

**Identifizierung und Charakterisierung von putativen
Virulenzfaktoren des Gerstenpathogens
*Rhynchosporium commune***

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften -

der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Claudia Wenzel, geb. Böhm

geb. am 27.11.1980 in Leipzig

Gutachter:

Prof. Dr. Dierk Scheel

Prof. Dr. Gary Sawers

Prof. Dr. Michael Bölker

Datum der Verteidigung: 3. März 2014

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	ix
Abkürzungsverzeichnis	xi
1. Einleitung	1
1.1. Die Gattung <i>Rhynchosporium</i>	1
1.2. Das Pathosystem <i>Hordeum vulgare</i> und <i>Rhynchosporium commune</i>	2
1.3. Virulenzfaktoren phytopathogener Organismen	3
1.4. Virulenzfaktoren von <i>Rhynchosporium</i>	10
1.5. Zielstellung	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Materialien	13
2.1.1. Chemikalien, Enzyme, Nukleinsäure- und Proteinstandards, Nukleotide, Vektoren, <i>P. infestans</i> -Stamm und Antikörper	13
2.1.2. Geräte	14
2.1.3. Medien, Puffer und Lösungen	14
2.2. Arbeiten mit <i>Rhynchosporium commune</i>	17
2.2.1. Anzucht von <i>R. commune</i> im Flüssigmedium	17
2.2.2. Reisolierung von <i>R. commune</i> aus Gerstenblättern	17
2.2.3. Isolierung von Sporen von <i>R. commune</i>	17
2.2.4. Anlegen von Dauerkulturen von <i>R. commune</i>	18
2.2.5. Inokulation von <i>Hordeum vulgare</i> mit <i>R. commune</i>	18
2.2.6. Präparation von Protoplasten aus <i>R. commune</i>	18
2.2.7. Transformation von Protoplasten aus <i>R. commune</i>	19
2.3. Arbeiten mit <i>Phytophthora infestans</i>	19
2.4. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	19
2.4.1. Erstellung von <i>E. coli</i> -Dauerkulturen (Glycerinkulturen)	19
2.4.2. Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> - Zellen	19
2.4.3. Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	20
2.4.4. Animpfen von <i>E. coli</i> -Flüssigkulturen bzw. Vorkulturen	20

2.5. Arbeiten mit Nukleinsäuren	20
2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren	20
2.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.5.3. quantitative PCR (qPCR)	23
2.5.4. Restriktion von DNA	24
2.5.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA	24
2.5.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	24
2.5.7. Ligation	25
2.5.8. Sequenzierung von DNA	25
2.5.9. DNA-Hybridisierung (Southern Blot)	25
2.6. Arbeiten mit Proteinen	26
2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.6.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)	27
3. Ergebnisse	29
3.1. Erstellung von Deletionsmutanten in <i>R. commune</i>	29
3.1.1. Auswahl der zu deletierenden Gene	29
3.1.2. Erstellung der Deletionsmutanten	31
3.1.3. Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten mittels PCR (Mutanten-Screen)	33
3.1.4. Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten mittels DNA-Hybridisierung (Southern Blot)	38
3.2. Untersuchungen zum zellwandabbauenden Enzym PME1	40
3.3. Untersuchungen zum möglichen Effektorprotein RxP1	44
3.4. Untersuchungen zu Signalsequenzen (Signal Sequence Trap - SST)	48
3.5. Untersuchungen zu den Enzymen aus dem Sekundärmetabolismus	52
3.5.1. <i>In-silico</i> -Analysen zu den Enzymen aus dem Sekundärmetabolismus	52
3.5.2. <i>In-silico</i> -Vorhersage von Genclustern des Sekundärmetabolismus im Genom von <i>R. commune</i>	56
3.5.3. Expressionsanalyse der <i>PKS</i> , <i>PKS-NRPS</i> und <i>NRPS in planta</i>	59
3.5.4. Charakterisierung der <i>PKS</i> -Deletionsmutanten	61
3.5.5. Metabolomische Untersuchungen zu den möglichen Produkten von <i>PKS1</i> , <i>PKS2</i> und <i>PKS3</i>	67
3.5.6. Untersuchungen zur möglichen Interaktion zwischen <i>PKS1</i> und <i>PKS3</i>	81
4. Diskussion	85
4.1. Das zellwandabbauende Enzym Pektinmethylesterase 1 in der Pflanze-Pathogen-Interaktion	85
4.2. Das <i>Rhynchosporium</i> -RxLR-Protein 1 und seine Wirkung als Effektorprotein	89

