bowman, M. E., Udvary, D. W., Ferrer, J.-L., Moore, B. S. & Noel, J. P.** (2004). Crystal structure of a bacterial type III polyketide synthase and enzymatic control of reactive polyketide intermediates. *J Biol Chem* **279**, 45162-45174.
- Avila-Adame, C., Olaya, G. & Köller, W.** (2003). Characterization of *Colletotrichum graminicola* Isolates Resistant to Strobilurin-Related QoI Fungicides. *Plant Disease* **87**, 1426-1432.
- Ayer, W. A. & Trifonov, L. S.** (1994). Anthraquinones and a 10-Hydroxyanthrone from *Phialophora alba*. *J Nat Prod* **57** (2), 317-319.
- Baker, S. E., Kroken, S., Inderbitzin, P., Asvarak, T., Li, B.-Y., Shi, L., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (2006). Two Polyketide Synthase-Encoding Genes Are Required for Biosynthesis of the Polyketide Virulence Factor, T-toxin, by *Cochliobolus heterostrophus*. *Mol Plant-Microbe Interact* **19** (2), 139-149.
- Bartel, B.** (1997). Auxin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol, Plant Mol Biol* **48**, 51-66.
- 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**, 1896-1899.
- Bell, A. A. & Wheeler, M. H.** (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopath* **24**, 411-451.
- Belshaw, P. J., Walsh, C. T. & Stachelhaus, T.** (1999). Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science* **284**, 486-489.
- Bennett, J. W. & Klich, M.** (2003). Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* **16** (3), 497-516.
- Bentley, R. & Bennet J. W.** (1999). "Construction Polyketides: From Collie to Combinatorial Biosynthesis". *Annu Rev Microbiol* **53**, 411-446.
- Bergmann, S., Schumann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A. & Hertweck, C.** (2007). Genomics-Driven Discovery of PKS-NRPS Hybrid Metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature Chem Biol* **3**, 213-217.

- Bergstrom, G. C., Croskey, B. S. & Carruthers, R. I.** (1983). Synergism between *Colletotrichum graminicola* and European corn borer in stalk rot of corn in New York. (Abstr.) *Phytopathology* **73**, 842.
- Bergstrom, G. C. & Nicholson, R. L.** (1999). The biology of corn anthracnose. *Plant Disease* **83**, 596-608.
- Berruyer, R., Adreit, H., Milazzo, J., Gaillard, S., Berger, A., Dioh, W., Lebrun, M.-H. & Tharreau, D.** (2003). Identification and fine mapping of *Pi33*, the rice resistance gene corresponding to the *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1*. *Theor Appl Genetics* **107** (6), 1139-1147.
- Bertani, G.** (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol* **186**, 595-600.
- Bililign, T., Hyun, C.-G., Williams, J. S., Czisny, A. M. & Thorson, J. S.** (2004). The Hedamycin Locus Implicates a Novel Aromatic PKS Priming Mechanism. *Chem Biol* **11**, 959-969.
- Böhnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L. & Lebrun, M. H.** (2004). A Putative Polyketide Synthase/Peptide Synthetase from *Magnaporthe grisea* Signals Pathogen Attack to Resistant Rice. *Plant Cell* **16**, 2499-2513.
- Bousquet, J. E., Vegh, I., Poutean-Thouvenot, M. & Barbier, M.** (1971). Isolement de l'aspergillomarasmine A de cultures de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. agent pathogene des saules. *Ann Phytopathol* **3**, 407-408.
- Brandwagt, B. F., Tarcies, Kneppers, T. J. A., Nijkamp, H. J. J. & Hille, J.** (2002). Overexpression of the Tomato *Asc-1* Gene Mediates High Insensitivity to AAL Toxins and Fumonisin B1 in Tomato Hairy Roots and Confers Resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici* in *Nicotiana umbratica* Plants. *Mol Plant-Microbe Interact* **15** (1), 35-42.
- Brehl, G. W. & Dickinson, J. G.** (1950). Anthracnose of Cereals and Grasses. Technical Bulletin No. 1005. United States Department of Agriculture, U. S. Printing Office, Washington, D. C., USA.
- Brosch, G., Ransom, R., Lechner, T., Walton, J.D. & Loidl, P.** (1995). Inhibition of maize histone deacetylases by HC toxin, the host-selective toxin of *Cochliobolus carbonum*. *Plant Cell* **7**, 1941-1950.
- Brosch, G., Dangl, M., Graessle, S., Loidl, A., Trojer, P., Brandtner, E. M., Mair, K., Walton, J. D., Baidyaroy, D. & Loidl, P.** (2001). An inhibitor-resistant histone deacetylase in the plant pathogenic fungus *Cochliobolus carbonum*. *Biochemistry* **40**, 12855-12863.
- Buckingham, J.** (1994). Dictionary of Natural Products, Chapman & Hall Data Base, Cambridge University Press, Cambridge, GB.

- Bunkoczi, G., Pasta, S., Joshi, A., Wu, X., Kavanagh, K. L.,¹ Smith, S. & Oppermann, U.** (2007). Mechanism and Substrate Recognition of Human Holo ACP Synthase. *Chem Biol* **14** (11), 1243-1253.
- Burdon, J. J. & Thrall, P. H.** (2009). Coevolution of plants and their Pathogens in natural habitats. *Science* **324**, 755-756.
- Burmeister, H. R. & Plattner, R. D.** (1987). Enniatin production by *Fusarium tricinctum* and its effects on germinating wheat seeds. *Phytopathology* **77**, 1483-1487.
- Butler, M. J. & Day, A. W.** (1999). Melanins: a review. *Can J Microbiol* **44**, 1115-1136.
- Cane, D. E. & Walsh, C. T.** (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 319-325.
- Carroll, G.** (1988). Fungal Endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* **69** (1), 2-9.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P. J. & Bennett, M. J.** (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* **13**, 843-852.
- Castoe, T. A., Stephens T., Noonan, B. P. & Calestani, C.** (2007). A novel group of type I polyketide synthases (PKS) in animals and the complex phylogenomics of PKSs. *Gene* **392**, 47-58.
- Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. & Vaillancourt, L.** (2001). Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **91**, 558-564.
- Challis, G. L., Ravel, J. & Townsend, C. A.** (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol* **7**, 211-224.
- Chalut, C., Botella, L., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C. & Guilhot, C.** (2006). The nonredundant roles of two 4-phosphopantetheinyl transferases in vital processes of Mycobacteria. *PNAS* **103** (22), 8511-8516.
- Chapman, D. J. & Leech, R. M.** (1979). Changes in Pool Sizes of Free Amino Acids and Amides in Leaves and Plastids of *Zea mays* during Leaf Development. *Plant Physiol* **63**, 567-572.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.** (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **28**, 5294-5299.
- Chen, H., & Fink, G. R.** (2006). Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Develop* **20**, 1150-1161.

- Chopra, T., Banerjee, S., Gupta, S., Yadav, G., Anand, S., Surolia, A., Roy, R.P., Mohanty, D. & Gokhale, R.S.** (2008). Novel intermolecular iterative mechanism for biosynthesis of mycoketide catalyzed by a bimodular polyketide synthase. *PloS Biology* **6**, e163.
- Choquer, M., Lahey, K. A., Chen, H.-L., Cao, L., Ueng, P. P., Daub, M. E. & Chung, K.R.** (2005). The CTB1 gene encoding a fungal polyketide synthase is required for cercosporin toxin biosynthesis and fungal virulence in *Cercospora nicotianae*. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**, 468-476.
- Churchill, A. C. L., Dunkle, L. D., Silbert, W., Kennedy, K. J. & Macko, V.** (2001). Differential Synthesis of Peritoxins and Precursors by Pathogenic Strains of the Fungus *Periconia circinata*. *Appl Environ Microbiol* **67** (12), 5721-5728.
- Coffeen, W. C. & Wolpert, T. J.** (2004). Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in *Avena sativa*. *Plant Cell* **16**, 857-873.
- Cohen, B., Amsellem, Z., Maor, R., Sharon, A. & Gressel, J.** (2002). Transgenically-enhanced expression of indole-3-acetic acid (IAA) confers hypervirulence to plant pathogens. *Phytopathology* **92**, 590-596.
- Collemare, J., Pianfetti, M., Houle, A. E., Morin, D., Camborde, L., Gagey, M. J., Barbisan, C., Fudal, I., Lebrun, M. H. & Böhnert, H. U.** (2008). *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ACE1* belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytol* **179** (1), 196-208.
- Collie, N. & Myers, W. S.**, (1893). The formation of orcinol and other condensation products from dehydracetic acid. *J Chem Soc*, **63**, 122-128.
- Contreras-Cornejo, H., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. & López-Bucio, J.** (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Phys* **149**, 1579-1592.
- Copp, J. N. & Neilan, B. A.** (2006). The Phosphopantetheinyl Transferase Superfamily: Phylogenetic Analysis and Functional Implications in Cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **72** (4), 2298-2305.
- Copp, J. N., Roberts, A. A., Marahiel, M. A. & Neilan, B. A.** (2007). Characterization of PPTNs, a Cyanobacterial Phosphopantetheinyl Transferase from *Nodularia spumigena* NSOR10. *J Bacteriol* **189** (8), 3133-3139.
- Crawford, J. A., Vagstad, A. L., Ehrlich, K. C. & Townsend, C. A.** (2008). Starter unit specificity directs genome mining of polyketide synthase pathways in fungi. *Bioorg Chem* **36**, 16-22.
- Crouch, J. A., Clarke, B. B. & Hillman, B. I.** (2006). Unraveling Evolutionary Relationships Among the Divergent Lineages of *Colletotrichum* Causing Anthracnose Disease in Turfgrass and Corn. *Phytopathology* **96**, 46-60.