4.3. Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus und seine mögliche Wirkung in der Pflanze-Pathogen-Interaktion	91
4.3.1. <i>In-silico</i> -Analysen und Expressionsanalysen <i>in planta</i>	91
4.3.2. Funktionelle Charakterisierung der <i>PKS1</i> -, <i>PKS2</i> - bzw. <i>PKS3</i> -Einzeldeletion	100
4.3.3. Mögliche Funktion von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	101
4.4. Verstärktes Wachstum der erstellten Deletionsmutanten <i>in planta</i>	104
5. Zusammenfassung und Ausblick	107
Literaturverzeichnis	109
A. Anhang Oligonukleotide	125
B. Anhang DNA-Hybridisierung	141
C. Anhang Sekundärstoffwechsel-Gencluster	145
D. Anhang Expressionsanalysen <i>in planta</i>	157
Danksagung	159
Lebenslauf	
Publikationsliste	
eidesstattliche Erklärung	

Abbildungsverzeichnis

1.1. Die Entwicklung von <i>R. commune</i> auf Gerste	2
1.2. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Polyketidsynthasen (PKS) und Hybriden aus PKS und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (PKS-NRPS)	8
3.1. Expression ausgewählter Gene <i>in planta</i>	31
3.2. Schematische Darstellung zum Aufbau der Deletionskonstrukte	32
3.3. Erstellung der Deletionskonstrukte mittels PCR	33
3.4. Schematische Darstellung der homologen Rekombination	33
3.5. Schematische Übersicht der Oligonukleotide für die Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten (Mutanten-Screen)	34
3.6. Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten (Mutanten-Screen)	35
3.7. Schematische Übersicht zur Sondenhybridisierung im Wildtypgen bzw. im Deletionskonstrukt der erstellten Deletionsmutanten	38
3.8. Phylogenie sämtlicher PMEs aus den verschiedenen <i>Rhynchosporium</i> -Arten	40
3.9. Expression von <i>PME1-5 in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	42
3.10. Pilzquantifizierung <i>in planta</i> und Krankheitssymptome von <i>UK7ΔPME1</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	43
3.11. Pilzquantifizierung <i>in planta</i> und Krankheitssymptome von <i>UK7ΔRxP1</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	45
3.12. Schematische Darstellung des RxP1-mCherry-Fusionskonstrukt	46
3.13. RxP1-Lokalisation <i>in planta</i>	47
3.14. Schematische Abbildung des Reportergens β -Lactamase im Vektor pBK-CMV-fusion	48
3.15. Wachstum der mit den SST-Vektoren transformierten <i>E. coli</i> -Zellen auf Kanamycin und Carbenicillin	51
3.16. Western Blot (anti- β -Lactamase) der mit den SST-Vektoren transformierten <i>E. coli</i> -Zellen	52
3.17. Phylogenie und Übersicht Domänenstruktur (schematisch) der PKS und PKS-NRPS aus verschiedenen <i>Rhynchosporium</i> -Isolaten und -Arten	54
3.18. Phylogenie der NRPS aus <i>R. commune</i>	55
3.19. Expression von <i>PKS1-3 in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	60

3.20. Pilzquantifizierung <i>in planta</i> und Krankheitssymptome von UK7 Δ PKS1 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	62
3.21. Pilzquantifizierung <i>in planta</i> und Krankheitssymptome von UK7 Δ PKS3 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	63
3.22. Pilzquantifizierung <i>in planta</i> und Krankheitssymptome von UK7 Δ PKS2 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	64
3.23. Pilzquantifizierung <i>in planta</i> von UK7 Δ PKS2 in verschiedenen Blattsegmenten während der Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, 14 dpi	65
3.24. Pilzwachstum <i>ex planta</i> (in YNB-MEDIUM, 14 d)	66
3.25. Partielles Negativionen-ESI-FT-ICR-Massenspektrum (m/z 225 bis 350), Ethylacetatextrakt aus Kulturfiltrat von Wildtyp UK7 bzw. UK7 Δ PKS1	68
3.26. Quantitative Bestimmung von C ₁₅ H ₁₄ O ₆ im Kulturfiltrat der PKS-Deletionsmutanten und Wildtyp UK7	70
3.27. Quantitative Bestimmung von C ₁₅ H ₁₄ O ₆ (Ethylacetatextrakt) und Bestimmung der Myzelmasse in verschiedenen Medien mit UK7	71
3.28. UV-Spektrum von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	73
3.29. Wachstum von <i>R. commune</i> in Gegenwart von 0,3 M EtOH bzw. 0,1 M Glycerin	74
3.30. Schematische Darstellung zum Aufbau der Konstrukte und der homologen Rekombination zur PKS1-Überexpression	76
3.31. Wachstum von <i>R. commune</i> in Abwesenheit bzw. Gegenwart von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	78
3.32. Keimung von <i>R. commune</i> in Abwesenheit bzw. Gegenwart von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	79
3.33. Wachstum von <i>P. infestans</i> in Abwesenheit bzw. Gegenwart von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	80
3.34. Wachstum von <i>E. coli</i> in Abwesenheit bzw. Gegenwart von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	81
3.35. PKS3-Expression in UK7 Δ PKS1 und Wildtyp UK7 <i>in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	82
3.36. PKS1-Expression in UK7 Δ PKS3 und Wildtyp UK7 <i>in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	83
4.1. Schematische Darstellung der Domänenstruktur einer nicht-reduzierenden und einer reduzierenden PKS aus <i>Rhynchosporium</i> spp.	93
4.2. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PKS ohne Terminationsdomäne aus <i>Rhynchosporium</i> spp.	93
4.3. Schematische Darstellung der Domänenstruktur von PKS12 aus <i>Rhynchosporium</i> spp.	94
4.4. Schematische Darstellung der Sekundärstoffwechsel-Gencluster von PKS3 + PKS13, PKS12 + NRPS2 und PKS9	97
4.5. Schematische Darstellung der Sekundärstoffwechsel-Gencluster von PKS1, PKS4 und PKS6	99
4.6. Mögliche Interaktion von PKS1 und PKS3 in der Biosynthese von C ₁₅ H ₁₄ O ₆	102

B.1. Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, <i>PME1</i>	141
B.2. Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, <i>RxP1</i>	142
B.3. Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, <i>PKS1</i>	142
B.4. Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, <i>PKS2</i>	143
B.5. Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, <i>PKS3</i>	143
C.1. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS4</i> , schematisch	145
C.2. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS10</i> , schematisch	146
C.3. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS3</i> + <i>PKS13</i> , schematisch	148
C.4. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS6</i> , schematisch	149
C.5. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS8</i> , schematisch	150
C.6. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS12</i> + <i>NRPS2</i> , schematisch	152
C.7. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS9</i> , schematisch	154
C.8. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS2</i> , schematisch	155
C.9. Sekundärstoffwechsel-Gencluster <i>PKS1</i> , schematisch	156
D.1. Expression von <i>PKS4-9 in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	157
D.2. Expression von <i>PKS10-13 in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	158
D.3. Expression von <i>NRPS1-4 in planta</i> während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten	158

Tabellenverzeichnis

2.1. Zusammensetzung der verwendeten Medien	15
2.2. Konzentration der verwendeten Antibiotika	15
2.3. Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen	16
3.1. Übersicht und Expression der für die Erstellung der Deletionsmutanten ausgewählten Gene	30
3.2. Zusammenfassung der erstellten Deletionsmutanten	37
3.3. Übersicht zur DNA-Hybridisierung der Deletionsmutanten	39
3.4. <i>In-silico</i> -Analysen der putativ sezernierten Effektoren mit Hilfe von SignalP (Petersen <i>et al.</i> , 2011) bzw. SecretomeP (Bendtsen <i>et al.</i> , 2004)	49
3.5. Übersicht der klonierten SST-Vektoren und das erwartete Wachstum der mit den SST-Vektoren transformierten <i>E.-coli</i> -Zellen auf Kanamycin (Kan) und Carbenicillin (Carb)	50
3.6. Übersicht über die Anzahl an PKS, NRPS, PKS-NRPS, Sesqui- bzw. Diterpen-cyclasen und DMATS in den verschiedenen <i>Rhynchosporium</i> -Arten	56
3.7. Übersicht über mögliche Sekundärstoffwechsel-Gencluster in <i>R. commune</i>	57
4.1. Übersicht über die in <i>R. commune</i> , <i>R. secalis</i> , <i>R. agropyri</i> und <i>R. orthosporum</i> vorhandenen Gene für PKS (PKS-NRPS-Hybride sind in Klammern angegeben), NRPS, Sesqui-TC und DMATS	92
A.1. Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	125
A.2. Übersicht Oligonukleotide für die Erstellung der Deletionsmutanten	133
A.3. Übersicht Oligonukleotide für die Überprüfung der Deletionsmutanten	134
A.4. Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten für die PCR und Amplikon-größe der PCR-Produkte	135
A.5. Ermittelte Effizienzwerte für die qPCR der verwendeten Oligonukleotidpaare	139
C.1. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS4	145
C.2. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS10	146
C.3. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS3 + PKS13	147
C.4. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS6	149
C.5. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS8	150
C.6. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS12 + NRPS2	151

C.7. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS9	153
C.8. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS2	155
C.9. Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS1	156

Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen

A	Adenylierungsdomäne
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ACP	Acyl Carrier Protein
AFD	Adenylate Forming Domain (Adenylatbildende Domäne)
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Acyltransferase
BAA	Bisacrylamid
bla	β -lactamase
ble	Phleomycin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bspw.	beispielsweise
C	Kondensationsdomäne
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	Calciumchlorid-Dihydrat
Carb	Carbenicillin
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CH ₃ COOH	Essigsäure
cv.	Kultivar (Pflanzensorte)
CWDE	Cell Wall Degrading Enzymes (zellwandabbauende Enzyme)
d	Durchmesser
DH	Dehydratase
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpi	days post inoculation (Tage nach Inokulation)
EA	Ethylacetat (Essigsäureethylester)
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
ER	Enoylreduktase
ESI-MS	electron spray ionisation- mass spectrometry (Elektronen-spray Ionisierungs- Massenspektrometrie)

ESI-UHPLC-QTOF-MS	electron spray ionisation- ultra performance liquid chromatography- quadrupole time of flight-mass spectrometry (Elektronenspray Ionisierungs-Ultrahochauflösungflüssigkeitschromatographie- Quadrupol Flugzeit- Massenspektrometrie)
EST	expressed sequence tags (kurze Nukleotidsequenzen von exprimierten Genen)
et al.	et alii (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FT-ICR-MS	Fouriertransformations- Ionenzyklotronresonanz- Massenspektrometrie (fourier transformation- ion cyclotron resonance- mass spectrometry)
gDNA	genomic DNA (genomische DNA)
GFP	green fluorescent protein (grün fluoreszierendes Protein)
GOI	gene of interest (Zielgen)
GPD	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HB-Medium	Hafer-Bohnenmehl-Medium
HCl	Salzsäure
HST	host-specific toxin (wirtsspezifisches Toxin)
HPLC	Hochauflösungflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
Hyg	Hygromycin
ID	Identifikationsnummer
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
K ₃ Fe(CN) ₆	Kaliumhexacyanoferrat
Kap.	Kapitel
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOH	Kaliumhydroxid
KR	β -Ketoreduktase
KS	β -Ketoacylsynthase
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC/MS	liquid chromatography/ mass spectrometry (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung)
LIMBO-Medium	Limabohnen-Medium
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis

MAMP	microbe associated molecular pattern (mikrobiell-assoziierte molekulare Muster)
MeOH	Methanol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	Magnesiumsulfat-Heptahydrat
mRNA	messenger RNA
MT	Methyltransferase
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NH ₄ NO ₃	Ammoniumnitrat
NIP	necrosis inducing protein (Nekrosen induzierendes Protein)
NMR	nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD 600	optische Dichte bei 600 nm
Oligo dT	Oligodesoxythymin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCI	Phenol:Chloroform:Isopropanol (25:24:1)
PCP	Peptidyl Carrier Protein
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PG	Polygalakturonase
PKS	Polyketidsynthase
PL	Pektatlyase
PME	Pektinmethylesterase
PMEI	Pektinmethylesteraseinhibitor
PPTase	Phosphopantetheinyltransferase
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RxP	<i>Rhynchosporium</i> -RxLR-Protein
S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)

SP	signal peptide (Signalpeptid)
SST	signal sequence trap (experimentelle Signalsequenzsuche)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	tris-buffered saline + Tween 20 (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TC	Terpencyclase
TCA	Trichloressigsäure
TDW	Touchdown
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	untranslated region (nicht translatierte Region)
V	Volumen
v/v	volume per volume (Volumenanteil pro Volumen)
Vgl.	Vergleich
w/v	weight per volume (Gewichtsanteil pro Volumen)
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base

Abkürzungen der verwendeten Einheiten

A (mA)	Ampere (Milliampere)
bp (kb)	basepairs (Basenpaare (Kilobasenpaare))
°C	Grad Celsius
d	day (Tag)
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
x g	Fallbeschleunigung
g	Gramm
h	hour (Stunde)
L (μ L, mL)	Liter (Mikroliter, Milliliter)
m (cm, mm)	Meter (Zentimeter, Millimeter)
M (mM)	Molar (Millimolar)
N	Normal
min	minute (Minute)
s	second (Sekunde)
U	Unit (Einheit)
V	Volt

Abkürzungen der Aminosäuren

A Ala	Alanin
R Arg	Arginin
N Asn	Asparagin
D Asp	Aspartat
C Cys	Cystein
E Glu	Glutamat
Q Gln	Glutamin
G Gly	Glycin
H His	Histidin
I Ile	Isoleucin
L Leu	Leucin
K Lys	Lysin
M Met	Methionin
F Phe	Phenylalanin
P Pro	Prolin
S Ser	Serin
T Thr	Threonin
W Trp	Tryptophan
Y Tyr	Tyrosin
V Val	Valin