- Curtis, M. J. & Wolpert, T. J.** (2004). The victorin-induced mitochondrial permeability transition precedes cell shrinkage and biochemical markers of cell death, and shrinkage occurs without loss of membrane integrity. *Plant J* **38**, 244-259.
- Dale, J. L.** (1963). Corn anthracnose. *Plant Dis Rep* **47**, 245-249.
- Daub, M. E. & Ehrenshaft, M.** (2000). The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu Rev Phytopath* **38**, 461-490.
- Daub, M. E., Herrero, S. & Chung, K.-R.** (2005). Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 197-206.
- Deising, H. B., Werner, S. & Wernitz, M.** (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* **2**, 1631-1641.
- De Jong, J. C., McCormack, B. J., Smirnoff, N & Talbot, N. J.** (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244-245.
- Dekkers, K. L., You, B.-J., Gowda, V. S., Liao, H.-L., Lee, M.-H., Bau, H.-J., Ueng, P. P. & Chung, K.-R.** (2007). The *Cercospora nicotianae* gene encoding dual *O*-methyltransferase and FAD-dependent monooxygenase domains mediates cercosporin toxin biosynthesis. *Fungal Genet Biol* **44**, 444-454.
- Desjardins, A. E., Munkvold, G. P., Plattner, R. D.1 & Proctor, R. H.** (2002). *FUM1-A* Gene Required for Fumonisin Biosynthesis But Not for Maize Ear Rot and Ear Infection by *Gibberella moniliformis* in Field Tests. *Mol Plant-Microbe Interact* **15** (11), 1157-1164
- Dieckmann, R., Lee, Y.-O., van Liempt, H., von Döhren, H. & Kleinkauf, H.** (1995). Expression of an active adenylate-forming domain of peptide synthetases corresponding to acyl-CoA-synthetases. *FEBS Lett* **357** (2), 212-216.
- Dixon, R. A. & Paiva, N. L.** (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**, 1085-1097.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S. & Wang, L. J.** (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective. *Mol Plant Pathol* **3**, 371-390.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R. & Burg, G.** (1997). Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, cultur cells, plants and bacteria. *BioTechniques* **22**, 88-90.
- Dunkle, L. D., & Macko, V.** (1995). Peritoxins and their effects on sorghum. *Can J Bot* **73**, 444-452.
- Durfee, T., Nelson, R., Baldwin, S., Plunkett III, G., Burland, V., Mau, B., Petrosino, J. F., Qin, X., Muzny, D. M., Ayele, M. *et al.*** (2008). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse. *J Bacteriol* **190**, 2597-2606.

- Ehmann, D. E., Gehring, A. M. & Walsh, C. T.** (1999). Lysine Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Mechanism of α -Aminoacidpate Reductase (Lys2) Involves Posttranslational Phosphopantetheinylation by Lys5. *Biochemistry* **38** (19), 6171-6177.
- El Gueddari, N. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M. & Deising, H. B.** (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytol* **156**, 103-112.
- Elliott, C. E., Gardiner, D. M., Thomas, G., Cozijnsen, A., van de Wouw, A. & Howlett, B. J.** (2007). Production of the toxin sirodesmin PL by *Leptosphaeria maculans* during infection of *Brassica napus*. *Mol Plant Pathology* **8** (6), 791-802.
- Elovson, J. & Vagelos, P. R.** (1968). Acyl Carrier Protein. *J Biol Chem* **243** (13), 3603-3611.
- Epstein, L., Lusnak, K. & Kaur, S.** (1998). Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genet Biol* **23**, 189-203.
- Erdogan, I., Sener, B. & Higa, T.** (2000). Tryptophol, a plant auxin isolated from the marine sponge *Ircinia spinulosa*. *Biochem Syst Ecol* **28**, 793-794.
- Etschmann, M. M. W., Bluemke, W., Sell, D. & Schrader, J.** (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**, 1-8.
- Evans, G. & White, N. H.** (1966). Radicolin and radicol, two new antibiotics produced by *Cylindrocarpon radicolica*. *Trans Br Mycol Soc* **49**, 563-576.
- Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P.** (1999). Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* **6**, 775-784.
- Fawcett, C. H.** (1961). Indole auxins. *Ann Rev Plant Physiol* **12**, 345-368.
- Fichtlscherer, F., Wellein, C., Mittag, M. & Schweizer, E.** (2000). A novel function of yeast fatty acid synthase Subunit a is capable of self-pantetheinylation. *Eur J Biochem* **267**, 2666-2671.
- Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schäfer, A., Jahn, D. & Marahiel, M. A.** (2002). Characterization of a New Type of Phosphopantetheinyl Transferase for Fatty Acid and Siderophore Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **277** (52), 50293-50302.
- Finking, R., Mofid, M. R. & Marahiel, M. A.** (2004). Mutational Analysis of Peptidyl Carrier Protein and Acyl Carrier Protein Synthase Unveils Residues Involved in Protein-Protein Recognition. *Biochemistry* **43**, 8946-8956.
- Floss, Da.** (2004). Agrobacterium-vermittelte Transformation von *Colletotrichum graminicola*. Diplomarbeit, Landwirtschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Witten-berg, Halle (S), BRD.

- Flowers, J. L. & Vaillancourt, L. J.** (2005). Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Curr Genet* **48**, 380-388.
- Frederick, B. A., Ceasar-Tonthat, T.-C., Wheeler, M. H., Sheehan, K. B., Edens, W. A. & Henson, J. M.** (1999). Isolation and characterisation of *Gaeumannomyces graminis* var. *graminis* melanin mutants. *Mycological Res* **103** (1), 99-110.
- Fuganti, C., Mendoza, M., Joulain, D., Minut, J., Pedrocchi-Fantoni, G., Piergianni, V., Servi, S. & Zucchi, G.** (1996). Biogenesis and biodegradation of raspberry ketone in the fungus *Beauveria bassiana*. *J Agric Food Chem* **44** (11), 3616-3617.
- Fujii, I., Mori, Y., Watanabe, A., Kubo, Y., Tsuji, G. & Ebizuka, Y.** (1999). Heterologous expression and product identification of *Colletotrichum lagenarium* polyketide synthase encoded by the *PKS1* gene involved in melanin biosynthesis. *Biosci Biotechnol Biochem* **63**, 1445-1452.
- Fujii, I., Mori, Y., Watanabe, A., Kubo, Y., Tsuji, G. & Ebizuka, Y.** (2000). Enzymatic synthesis of 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene solely from malonyl coenzyme A by a fungal iterative type I polyketide synthase PKS1. *Biochemistry* **39** (30), 8853-8858.
- Fujimoto, H., Nagano, J., Yamaguchi, K. & Yamazaki, M.** (1998). Immunosuppressive components from an Ascomycete, *Diplogelasinospora grovesii*. *Chem Pharm Bull* **46** (3), 423-429.
- Furukawa, T., Koga, J., Adachi, T., Kishi, K. & Syono, K.** (1996). Efficient conversion of *L*-tryptophan to indole-3-acetic acid and/or tryptophol by some species of *Rhizoctonia*. *Plant Cell Physiol.* **37**, 899-905.
- Gaffoor, I., Brown, D. W., Plattner, R., Proctor, R. H., Qi, W. & Trail, F.** (2005). Functional Analysis of the Polyketide Synthase Genes in the Filamentous Fungus *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium graminearum*). *Euk Cell* **4** (11), 1926-1933.
- Garcia-Pajon, C. M. & Collado, I. G.** (2003). Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Nat Prod Rep* **20**, 426-31.
- Gehring, A. M., Lambalot, R. H., Vogel, K. W., Drucekhammer, D. G. & Walsh, C.T.** (1997). Ability of *Streptomyces* spp. acyl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates *in vitro* for *E. coli* holo-ACP synthase. *Chem Biol* **4**, 17-24.
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B. *et al.*** (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-391.
- Gilchrist, D. G. & Grogan, R. G.** (1976). Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology* **66**, 165-171.