Abkürzungen der Basen

A	Adenosin
C	Cytosin
G	Guanin
N	Nukleotid
R	Purin
T	Thymin
U	Uracil
Y	Pyrimidin

1. Einleitung

Pflanzen sind einer Vielzahl von abiotischen und biotischen Faktoren ausgesetzt, die ihre Entwicklung beeinflussen können. Zu den abiotischen Faktoren zählen beispielsweise Temperatur, Wasser und die Zusammensetzung des Bodens. Unter den biotischen Faktoren stellen insbesondere pathogene Mikroorganismen eine Gefahr für die Pflanzen dar. Besonders deutlich verstärken sich die Auswirkungen pathogener Mikroorganismen bei Kulturpflanzen. Hier sind genetische Variabilität und Pflanzenabstand geringer, wodurch eine Ausbreitung von Krankheiten erleichtert wird. Werden Kulturpflanzen von einem pathogenen Mikroorganismus befallen, sind Ernteeinbußen die Folge. Zur Vermeidung von Krankheiten und den damit verbundenen Ernteaufschlägen können resistente Pflanzensorten eingesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit bietet der Einsatz von Pflanzenschutzmitteln. Obwohl die Resistenzzüchtung im Allgemeinen sehr erfolgreich ist, soll eine weitere Verbesserung der Bekämpfung von pathogenen Mikroorganismen durch umfassende Forschungen auf dem Gebiet der Pflanzen-Pathogen-Interaktionen erreicht werden.

1.1. Die Gattung *Rhynchosporium*

Der Pilz *Rhynchosporium commune* ist einer der Hauptverursacher von Ernteaufschlägen der Gerste (*Hordeum vulgare*). Zur Gattung *Rhynchosporium* gehören derzeit fünf Pilzarten, die zu den Ascomyceten gezählt werden (Zaffarano *et al.*, 2011; King *et al.*, 2013). Als Wirtspflanzen von *Rhynchosporium* sind verschiedene Gräser (*Poaceae*) bekannt. Zum Beispiel löst eine Infektion von *Rhynchosporium* auf Gerste oder Roggen die typischen Symptome der *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit aus. Diese zeigen sich durch das Auftreten von länglichen grau-weißen Flecken auf den Blättern (Abb. 1.1a). *Rhynchosporium* wurde erstmals 1897 aus Roggen isoliert und zunächst als *Marsonia secalis* bezeichnet (Oudemans, 1897). Fast zeitgleich beschrieb Frank (1897) den Pilz als *Rhynchosporium graminicola*. Später wurde daraus der Artnamen *Rhynchosporium secalis* (Davis, 1919, 1921; Caldwell, 1937). Lange waren nur zwei *Rhynchosporium*-Arten bekannt, die sich morphologisch nur in der Form ihrer zweizelligen Konidien unterscheiden. Während *R. orthosporum* zylindrische Sporen bildet, weisen die Sporenzellen von *R. secalis* einen nasenförmigen Fortsatz auf. Für *R. secalis* wurde beobachtet, dass verschiedene Isolate unterschiedliche Wirtsspezifitäten zeigten (Zaffarano *et al.*, 2008). Nähere phylogenetische Untersuchungen ergaben schließlich eine weitere Aufspaltung von *R. secalis* in drei Arten: *R. commune*, *R. secalis* und *R. agropyri* (Zaffarano

et al., 2011). Darüber hinaus wurde mit *R. lolii* kürzlich eine weitere Art beschrieben (King *et al.*, 2013), die ebenfalls zylindrische Sporen bildet und nahe verwandt mit *R. orthosporum* ist (D. Penselin und W. Knogge, unveröffentlicht). Diese derzeit fünf bekannten Arten weisen unterschiedliche Wirtsspektren auf. *R. commune* infiziert beispielsweise Gerste, während *R. secalis* Roggen und Triticale befällt. Das Wirtsspektrum von *R. agropyri* umfasst verschiedene Quecken (*Agropyron* spp.) und *R. orthosporum* ist in der Lage das Wiesen-Knäuelgras (*Dactylis glomerata*) zu infizieren. *R. lolii* befällt Weidelgras (*Lolium perenne*, King *et al.*, 2013).