- Giovannini, C., Straface, E., Modesti, D., Coni, E., Cantafora, A., de Vincenzi, M., Malorni, W. & Masella, R.** (1999). Tyrosol, the major olive oil biophenol, protects against oxidized-LDL induced injury in Caco-2 cells. *J Nutr* **129**, 1269-1277.
- Glawischmig, E., Tomas, A., Eisenreich, W., Spiteller, P., Bacher, A. & Gierl, A.** (2000). Auxin biosynthesis in maize kernels. *Plant Physiol* **123**, 1109-1119.
- Grant S.G., Jessee J., Bloom F.R. & Hanahan D.** (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *PNAS* **87**, 4645-4649.
- Graf, A.** (2004). Isolierung der Phosphopantetheinyl-Transferase (PPTase) aus *Colletotrichum graminicola*. Diplomarbeit, Landwirtschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (S), BRD.
- Grossman, T. H., Tuckman, M., Ellestad, S. & Osburne, M. S.** (1993). Isolation and Characterization of *Bacillus subtilis* Genes Involved in Siderophore Biosynthesis: Relationship between *B. subtilis* sfpo and *Escherichia coli* entD Genes. *J Bacteriol* **175** (19), 6203-6211.
- Grossmann, K.** (2000). Mode of action of auxin herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends Plant Sci* **5** (12), 506-508.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J. & Tresch, S.** (2001). Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *J Exp Botany* **52** (362), 1811-1816.
- Guilfoyle, T. J.** (2007). Plant biology: sticking with auxin. *Nature* **446**, 621-622.
- Guillemette, T., Sellam, A. & Simoneau, P.** (2004). Analysis of a nonribosomal peptide synthetase gene from *Alternaria brassicae* and flanking genomic sequences. *Curr Genet* **45**, 214-224.
- Guo, S. & Bhattacharjee, J. K.** (2003). Molecular characterization of the *Candida albicans* *LYS5* gene and site-directed mutational analysis of the PPTase (Lys5p) domains for lysine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 261-267.
- Guzmán-López, O., Trigos, A., Fernández, F. J., Yañez-Morales, M. J. & Saucedo-Castañeda, G.** (2007). Tyrosol and tryptophol produced by *Ceratocystis adiposa*. *World J Microbiol Biotech* **23** (10), 1473-1477.
- Haas, H., Eisendle, M., & Turgeon, G.S.** (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 149-187.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* **219** (1), 1-14.
- Heath, M. C.** (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44** (3), 321-334.

- Heerklotz, H. & Seelig, J.** (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J* **36**, 305-314.
- Heiser, I., Obwald, W. & Elstner, E. F.** (1998). The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Phys Biochem* **36**, 703-713.
- Hellwig, V., Mayer-Bartschmid, A., Muller, H., Greif, G., Kleymann, G., Zitzmann, W., Tichy, H. V. & Stadler, M.** (2003). Pochonins A-F, new antiviral and antiparasitic resorcylic acid lactones from *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*. *J Nat Prod* **66** (6) 829-837.
- Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, R., Nguyen, D. K., Aldrich, T., McAda, P. C. & Reeves, C. D.** (1999). Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol* **6**, 429-439.
- Henson, J. M., Butler, M. J. & Day, A. W.** (1999). The Dark Side of the Mycelium: Melanins of Phytopathogenic Fungi. *Annu Rev Phytopathol* **37**, 447-71.
- Herrmann, K. M. & Weaver, L. M.** (1999). The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Phys Plant Mol Biol* **50**, 473-503.
- Herrmann, M., Zoicher, R. & Haese, A.** (1996). Effect of disruption of the enniatin synthetase gene on the virulence of *Fusarium avenaceum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 226-232.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A.** (2007). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* **24**, 162-190.
- Hirota, A., Horikawa, T. & Fujiwara, A.** (1992). Isolation of phenylacetic acid from a phytopathogenic fungus, *Glomerella cingulata*. *Biosci Biotech Biochem* **57**, 492.
- Hoat, T. X., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S.** (2006). Specific cleavage of ribosomal RNA and mRNA during victorin induced apoptotic cell death in oat. *Plant J* **46**, 922-933.
- Hof, C., Eisfeld, K., Welzel, L., Antelo, A. J., Foster, H. & Anke, H.** (2007). Ferricrocin synthesis in *Magnaporthe grisea* and its role in pathogenicity. *Mol Plant Pathol* **8**, 163-172.
- Hof, C., Eisfeld, K., Antelo, L., Foster, A. J. & Anke, H.** (2009). Siderophore synthesis in *Magnaporthe grisea* is essential for vegetative growth, conidiation and resistance to oxidative stress. *Fungal Genet Biol* **46** (4), 321-332.
- Holton, T. A. & Cornish, E. C.** (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 1071-1083.
- Hooker, A. L.** (1976). Corn anthracnose leaf blight and stalk rot. *Proc Annu Corn Sorghum Res Conf* **31**, 167-182.

- Howard, R. J.** (1997). Breaching the outer barriers-cuticle and cell wall penetration. In: *The Mycota 5A Plant Relationships*, 43-60, Carroll, C., Tudzinsky, P. (eds.), Springer Verlag, New York.
- Howard, R. J. & Valent, B.** (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 491-512.
- Howlett, B. J.** (2006). Secondary metabolite toxins and nutrition of plant pathogenic fungi. *Current Opinions in Plant Biology* **9**, 371-375.
- Idnurm, A. & Howlett, B. J.** (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Mol Plant Pathology* **2** (4), 241-255.
- Ito, T.** (1983). Photodynamic agents as tools for cell biology. *Photochem Photobiol Rev* **7**, 141-86.
- Jeon, J., Park, S. Y., Chi, M. H., Choi, J., Park, J., Rho, H. S. et al.** (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nat Genet* **39** (4), 561-565.
- Johnson, R. D., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. & Kohmoto, K.** (2000). Cloning and characterization of a cyclic peptide synthetase gene from *Alternaria alternata* apple pathotype whose product is involved in AM-toxin synthesis and pathogenicity. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**, 742-753.
- Jones, T., Federspiel, N. A., Chibana, H., Dungan, J., Kalman, S. et al.** (2004). The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *PNAS* **101**, 443-457.
- Joshi, A. K., Zhang, L., Rangan, V. S. & Smith, S.** (2003). Cloning, Expression, and Characterization of a Human 4-Phosphopantetheinyl Transferase with Broad Substrate Specificity. *J Biol Chem* **278** (35), 33142-33149.
- Kaper, J. M. & H. Veldstra** (1958). *Biochim Biophys Acta* **30**, 401.
- Kasahara, T. & Kato, T.** (2003). Nutritional biochemistry: A new redox-cofactor vitamin for mammals. *Nature* **422**, 832.
- Kawamura, C., Tsujimoto, T. & Tsuge, T.** (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 59-63.
- Keating, T. A., Marshall, C. G., Walsh, C. T. & Keating, A. E.** (2002). The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol* **9**, 522-526.
- Keller, N. P., Bergstrom, G. C. & Carruthers, R. I.** (1986). Potential yield reductions in maize associated with an anthracnose/European corn borer complex in New York. *Phytopathology* **76**, 586-589.
- Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W.** (2005). Fungal secondary metabolites- from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**, 937-947.

- Keszenman-Pereyra, D., Lawrence, S., Twfieg, M.-E., Price, J. & Turner, G.** (2003). The *npgA* /*cfwA* gene encodes a putative 4'-phosphopantetheinyl transferase which is essential for penicillin biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **43**, 186–190.
- Kimura, Y., Inoue, T. & Tamura S.** (1973). Isolation of 2- pyruvaylamino benzamide as an anti auxin from *Colletotrichum lagenarium*. *Agric Biol Chem* **37**, 2213-2214.
- Kollo, I. A.** (1988). Influence of leave age on anthracnose development in *Zea mays*. MS thesis, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. & Winn, W. C.** (1997). Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, USA.
- Kono, Y., Takeuchi, S., Kawarada, A., Daly, J., & Knoche, H. W.** (1980). Studies on the host-specific pathotoxins produced by *Helminthosporium maydis* race T. *Agric Biol Chem* **44**, 2613-2622.
- Kono, Y., Takeuchi, S., Kawarada, A., Daly, J. M. & Knoche, H. W.** (1981). Studies on the host-specific pathotoxins produced in minor amounts by *Helminthosporium maydis*, race T *Bioorg Chem*, 206-218.
- Korth, K. L. & Levings III, C. S.** (1993). 3rd Baculovirus expression of the maize mitochondrial protein URF13 confers insecticidal activity in cell cultures and larvae. *PNAS* **90** (8), 3388-3392.
- Krijger, J. J., Horbach, R., Behr, M., Schweizer, P., Deising, H. B. & Wirsal, S. G.** (2008). The yeast signal sequence trap identifies secreted proteins of the hemibiotrophic corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* **21** (10), 1325-1336.
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *PNAS* **100** (26), 15670-15675.
- Kubo, Y., Takano, Y., Tsuji, G., Horino, O. & Furusawa, I.** (1999). Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation of *Colletotrichum lagenarium*. In: *Host Specificity, Pathogenicity, and Host Pathogen Interactions of Colletotrichum*, Freeman, S., Prusky, D. & Dickman, M. (eds.), St Paul, MN, USA.
- Kuo, M.-J. & Alexander, M.** (1967). Inhibition of the Lysis of fungi by melanins. *J Bacteriol* **94** (3). 624-629.
- Kuyama, S. & Tamura, T.** (1957). Cercosporin. A pigment of *Cercospora kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. I. Cultivation of fungus, isolation and purification of pigment. *J Am Chem Soc* **79**, 5725-5726.
- Kwon, H.-J., Smith, W. C., Scharon, A. J., Hwang, S. H., Kurth, M. J. & Shen, B.** (2002). C–O Bond Formation by Polyketide Synthases. *Science* **297**, 1327-30.

- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, J. R., Koglin, A. & Walsh, C. T.** (2006). Carrier Protein Structure and Recognition in Polyketide and Nonribosomal Peptide Biosynthesis. *Biochemistry* **45** (50), 14869-14878.
- Lam, E., Kato, N. & Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A. Reid, R., Khosla, C. & Walsh, C. T.** (1996). A new enzyme superfamily-the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol* **3**, 923-936.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G. & Brakhage, A. A.** (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**, 143-158.
- Lazo, G. R., Stein, P. A. & Ludwig, R. A.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**, 963-967.
- Leach, J., Lang, B. R. & Yoders, O. C.** (1982). Methods for selection of mutants and in vitro culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *J Gen Microbiol* **128**, 1719-1729.
- Lee, B., Kroken, S., Chou, D. Y. T., Robbertse, B., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (2005). Functional analysis of all nonribosomal peptide synthetases in *Cochliobolus heterostrophus* reveals a factor, NPS6, involved in virulence and resistance to oxidative stress. *Eukaryotic Cell* **4**(3), 545-555.
- Leite, B. & Nicholson, R. L.** (1992). Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Exp Mycol* **16**, 76-86.
- Leonard, K. J. & Thompson, D. L.** (1969). Corn stalk rot fungi in North Carolina. *Plant Dis Rep* **53**, 718-720.
- Levings III, C. S.** (1990). The Texas Cytoplasm of Maize: Cytoplasmic Male Sterility and Disease Susceptibility. *Science* **250**, 942-947.
- Li, Q., Khosla, C., Puglisi, J. D. & Liu, C. W.** (2003). Solution Structure and Backbone Dynamics of the Holo Form of the Frenolicin Acyl Carrier Protein. *Biochemistry* **42**, 4648-4657.
- Liao, H.-L. & Chung, K.-R.** (2008a). Cellular toxicity of elsinochrome phytotoxins produced by the pathogenic fungus, *Elsinoë fawcettii* causing citrus scab. *New Phytol.* **117**, 239-250.
- Liao, H.-L. & Chung, K.-R.** (2008b). Genetic dissection defines the roles of elsinochrome Phytotoxin for fungal pathogenesis and conidiation of the citrus pathogen *Elsinoë fawcettii*. *Mol Plant-Microbe Interact* **21** (4), 469-79.

- Lingappa, B. T., Prasad, M., Lingappa, Y., Hunt, D. F. & Biemann, K.** (1969). Phenethyl Alcohol and Tryptophol: Autoantibiotics Produced by the Fungus *Candida albicans*. *Science* **163**, 192-194.
- Liu, S. T., Katz, C. D. & Knight, C. A.** (1978). Indole-3-acetic acid synthesis in tumorous and non-tumorous species of *Nicotiana*. *Plant Physiol* **61**, 743-747.
- Liu, X. & Baird, W.** (2001). Rapid amplification of genomic DNA ends by *NlaIII* partial digestion and polynucleotide tailing. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**, 261-267.
- Lumbsch, H. T. & Huhndorf, S. M.** (2007). Outline of Ascomycota - 2007. *Myconet* **13**, 1-58.
- Ma, Y., Smith, L. H., Cox, R. J., Beltran-Alvarez, P., Arthur, C. J. & Simpson, F. R. S. T. J.** (2006). Catalytic Relationships between Type I and Type II Iterative Polyketide Synthases: The *Aspergillus parasiticus* Norsolorinic Acid Synthase. *ChemBioChem* **7** (12), 1951-1958.
- Macko, V., Stimmel, M. B., Wolpert, T. J., Dunkle, L. D., Acklin, W., Banteli, R., Jaun, B. & Arigoni, D.** (1992). Structure of the host-specific toxins produced by the fungal pathogen *Periconia circinata*. *PNAS* **89**, 9574-9578.
- MacMillan, J. & Simpson, T. J.** (1973). *J Chem Soc, Perkin Trans.* **1**, 1487-1493.
- Malonek, S., Rojas, M. C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. & Tudzynski, B.** (2004). The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 25075-25084.
- Maor, R., Haskin, S., Levi-Kedmi, H. & Sharon, A.** (2004). *In planta* production of indole-3-acetic acid by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene*. *Appl Environ Microbiol* **70** (3), 1852-1854.
- Marahiel, M. A., Danders, W., Krause, M. & Kleinkauf, H.** (1979). Biological role of gramicidin S in spore functions. Studies on gramicidin-S-negative mutants of *Bacillus brevis* ATCC 9999. *Eur J Biochem* **99**, 49-55.
- Marasas, W. F., Riley, R. T., Hendricks, K. A., Stevens, V. L., Sadler, T. W., Gelineau-van Waes, J., Missmer, S. A., Cabrera, J., Torres, O., Gelderblom, W. C., Allegood, J., Martínez, C., Maddox, J., Miller, J. D., Starr, L., Sullards, M. C., Roman, A. V., Voss, K. A., Wang, E. & Merrill, A. H. Jr** (2004). Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, and Neural Tube Development in Embryo Culture and In Vivo: A Potential Risk Factor for Human Neural Tube Defects among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *J Nutr* **134** (4), 711-716.
- Markham, J.E. & Hille, J.** (2001). Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. *Mol Plant Pathol* **2**, 229-239.

- Márquez-Fernández, O., Trigos, A., Ramos-Balderas, J. L., Viniegra-González, G., Deising, H. B. & Aguirre, J.** (2007). Phosphopantetheinyl Transferase CfwA/NpgA Is Required for *Aspergillus nidulans* Secondary Metabolism and Asexual Development. *Eukaryotic Cell* **6** (4) 710-720.
- Martin, J. P., Haider, K. & Wolf, D.** (1972). Synthesis of phenolic polymers by *Hendersonula toruloidea* in relation to humic acids formation. *Soil Sci Soc Am Proc* **36**, 311-315.
- Martinez, V. M., Osuna, J., Paredes-Lopez, O. & Guevara, F.** (1997). Production of indole-3-acetic acid by several wild-type strains of *Ustilago maydis*. *World J Microbiol Biotech* **13**, 295-298.
- Mateos, R., Domínguez, M. M., Espartero, J. L. & Cert, A.** (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J Agric Food Chem* **51**, 70-7175.
- Mei, B., Budde, A. D. & Leong, S. A.** (1993). *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *PNAS* **90** (3), 903-907.
- Mercure, E. W., Kunoh, H. & Nicholson, R. L.** (1994a). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiol Mol Plant Pathol* **45**, 407-420.
- Mercure, E. W., Leite, B. & Nicholson, R. L.** (1994b). Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiol Mol Plant Pathol* **45**, 421-440.
- Meyer, W. L., Lax, A. R., Templeton, G. E. & Branonne, M. J.** (1983). The structure of gloeosporone, a novel germination self-inhibitor from conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Tetrahedron Lett* **24**, 5059-5062.
- Moerman, D. G. & Barstead, R. J.** (2008). Towards a mutation in every gene in *Caenorhabditis elegans*. *Brief Funct Genomic Proteomic* **7**, 195-204.
- Mofid, M. R., Finking, R. & Marahiel, M. A.** (2002). Recognition of hybrid peptidyl carrier proteins/acyl carrier proteins in nonribosomal peptide synthetase modules by the 4'-phosphopantetheinyl transferases AcpS and Sfp. *J Biol Chem* **277**, 17023-17031.
- Mofid, M. R., Finking, R., Essen, L. O. & Marahiel, M. A.** (2004). Structure-Based Mutational Analysis of the 4-Phosphopantetheinyl Transferases Sfp from *Bacillus subtilis*: Carrier Protein Recognition and Reaction Mechanism. *Biochemistry* **43**, 4128-4136.
- Money, N. P.** (1989). Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. Relationship between molecular weight and vapour pressure deficit. *Plant Physiol* **91**, 766-769.

- Money, N. P., Caesar-Thon That, T. C., Frederick, B. & Henson, J. M.** (1998). Melanin synthesis is associated with changes in hyphopodial turgor, permeability, and wall rigidity in *Gaeumannomyces graminis* var. *Graminis*. *Fungal Genet Biol* **24** (12), 240-251.
- Moore, B. S. & Hertweck, C.** (2001). Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units. *Nat Prod Rep* **19**, 70-99.
- Mootz H. D., Finking, R. & Marahiel, M. A.** (2001). 4-Phosphopantetheine Transfer in Primary and Secondary Metabolism of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **276** (40), 37289-37298.
- Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A.** (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem* **3**, 490-504.
- Mumba-Kankolongo, A.** (1991). Nature of resistance to anthracnose stalk rot associated with maize genotype, ontogeny, and wound response. Ph. D. diss Cornell University, Ithaca, NY, USA.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N. & Deising, H. B.** (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J Plant Physiol* **165**(1), 41-51.
- Nakano, M. M., Corbell, N., Besson, J. & Zuber, P.** (1992). Isolation and characterization of *sfp*: a gene that functions in the production of the lipopeptide biosurfactant, surfactin, in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **232**, 313-321.
- Navarre, D.A. & Wolpert, T. J.** (1995). Inhibition of the glycine decarboxylase multienzyme complex by the host-selective toxin, victorin. *Plant Cell* **7**, 463-471.
- Navarre, D.A. & Wolpert, T.J.** (1999). Victorin induction of an apoptosis/senescence-like response in oats. *Plant Cell* **11**, 237-249.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O. & Jones, J. D. G.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**, 436-439.
- Neville, C., Murphy, A., Kavanagh, K. & Doyle, S.** (2005). A 4'-Phosphopantetheinyl Transferase Mediates Non-Ribosomal Peptide Synthetase Activation in *Aspergillus fumigatus*. *Chem Bio Chem* **6**, 679-685.
- Nicholson, R. L., Turpin, C. A. & Warren, H. L.** (1976). Role of pectic enzymes in susceptibility of living maize pith to *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathologische Zeitschrift* **87**, 324-336.
- Nicholson, R. L. & Moraes, W. B. C.** (1980). Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. *Phytopathology* **70**, 255-261.
- 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. & Hammerschmidt, R.** (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol* **30**, 369-389.
- Nicholson, R. L.** (1996). Adhesion of Fungal Propagules: Significance to the success of the fungal infection process. In *Histology, Ultrastructure and Molecular Cytology of Plant-Microorganism Interactions*, 117-134, M. Nicole & V. Gianinazzi-Pearson, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
- Nikolskaya, A. N., Panaccione, D. G., & Walton, J. D.** (1995). Identification of peptide synthetase-encoding genes from filamentous fungi producing host-selective phytotoxins or analogs. *Gene* **165**, 207-211.
- Noël, G. M. A. M., Madrida, E. A., Bottinib, R. & Lamattinaa, L.** (2000). Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. *Plant Physiol Biochem* **39**, 815-823.
- Noller, H. F.** (1991). Ribosomal RNA and translation. *Annu Rev Biochem* **60**, 191-227.
- Normanly, J.** (1997). Auxin metabolism. *Physiol Plant* **100**, 431-442.
- Nosanchuk, J.D. & Casadevall, A.** (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* **5**(4), 203-223.
- Nowara, D.** (2008). Pflanzenvermittelte Unterdrückung der Genexpression in *Blumeria graminis*: Eine neuartige Methode zur Erzeugung von Resistenz. Dissertation, Landwirtschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (S), BRD.
- Oberegger, H., Eisendle, M., Schrettl, M., Graessle, S. & Haas, H.** (2003). 4-Phosphopantetheinyl transferase-encoding *npgA* is essential for siderophore biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **44**, 211-215.
- Ohra, J., Morita, K., Tsujino, Y., Tazaki, H., Fujimori, T., Goering, M., Evans, S. & Zorner, P.** (1995). Production of the phytotoxic metabolite, ferricrocin, by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **59**, 113-114.
- Oide, S., Krasnoff, S. B., Gibson, D. M. & Turgeon, B. G.** (2007). Intracellular Siderophores Are Essential for Ascomycete Sexual Development in Heterothallic *Cochliobolus heterostrophus* and Homothallic *Gibberella zae*. *Eukaryot Cell* **6**, 1339-1353.
- Packter, N. M.** (1969). Studies on the biosynthesis of phenols in fungi. Production of 4 methoxytoluquinol, epoxy succinic acid and a diacetylenic alcohol by surface cultures of *Lentinus degener* I.M.I. 110525. *Biochem J* **114**, 369-377.
- Panaccione, D. G., McKiernan, M. & Hanau, R. M.** (1988). *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous Benomyl-resistance genes retains expected pathogenicity to corn. *Mol Plant-Microbe Interact* **1**, 113-120.

- Panaccione, D. G., Vaillancourt, L. J. & Hanau, R. M.** (1989). Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **81**, 876-883.
- Park, P., Nishimura, S., Kohmoto, K., Otani, H. & Tsujimoto, K.** (1981). Two action sites of AM-toxin I produced by apple pathotype of *Alternaria alternata* in host cells: an ultrastructural study. *Can J Bot.* **59**, 301-310.
- Parris, K. D., Lin, L., Tam, A., Mathew, R., Hixon, J., Stahl M., Fritz, C. C., Seehra, J. & Somers, W. S.** (2000). Crystal structures of substrate binding to *Bacillus subtilis* holo-(acyl carrier protein) synthase reveal a novel trimeric arrangement of molecules resulting in three active sites. *Structure* **8** (8), 883-895.
- 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*. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**, 37-51.
- Perkins, J. M. & Hooker, A. L.** (1979). The effects of anthracnose stalk rot on corn yields in Illinois. *Plant Dis Rep* **63**, 26-30.
- Pfeifer, B. A. & Khosla, C.** (2001). Biosynthesis of Polyketides in Heterologous Hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* **65** (1), 106-118.
- Praphanphoj, V., Sacksteder, K. A., Gould, S. J., Thomas, G. H. & Geraghty, M. T.** (2001). Identification of the α -Amino adipic Semialdehyde Dehydrogenase-Phosphopantetheinyl Transferase Gene, the Human Ortholog of the Yeast *LYS5* Gene. *Molecular Genetics and Metabolism* **72**, 336-342.
- Punt, P. J., Oliver, R. P., Dingemase, M. A., Pouwels, P. H. & van den Hondel C. A. M. J. J.** (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117-124.
- Quadri, L. E. N., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P. & Walsh, C. T.** (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* Phosphopantetheinyl Transferase for Peptidyl Carrier Protein Domains in Peptide Synthetases. *Biochemistry* **37**, 1585-1595.
- Raguso, R. A. & Roy, B. A.** (1998). 'Floral' scent production by *Puccinia* rust fungi that mimic flowers. *Mol Ecology* **7**, 1127-1136.
- Ramakers, C., Ruijter, C. M., Deprez, R. H. L. & Moorman, A. F. M.** (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters* **339**, 62-66.
- Rasmussen, J. B. & Hanau, R. M.** (1989). Exogenous scytalone restores appressorial melanization and pathogenicity in albino mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Can J Plant Pathol* **11**, 349-352.
- Ratledge, C. & Dover, L. G.** (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**, 881-941.

- Rees, D. O., Bushby, N., Cox, R. J., Harding, J. R., Simpson, T. J. & Willis, C. L.** (2007). Synthesis of [1,2-¹³C₂,¹⁵N]-L-Homoserine and Its Incorporation by the PKS-NRPS System of *Fusarium moniliforme* into the Mycotoxin Fusarin. *ChemBioChem* **8**, 46-50.
- Rehnstrom, A. L. & Free, S. J.** (1996). The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Monilinia fructicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* **49**, 321-30.
- Reineke, G., Heinze, B., Schirawski, J., Buettner, H., Kahmann, R. & Basse, C., W.** (2008). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation, *Mol Plant Pathol* **9**, 339-355.
- Reuter, K., Mofid, M. R., Marahiel, M. A. & Ficner, R.** (1999). Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily. *EMBO* **18** (23), 6823-6831.
- Rey, P., Leucart, S., Désilets, H., Bélanger, R. R., Larue, J. P., & Tirilly, Y.** (2001). Production of indole-3-acetic acid and tryptophol by *Pythium ultimum* and *Pythium* group F: possible role in pathogenesis. *Eur J Plant Pathology* **107**, 895-904.
- Richardt, A., Kemme, T., Wagner, S., Schwarzer, D., Marahiel, M. A. & Hovemann, B. T.** (2003). Ebony: a novel nonribosomal peptide synthetase for α -alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*. *J Biol Chem* **278** (42), 41160-41166.
- Roberge, G. & Brassard, P.** (1981). Reactions of ketene acetals. 13. Synthesis of contiguously trihydroxylated naphtho- and anthraquinones. *J Org Chem* **46**, 4161-4166.
- Ronald, R.C. & Gurusiddaiah, S.** (1980). Grahamimycin A1: a novel dilactone antibiotic from cytospora. *Tetrahedron Lett* **21**, 681-684.
- Roberts, C. S., Rajagopal, S., Smith, L. A., Nguyen, T. A., Yang, W., Nuroho, S., Ravi, K. S., Cao, M.-L., Vijayachandra, K., Patell, V., Harcourt, R., Dransfield, L., Desamero, N., Slamet, I., Keese, P., Kilian, A., & Jefferson, R. A.** (1998). A comprehensive set of modular vectors for advanced manipulations and efficient transformation of plants by both *Agrobacterium* and direct DNA uptake methods. pCAMBIA Vector release manual version 3.05. CAMBIA. Canberra, Australia.
- Robinson, M., Riov, J. & Sharon, A.** (1998). Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Colletotrichum gloeosporioides f. sp. aeshynomene*, *Appl Environ Microbiol* **64**, 5030-5032.
- Rosazza, J. P., Juhl, R. & Davis, P.** (1973). Tryptophol formation by *Zygosaccharomyces priorianus*. *Appl Microbiol* **26**, 98-105.
- Rose, M. S., Yun, S. H., Asvarak, T., Lu, S. W., Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (2002). A decarboxylase encoded at the *Cochliobolus heterostrophus* translocation-associated *Tox1B* locus is required for polyketide biosynthesis and high virulence on maize. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 883-893.