1.2. Das Pathosystem *Hordeum vulgare* und *Rhynchosporium commune*

Die Keimung von *R. commune* wird durch feuchtes, kühles Klima begünstigt. Keimen die Sporen aus (Abb. 1.1b), bilden sie Appressorien, die dem Pilz das Eindringen in die Wirtspflanze erleichtern (Zhan *et al.*, 2008). Anschließend dringt das Pathogen mit einer Penetrationshyphe durch die Kutikula ein und breitet sich subkutikulär aus (Abb. 1.1c). Im weiteren Verlauf der Infektion bildet der Pilz zunächst dünne Hyphen. Später sind dicke Hyphen zu erkennen, die sich zu einem dicht gepackten Pilzstroma entwickeln (Abb. 1.1d). Die sichtbaren Symptome (Abb. 1.1a) werden durch das Kollabieren von Epidermis- und Mesophyllzellen hervorgerufen (Ayesu-Offei und Clare, 1970; Lehnackers und Knogge, 1990). Es sind wässrig graue bis blaugraue oder chlorotische Läsionen, die später vom Zentrum her austrocknen und eine graugrüne bis grauweiße Farbe annehmen. Die Flecken sind unregelmäßig und durch einen scharfen Rand vom restlichen Blatt abgetrennt (Ayesu-Offei und Clare, 1970; Shipton, 1974; Lehnackers und Knogge, 1990).

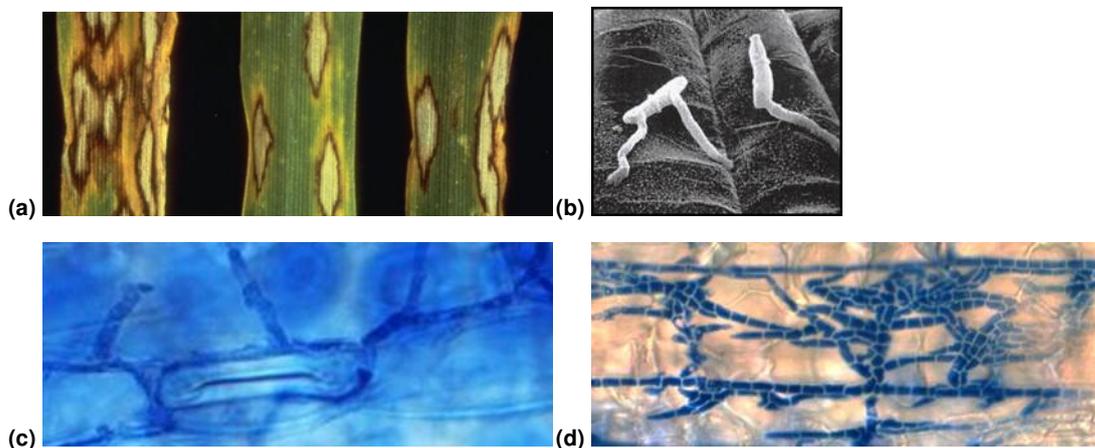


Abbildung 1.1.: Die Entwicklung von *R. commune* auf Gerste. (a) Symptome auf Gerstenblättern nach Infektion mit *R. commune* (www.inra.fr), (b) keimende Sporen von *R. commune* (Knogge, 1998), (c) subkutikuläre Hyphen und (d) beginnendes Pilzstroma von *R. commune* (beide aus Kirsten *et al.*, 2012)

Zwischen der Infektion der Gerste und der erneuten Produktion von Sporen können mehrere

Tage bzw. wenige Wochen vergehen (Zhan *et al.*, 2008). Die Ausbreitung der Sporen erfolgt durch Wasser, zum Beispiel Regen. Über die Infektion von Ähren kann der Pilz in das Saatgut gelangen und in der nächsten Saison wieder auskeimen. Ebenso kann der Pilz im Stroh überwintern.

Mikroskopische Beobachtungen konnten zeigen, dass das Absterben der Epidermiszellen und das Kollabieren der Mesophyllzellen ohne einen direkten Kontakt zwischen Pilzhyphen und pflanzlichem Plasmalemma erfolgt (Ayesu-Offei und Clare, 1970, 1971). Dies war ein erster Hinweis auf Virulenzfaktoren (Proteine, niedermolekulare Substanzen), die von *R. commune* sezerniert werden, und möglicherweise eine toxische Wirkung auf die Pflanze haben könnten.

1.3. Virulenzfaktoren phytopathogener Organismen

Die Ernährung von Pflanzenpathogenen erfolgt heterotroph auf Kosten ihrer Wirtspflanzen. Dabei können die Pathogene neben Blättern auch Spross, Wurzeln und die Fruchtstände befallen. Die Besiedlung der Pflanzen durch phytopathogene Organismen kann passiv durch schon vorhandene Öffnungen (bspw. durch Stomata oder durch Wunden, die durch Herbivoren zugefügt wurden) oder mittels aktiver Penetration erfolgen.