- Rukachaisirikul, V., Sommart, U., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Rungjindamai, N. & Sakayaroj, J.** (2007). Metabolites from the Xylariaceous Fungus PSU-A80. *Chem Pharm Bull* **55** (9), 1316-1318.
- Samel, S. A., Schoenafinger, G., Knappe, T. A., Marahiel, M. A. & Essen, L.-O.** (2007). Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure* **15**, 781-792.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467.
- Sawamura, K.** (1990) Alternaria blotch. In: Jones, A. L., Aldwinckle, H. (eds) *Compendium of apple and pear diseases*. APS Press, St. Paul, Minn., USA, 24-25.
- Schachtschabel, D., David, A., Menzel, K.-D., Schimek, C., Wöstemeyer, J. & Boland, W.** (2008). Cooperative Biosynthesis of Trisporoids by the (+) and (-) Mating Types of the Zygomycete *Blakeslea trispora*. *Chem Bio Chem* **9** (18), 3004-30012.
- Schadeck, R. J. G., Randi, M. A. F., de Freitas Buchi, D. & Leite, B.** (2003). Vacuolar system of ungerminated *Colletotrichum graminicola* conidia: convergence of autophagic and endocytic pathways. *FEMS Microbiol Lett* **218**, 277-283.
- Scheffer, R. P., Nelson, R. R. & Ullstrup, A. J.** (1967). Inheritance of toxin production and pathogenicity in *Cochliobolus carbonum* and *Cochliobolus victoriae*. *Phytopathology* **57**, 1288-1289.
- Schneider, A. & Marahiel, M. A.** (1998). Genetic evidence for a role of thioesterase domains, integrated in or associated with peptide synthetases, in non-ribosomal peptide biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **169**, 404-410.
- Schwecke, T., Göttling, K., Durek, P., Dueñas, I., Käufer, N. F., Zock-Emmenthal, N., Staub, E., Neuhof, T., Dieckmann, R. & von Döhren, H.** (2006). Nonribosomal Peptide Synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architecture of ferrichrome type siderophore synthetases in fungi. *ChemBioChem* **7**, 612-622.
- Selles, P.** (2005). Synthesis and Biological Evaluation of Himanimide C and Unnatural Analogues. *Org Lett* **7** (4), 605-608.
- Sentheshanmuganathan, S. & Elden, S. R.** (1958). The mechanism of the formation of tyrosol by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **69** (2), 210-218.
- Serfling, A., Wohlrab, J. & Deising, H. B.** (2007). Treatment of a clinically relevant plant pathogenic fungus with an agricultural azole causes cross-resistance to medical azoles and potentiates caspofungin efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3672-3676.
- Serp, D., von Stockar, U. & Marison, I. W.** (2003). Enhancement of 2-phenylethanol productivity by *Saccharomyces cerevisiae* in two-phase fed-batch fermentations using solvent immobilization. *Biotechnol Bioeng* **82**, 103-110.

Seshime, Y., Juvvadi, P. R., Fujii, I. & Kitamoto, K. (2005). Discovery of a novel superfamily of type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 253-260.

Shen, B. (2000). Biosynthesis of Aromatic Polyketides. *Top Curr Chem* **209**, 1-51.

Shilts, T., Ertürk, Ü., Patel, N. J. & Chung, K.-R. (2005). Physiological regulation of biosynthesis of phytohormone indole-3-acetic acid and other indole derivatives by the citrus fungal pathogen *Colletotrichum acutatum*. *J Biol Sci* **5**, 205-210.

Shimada, A., Takeuchi, S., Nakajima, A., Tanaka, S., Kawano, T. & Kimura, Y. (2000). Phytotoxicity of indole-3-acetic acid produced by the fungus, *Pythium aphanidermatum*. *Biosci Biotechnol Biochem* **64** (1), 187-189.

Shimizu, T., Kinoshita, H., Ishihara, S., Sakai, S., Nagai, S & Nihira, T. (2005). Polyketide synthase gene responsible for citrinin biosynthesis in *Monascus purpureus*. *Appl Environ Microbiol* **7**, 3453-3457.

Shimomura, N., Park, P., Otani, H., Kodama, M., Kohmoto, K. & Ohno, T. (1993). Leakage sites of electrolytes from susceptible apple leaf cells treated with AM-toxin I of *Alternaria alternata* apple pathotype. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **59**, 563-567.

Shute, T. S., Matsushita, M., Dickerson, T. J., La Clair, J. J., Janda, K. D. & Burkart, M. D. (2005). A Site-Specific Bifunctional Protein Labeling System for Affinity and Fluorescent Analysis. *Bioconjugate Chem* **16**, 1352-1355.

Sieber, S. A., Linne, U., Hillson, N. J., Roche, E., Walsh, C. T. & Marahiel, M. A. (2002). Evidence for a Monomeric Structure of Nonribosomal Peptide Synthetases. *Chem Biol* **9**, 997-1008.

Sieber, S. A. & Marahiel, M. A. (2005). Molecular Mechanisms Underlying Nonribosomal Peptide Synthesis: Approaches to New Antibiotics. *Chem Rev* **105**, 715-738.

Siedow, J. N., Rhoads, D. M., Ward, G. C. & Levings III, C. S. (1995). The relationship between the mitochondrial gene T-urf 13 and fungal pathotoxin sensitivity in maize. *Biochim Biophys Acta* **1271**, 135-140.

Skoropad, W. P. (1967). Effect of temperature on the ability of *Colletotrichum graminicola* to form appressoria and penetrate barley leaves. *Can J Plant Sci* **47**, 431-434.

Smedsgaard, J. & Nielsen, J. (2005). Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. *J Exp Bot* **56** (410), 273-86.

Solomon, P. S., Tan, K.-C., Sanchez, P., Cooper, R. M. & Oliver, R. P. (2004). The Disruption of a Gá Subunit Sheds New Light on the Pathogenicity of *Stagonospora nodorum* on Wheat. *Mol Plant-Microbe Interact.* **17** (5), 456-466.

Song, Z., Cox, R. J., Lazarus, C. M. & Simpson, T. J. (2004). Fusarin C Biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *ChemBioChem* **5**, 1196-1203.

- Southard, S. B. & Cihlar, R. L.** (1995). Analysis and expression of the *Candida albicans* FAS2 gene. *Gene* **156** (1), 133-138.
- Spaepen, S., Vanderleyden, J. & Remans, R.** (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 425-448.
- Staunton, J. & Weissman, K. J.** (2001). Polyketide biosynthesis: A millennium review. *Nat Prod Rep* **18**, 380-416.
- Steiner, U. Oerke, E.-C.** (2007). Localized Melanization of Appressoria Is Required for Pathogenicity of *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **97** (10), 1222-1230.
- Stoessl, A. & Stothers, J. B.** (1986). Colletruncoic acid methyl ester, a unique meroterpenoid from *Colletotrichum truncatum*. *Z Naturforsch* **41** (7-8), 677-680.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A.** (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* **189** (1), 113-30.
- Studier, F.W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W.** (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol* **185**, 60-89.
- Stuible, H.-P., Meier, S., Wagner, C., Hannappel, E. & Schweizer, E.** (1998). A Novel Phosphopantetheine: Protein Transferase Activating Yeast Mitochondrial Acyl Carrier Protein. *J Biol Chem* **273** (35), 22334-22339.
- Sugawara, F. & Strobel, G.A.** (1987). Tryptophol, a phytotoxin produced by *Drechslera nodulosum*. *Phytochem* **26**, 1349-1351.
- Sugui, J. & Deising, H. B.** (2002). Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. *Mol Plant Pathol* **3**, 197-203.
- Sukno, S. A., Garcia, V. M., Shaw, B. D. & Thon, M. R.** (2008). Root Infection and Systemic Colonization of Maize by *Colletotrichum graminicola*. *Appl Environ Microbiol* **74** (3), 823-832.
- Sumarah, M. W., Puniani, E., Blackwell, B. A. & Miller, J. D.** (2007). Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. *J Nat Prod* **71** (8), 1393-1398.
- Sutton, B. C.** (1980). The coelomycetes: Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli, and stromata. Commonwealth Mycological Institute Publications, Kew, UK.
- Tada, Y., Kusaka, K., Betsuyaku, S., Shinogi, S., Sakamoto, M., Ohura, Y., Hata, S., Mori, T., Tosa, Y. & Mayama, S.** (2005). Victorin triggers programmed cell death and the defense response via interaction with a cell surface mediator. *Plant Cell Physiol* **46** (11), 1787-1798.