Phytopathogene sind innerhalb der Bakterien, Oomyceten und Pilze bekannt. Beispielsweise befallen die bakteriellen Phytopathogene der *Xanthomonas* spp. verschiedene Kulturpflanzen wie Tomate, Paprika, Reis und Zitruspflanzen (Brunings und Gabriel, 2003; Stall *et al.*, 2009; White und Yang, 2009). Weitere bakterielle Phytopathogene sind Pathovaren von *Pseudomonas syringae*, die unter anderem Tomaten- und Bohnenpflanzen infizieren (Mansfield *et al.*, 2012). Zu den phytopathogenen Oomyceten zählen *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule von Kartoffel (Kamoun und Smart, 2005) und *P. sojae*, der für die Wurzelfäule der Sojabohne verantwortlich ist (Qutob *et al.*, 2002). Zu den phytopathogenen Pilzen gehören unter anderem *Fusarium* spp. (Schadpilze verschiedener Getreidesorten, Parry *et al.*, 1995) und *Magnaporthe oryzae* (infiziert Reispflanzen, Couch und Kohn, 2002). Weitere Krankheiten sind bspw. Mehltau (*Blumeria graminis*) bzw. Schwarzrost (*Puccinia graminis*) von Gerste (Backes *et al.*, 2003).

Zum Eindringen in die Pflanzenzellen nutzen phytopathogene Pilze und Oomyceten verschiedene Strategien. Beispielsweise kann durch den Einsatz von hydrolytischen Enzymen („cell wall degrading enzymes“, CWDEs, zellwandabbauende Enzyme, Kutinasen, Cellulasen, Pektatlyasen und -esterasen usw.) und die Ausbildung von Appressorien die Oberfläche der Pflanzen durchdrungen werden (Knogge, 1996a). Die weitere Entwicklung der Phytopathogene findet *in planta* statt. Dabei können phytopathogene Organismen Toxine sezernieren, die lebendes Gewebe der Pflanze abtöten (Walton, 1996). Lebendes, wie auch durch Toxine abgetötetes Pflanzengewebe wird von den phytopathogenen Organismen als Nahrung verwendet. Anhand der Ernährungsweise wird eine Einteilung in bio-, hemibio- und nekrotrophe Pathogene vorgenommen. Biotrophe Organismen beziehen ihre Nährstoffe aus lebenden

Pflanzenzellen und sind somit vom Überleben der Wirtspflanze abhängig. Bei der nekrotrophen Lebensweise wird lebendes pflanzliches Gewebe zunächst abgetötet und dient danach als Nahrungsquelle. Hemibiotrophe Organismen hingegen durchlaufen anfänglich eine biotrophe Phase, der später eine nekrotrophe Phase folgt, die zum Abtöten von pflanzlichem Gewebe führt (Divon und Fluhr, 2007).

Obwohl zahlreiche Phytopathogene bekannt sind, ist die Besiedlung eines Wirtes eher die Ausnahme (Knogge, 1998). Das heißt Pflanzen können dem Befall durch Mikroorganismen entgegenwirken. Die pflanzliche Nichtwirtsresistenz (Grundresistenz) beruht auf der Erkennung mikrobieller Strukturen, die evolutionär konserviert, von funktioneller Bedeutung und weit verbreitet sind. Diese Strukturen kommen in der Pflanze nicht vor und werden daher als MAMP („microbe-associated molecular patterns“, mikrobiell-assoziierte molekulare Muster) bezeichnet. MAMP lösen die pflanzliche Abwehrreaktion aus (Jones und Dangl, 2006). Zu dieser Abwehrreaktion gehört beispielsweise die extrazelluläre Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies („oxidative burst“, Wojtaszek, 1997). Die hypersensitive Reaktion (HR) ist eine weitere Abwehrreaktion. Sie zeichnet sich durch ein lokales Absterben der pflanzlichen Zellen am Infektionsort aus, um die weitere Verbreitung des Pathogens zu unterbinden (Greenberg *et al.*, 1994; Greenberg, 1997). Zusätzlich wird die Expression von *PR*-Genen angeschaltet („pathogenesis-related“). Beispielsweise werden spezifisch im Mesophyll von Gerstenblättern nach Infektion mit *R. commune* drei *PR*-Gene exprimiert (*PR-1*, *PR-5*, *PR-9*, Steiner-Lange *et al.*, 2003).

Erfolgreiche Pathogene können durch Sekretion von Virulenzfaktoren (CWDEs, Effektorproteine und niedermolekulare Substanzen) Einfluss auf die die pflanzlichen Abwehrmechanismen nehmen. Die Effektoren können apoplastisch (bspw. „extracellular proteins“, Ecp1 bis Ecp7 aus *C. fulvum*, de Wit *et al.*, 2009) oder nach Translokation in die Pflanzenzelle (bspw. RxLR-Effektoren aus Oomyceten, Bozkurt *et al.*, 2012) wirken und eine Verzögerung der Abwehrreaktion hervorrufen bzw. die Aktivierung pflanzlicher Abwehrgene inhibieren (Friesen *et al.*, 2008). Daraus folgend kann das Pathogen die Pflanze erfolgreich besiedeln (kompatible Interaktion).