- Takano, Y., Kubo, Y., Kuroda, I. & Furusawa, I.** (1997). Temporal transcriptional pattern of three melanin biosynthesis genes, *PKS1*, *SCD1*, and *THR1*, in appressorium-differentiating and nondifferentiating conidia of *Colletotrichum lagenarium*. *Appl Environ Microbiol* **63** (1), 351-354.
- Talbot, N. J.** (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 177-202.
- Tang, W., Coughlan, S., Crane, E., Beatty, M. & Duvick, J.** (2006). The Application of Laser Microdissection to In Planta Gene Expression Profiling of the Maize Anthracnose Stalk Rot Fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* **19** (11), 1240-1250.
- Tanovic, A., Samel, S. A., Essen, L.-O. & Marahiel, M. A.** (2008). Crystal Structure of the Termination Module of a Nonribosomal Peptide Synthetase. *Science* **321**, 659-662.
- Tezuka, Y., Huang, Q., Kikuchi, T., Nishi, A. & Tubaki, K.** (1994). Metabolites of *Cladobotryum varium*. *Chem Pharm Bull* **42** (12), 2612-2617.
- Thines, E., Aguirre, J., Foster, A. J. & Deising, H. B.** (2006). Genetics of phytopathology-secondary metabolites as virulence determinants of fungal plant pathogens. In: *Progress in botany*. Springer, Bd. **67**. (2), 134-161.
- Thomas, R.** (2001). A biosynthetic classification of fungal and streptomycete fused-ring aromatic polyketides. *ChemBioChem* **2**, 612-627.
- Thon, M. R., Nuckles, E. M. & Vaillancourt, L. J.** (2000). Restriction Enzyme-Mediated Integration Used to Produce Pathogenicity Mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* **13** (12), 1356-1365.
- Thon, M. R., Nuckles, E. M., Takach, J. E. & Vaillancourt, L. J.** (2002). CPR1 : a gene encoding a putative signal peptidase that functions in pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* to maize. *Mol Plant-Microbe Interact* **15**, 120-128.
- Trifonov, L. S., Ghakravarty, P., Hiratsuka, Y. & Ayer, W. A.** (1992). Antifungal activity of metabolites of *Peniophora polygonia* against the aspen decay fungus *Phellinus tremulae*. *Eur J For Path* **22**, 441-448.
- Tsai, S.-C., Lu, H., Cane, D. E., Khosla, C. & Stroud, R. M.** (2002). Insights into channel architecture and substrate specificity from crystal structures of two macrocycle-forming thioesterases of modular polyketide synthases. *Biochemistry* **41**, 12598-12606.
- Tsurushima, T., Ueno, T., Fukami, H., Irie, H. & Inoue, M.** (1995). Germination self inhibitors from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *jussiaea*. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**, 652-657.
- Tuomi, T., Ilvesoksa, J., Laakso, S. & Rosenqvist, H.** (1993). Interaction of Abscisic Acid and Indole-3-Acetic Acid-Producing Fungi with *Salix* Leaves. *J Plant Growth Regul* **12**, 149-156.

- Turgeon, B. G. & Lu, S-W.** (2000). Evolution of host specific virulence in *Cochliobolus heterostrophus*. Fungal Pathology, 93-126, Kronstad, J. W. (ed.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Turgay, K., Krause, M. & Marahiel, M. A.** (1992). Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. Mol Microbiol **6**, 529-546.
- Ueno, T., Nakashima, T., Hayashi, Y. & Fukami, H.** (1975). Structures of AM-toxin I and II, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria mali*. Agric Biol Chem **39**, 1115-1122.
- Valenzano, D.P. & Pooler, J.P.** (1987). Photodynamic action. Cell membranes are critical targets for damage by photosensitizing compounds. BioScience **37**, 270-276.
- Vallejos, R. H., Andreo, C. S. & Ravizzini, R. A.** (1975). Divalent-Cation Ionophores and Ca²⁺ Transport in Spinach Chloroplasts. FEBS Letters **50** (2), 245-249.
- Van Lanen, S. G. & Shen, B.** (2008). Advances in polyketide synthase structure and mechanism. Curr Opin Drug Discov Develop **11**, 186-195.
- Verachtert, H. & Hanssens, L.** (1975). Isolation and identification of phenolic substances from the fungus *Penicillium spinulosum*. Ann Microbiol (Paris), **126** (2), 143-149.
- Venard, C. & Vaillancourt, L.** (2007). Penetration and colonization of unwounded maize tissues by the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola* and the related nonpathogen *C. sublineolum*. Mycologia **99** (3), 368-377.
- Venkitasubramanian, P., Daniels, L. & Rosazza, J. P. N.** (2007). Reduction of Carboxylic Acids by *Nocardia* Aldehyde Oxidoreductase Requires a Phosphopantetheinylated Enzyme. J Biol Chem **282** (1), 478-485.
- Vining, L. C.** (1990). Functions of secondary metabolites. Annu Rev Microbiol **44**, 395-427.
- Wallner, A., Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H. & Haas, H.** (2009). Ferricrocin, a Siderophore Involved in Intra- and Transcellular Iron Distribution in *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol **75** (12), 4194-4196.
- Walsh, C. T., Gehring, A. M., Weinreb, P. H., Quadri, L. E. & Flugel, R. S.** (1997). Posttranslational modification of peptide synthases polyketide and nonribosomal peptide synthases. Current Opinion in Chemical Biology **1**, 309-315.
- Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbard, B. K., Losey, H. C., Luo, L., Marshall, C. G., Miller, D. A., Patel, H. M.** (2001). Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. Curr Opin Chem Biol **5** (5), 525-34.
- Walton, J. D.** (2006). HC-Toxin. Phytochemistry **67** (14), 1406-13.

- Ward, M. & Turner, G.** (1986). The ATP synthase subunit 9 gene of *Aspergillus nidulans*: sequence and transcription. *Mol Gen Genet* **205** (2), 331-338.
- Watanabe, K., Rude, M. A., Walsh, C. T. & Khosla, C.** (2003). Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. *PNAS* **100** (17), 9774-9778.
- Wattad, C., Freeman, S., Dinoor, A. & Prusky, D.** (1995). A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 621-626.
- Weiergang, I., Dunkle, L. D., Wood, K. V. & Nicholson, R. L.** (1996). Morphogenic Regulation of Pathotoxin Synthesis in *Cochliobolus carbonum*. *Fungal Genet Biol* **20** (1), 74-78.
- Weissman, K. J., Hong, H., Oliynyk, M., Siskos, A. P. & Leadlay, P. F.** (2004). Identification of a Phosphopantetheinyl Transferase for Erythromycin Biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *ChemBioChem* **5**, 116-125.
- Weissman, K. J. & Leadlay, P. F.** (2005). Combinatorial biosynthesis of reduced polyketides. *Nat Rev Microbiol* **3** (12), 925-36.
- Werner, S., Sugui, J. A., Steinberg, G. & Deising, H. B.** (2007). A Chitin Synthase with a Myosin-Like Motor Domain Is Essential for Hyphal Growth, Appressorium Differentiation, and Pathogenicity of the Maize Anthracnose Fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol Plant- Microbe Interact* **20** (12), 1555-1567.
- Wernitz, M.** (2004). Isolierung des Proteinkinasegens *snf1* aus *Colletotrichum graminicola* und ihre Bedeutung für die Pathogenese. Dissertation, Landwirtschaftliche Fakultät, Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg, Halle (S), BRD.
- Wheeler, H., Politis, D. J. & Poneleit, C. G.** (1974). Pathogenicity, host range, and distribution of *Colletotrichum graminicola* on corn. *Phytopathology* **64**, 293-296.
- White, D.G., Yanney, J & Natti, T. A.** (1979). Anthracnose stalk rot. *Proc Annu Corn Sorghum Res Conf* **34**, 1-15.
- Wilson, G. W.** (1914). The identity of the anthracnose of grasses in the United States. *Phytopathology* **4**, 106-112.
- Wilson, R. A. & Talbot, N. J.** (2009). Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nature Rev Microbiol* **7** (3), 185-195.
- Winssinger, N. & Barluenga, S.** (2006). Chemistry and biology of resorcylic acid lactones. *Chem Commun* **7** (1), 22-36.
- Wirsal, G. R., Reimann, S. & Deising, H. B.** (2004). Genetics of phytopathology: fungal morphogenesis and plant infection, *Prog Bot* **65**, 147-178.
- Wolpert, T. J., Dunkle, L. D. & Ciuffetti, L. M.** (2002). Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annu Rev Phytopathol* **40**, 251-285.

- Woodward, A. W. & Bartel, B.** (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond.)* **95**, 707-735.
- Xu, H., Andi, B., Qian, J., West, A. H. & Cook, P. F.** (2007). The α -aminoadipate pathway for lysine biosynthesis in fungi. *Cell Biochem Biophysics* **46** (1), 43-64.
- Yang, G., Rose, M. S., Turgeon, B. G. & Yoder, O. C.** (1996). A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *Plant Cell* **8**, 2139-2150.
- Yin, J., Straight, P. D., McLoughlin, S. M., Zhou, Z., Lin, A. J., Golan, D. E., Kelleher, N. L., Kolter, R. & Walsh, C. T.** (2005). Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. *PNAS* **102** (44), 15815-15820.
- Yoder, O. C. & Turgeon, B. G.** (2001). Fungal genomics and pathogenicity. *Curr Opin Plant Biol* **4** (4), 315-321.
- Yoder, O. C., Macko, V., Wolpert, T. J. & Turgeon, B. G.** (1997). *Cochliobolus* spp. and their host-specific toxins. in: *The Mycota 5: Plant Relationships, Part A*, 145-166, Carroll, G. & Tudzynski, P. (eds.) Springer-Verlag, Berlin.
- Yu, J.-H., Hamari, Z., Han, K.-H., Seo, J.-A., Reyes-Domínguez, Y. & Scazzocchio, C.** (2004). Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Gen Biol* **41** (11), 973-981.
- Zhang, J., Van Lanen, S. G., Ju, J., Liu, W., Dorrestein, P. C., Li, W., Kelleher, N. L. & Shen, B.** (2007). A phosphopantetheinylating polyketide synthase producing a linear polyene to initiate enediyne antitumor antibiotic biosynthesis. *PNAS* **105** (5) 1460-1465.
- Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D. & Chory, J.** (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* **291**, 306-309.
- Zhong, J., Frases, S., Wang, H., Casadevall, A. & Stark, R. E.** (2008). Following fungal melanin biosynthesis with solid-state-NMR: biopolymer molecular structures and possible connections to cell-wall polysaccharides. *Biochem* **47**, 4701-4710.
- Zhou, H., Zhan, J., Watanabe, K., Xie, X. & Tang, Y.** (2008). A polyketide macrolactone synthase from the filamentous fungus *Gibberella zeae*. *PNAS* **105** (17), 6249-6254.
- Zhu, X., Vogeler, C & Du., L.** (2008). Functional Complementation of Fumonisin Biosynthesis in *FUM1*-Disrupted *Fusarium Verticillioides* by the AAL-Toxin Polyketide Synthase Gene *ALT1* from *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. *J Nat Prod* **71**, 957-960.
- Zou, W. X., Meng, J. C., Lu, H., Chen, G. X., Shi, G. X., Zhang, T. Y. & Tan, R. X.** (2000). Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *J Nat Prod* **63**, 1529-1530.

VII Anhang

Abbildungsnachweis

Abb. 1: Infektion von *Zea mays* durch *Colletotrichum graminicola*

Bild A: unbekannte Quelle

Bild B: Copyright by The American Phytopathological Society Press

Bild C: Dr. Jim Stack, Kansas State University

Bild D: Dr. Jim Stack, Kansas State University

Abb. 33: Bedeutung von Melanin für die Penetrationskompetenz von Appressorien

Bilder WT 24 h, 30 h, 34 h und KO 32 h: Nancy Ludwig, Universität Halle-Wittenberg

Abb. 36: CgPPT1 ist ein zentraler Regulator der Pathogenität

Handzeichnung von D. Deising

Abb. 37: AlphaScreen-Assay

PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA

Die Quellen von Abbildungen aus wissenschaftlichen Publikationen wurden in der Bildunterschrift angegeben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 25. August 2009

Danksagung

Herrn Prof. Dr. H. B. Deising danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen Anregungen, das freundliche Arbeitsklima und für die Freiheiten, die er mir während der Durchführung des Projekts eingeräumt hat.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Humbeck und Frau Prof. Dr. Erika Kothe für die Bereitschaft, die vorliegende Arbeit zu begutachten.

Ein großes Dankeschön geht an alle, die durch praktische Mitarbeit zum Gelingen des umfangreichen Projekts beigetragen haben. Anja Meffert danke ich für die Durchführung von HPLC/MS-Analysen, Dr. A. Schierhorn für die Peptidanalyse mit Hilfe von MALDI-TOF/MS-Messungen, H. Kolshorn und Dr. V. Sinnwell für die Durchführung der NMR-Messungen, Dr. N. Hanold und Dr. S. Franke für die Analyse der Reinsubstanzen mittels High Resolution Mass Spectrometry, Johannes C. Liermann und Prof. Dr. Till Opatz für die Aufklärung der Strukturen der fungalen Metabolite sowie die Charakterisierung der physikalischen Eigenschaften der isolierten Reinsubstanzen, L. Antelo und M. Becker für die Identifizierung von Siderophoren, S. Mathea für die Unterstützung bei der Reindarstellung von Proteinen, A. Schöffler für hilfreiche Hinweise im Zusammenhang mit der Isolierung von Naturstoffen, Eckhard Thines für die Bereitstellung von Pilzextrakten, D. Deising für das gezeichnete Kunstwerk (Abb. 36) und N. Benner für ihre hervorragende technische Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Phytopathologie und Pflanzenschutz danken, besonders Fabian Weihmann für die arbeitsintensive Betreuung des Projekts ab Januar 2009, Andrea Beutel und Doris Jany für ihre exzellente technische Unterstützung.

Nicht zuletzt gilt mein Dank der finanziellen Förderung des Projekts durch die Volkswagenstiftung und das Kultusministerium von Sachsen-Anhalt.

Lebenslauf

1. PERSÖNLICHE DATEN

Name: Ralf Horbach
geboren: 5. November 1977 in Karl-Marx-Stadt
Anschrift: Gutenbergstraße 12
67663 Kaiserslautern

2. AUSBILDUNG

1984 - 1992 Horst-Menzel-Oberschule, Chemnitz
1992 - 1994 A.- v.- Humboldt-Mittelschule, Chemnitz
1994 - 1997 Berufliches Schulzentrum für Wirtschaft II, Chemnitz
1997 - 1998 Grundwehrdienst
1998 - 2004 Studium der Biologie an der Universität Halle-Wittenberg
Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie und Pflanzenschutz
Thema: Strobilurin induzierte Genexpression in *Colletotrichum graminicola*

3. PROMOTION

2005 - 2008 Doktorand am Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz,
Bereich Phytopathologie und Pflanzenschutz der Universität Halle-
Wittenberg

4. BERUF

seit Januar 2009 wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Biotechnologie- und
Wirkstoff-Forschung (IBWF e. V.) in Kaiserslautern

Unterschrift

Kaiserslautern, den 19. 09. 2009

Publikationen

The Yeast Signal Sequence Trap Identifies Secreted Proteins of the Hemibiotrophic Corn Pathogen *Colletotrichum graminicola*

Jorrit-Jan Krijger, Ralf Horbach, Michael Behr, Patrick Schweizer, Holger B. Deising, Stefan G. R. Wirsal; *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2008, 21(10), 1325-1336.

A Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity

Ralf Horbach, Alexander Graf, Fabian Weihmann, Luis Antelo, Sebastian Mathea, Johannes C. Liermann, Till Opatz, Eckhard Thines, Jesus Aguirre, Holger B. Deising; *The Plant Cell*, im Druck

Adaptation to Tebuconazol and Picoxystrobin differentially affects sterol composition of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*

Ulrike Ahmetovic, Martin Giera, Ralf Horbach, Franz Bracher, Holger B. Deising; in Vorbereitung

Melanine protects *Colletotrichum graminicola* appressoria against hydrolytic enzymes

Ralf Horbach, Nancy Ludwig, Holger B. Deising; in Vorbereitung

Buchbeiträge

The molecular basis of adaptation to fungicides in plant pathogenic *Colletotrichum* species

M. C. Mielke, E. Melzer, A. Serfling, U. Ahmetovic, R. Horbach, S. Reimann, J. Wohlrab, B. Dräger, H. B. Deising; *Modern Fungicides and Antifungal Compounds* (Editors H.-W. Dehne *et al.*)