Nach Durchbrechen der Nichtwirtsresistenz haben Pflanzen im Laufe der Evolution sogenannte Resistenzgene (*R*-Gene) entwickelt. Mit Hilfe der *R*-Genprodukte sind Pflanzen in der Lage, bestimmte Moleküle der Pathogene zu erkennen. Bei den *R*-Genprodukten handelt es sich meist um transmembrane bzw. membranassoziierte Proteine (Dangl und Jones, 2001). Die meisten *R*-Proteine gehören zur Gruppe der sogenannten NB-LRR-Proteine („nucleotide-binding site plus leucine rich repeat“, Nukleotidbindestelle plus Wiederholungen leucinreicher Motive). Die C-terminale LRR-Domäne ist vermutlich verantwortlich für die Protein-Protein-Interaktion und damit für die Erkennung der sezernierten Effektoren (Dangl und Jones, 2001). Weitere Beispiele für *R*-Genprodukte sind Transmembranproteine mit extrazellulärer LRR-Domäne (Dangl und Jones, 2001), wie die *Cf-X*-Gene aus Tomate, die Resistenz gegenüber

C. fulvum verleihen (Jones *et al.*, 1994), oder Rezeptorkinasen, die eine extrazelluläre LRR-Domäne, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre Proteinkinasedomäne besitzen (Dangl und Jones, 2001). Die Erkennung erfolgt durch die LRR-Domäne, während die Proteinkinasedomäne für die Signaltransduktion durch Phosphorylierung zuständig ist (Dangl und Jones, 2001). Zu den Rezeptorkinasen zählt bspw. Xa21 aus Reis (Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae*, Song *et al.*, 1995). Sind Pflanzen in der Lage, vom Pathogen sezernierte Virulenzfaktoren zu erkennen und die entsprechenden Abwehrmechanismen auszulösen, kommt es zu einer inkompatiblen Interaktion (Jones und Dangl, 2006). Gene, die für Virulenzfaktoren kodieren, die auf Pflanzenseite durch die *R*-Genprodukte erkannt werden, werden als Avirulenzgene (*Avr*-Gene) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006).

Zu den Virulenzfaktoren zählen CWDEs, Effektorproteine und niedermolekulare Substanzen. Bisher konnten viele Effektoren aus verschiedenen phytopathogenen Organismen identifiziert und funktionell charakterisiert werden.

Beispiele für bakterielle Effektoren

Xanthomonas spp. und *Pseudomonas* spp., die zu den bakteriellen Phytopathogenen gehören, besitzen das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS), um ihre Effektorproteine in Pflanzenzellen zu schleusen (Büttner und Bonas, 2006). Beispiele für Typ-III-Effektoren sind AvrPto und AvrPtoB aus *Pseudomonas syringae*. Beide Proteineffektoren blockieren Rezeptorkinasen und unterdrücken so die Abwehrsignalkaskade in den Pflanzen (Kvitko *et al.*, 2009; Cunnac *et al.*, 2011). XopD aus *Xanthomonas euvesicatoria* ist ein weiteres Beispiel für einen bakteriellen Typ-III-Effektor. Das Protein besitzt eine C-terminale SUMO-Protease, die die Hydrolyse eines SUMO-Rest von SIERF4 (Transkriptionsfaktor in *Solanum lycopersicum*) katalysiert. Daraus folgt die Destabilisierung von SIERF4, was zur Inhibierung der Ethylenproduktion führt, die für die Resistenz der Tomatenpflanze gegen *X. euvesicatoria* benötigt wird. Durch die fehlende Ethylenproduktion gelingt es *X. euvesicatoria*, die Pflanze erfolgreich zu besiedeln (Kim *et al.*, 2013).

Beispiele für Virulenzfaktoren phytopathogener Pilze und Oomyceten

Zellwandabbauende Enzyme

Phytopathogene Pilze und Oomyceten penetrieren ihren Wirt aktiv. Hierzu sezernieren sie bspw. hydrolytische Enzyme, wie Kutinasen, Cellulasen, Pektinasen und Proteasen, um Kutikula und Zellwand abzubauen (Knogge, 1996a). Ein Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand, besonders der Mittellamelle, ist Pektin. Es ist ein Polysaccharid, das überwiegend aus Galakturonsäuremolekülen aufgebaut ist. Diese sind α -1,4-glykosidisch verknüpft und bilden das Rückgrat des Pektins. Die Galakturonsäureeinheiten können methyliert sein (Valette-Collet *et al.*, 2003). Daher sezernieren phytopathogene Organismen pektinolytische Enzyme (Pektatlyasen (PL), Pektingalakturonasen (PG) und Pektinmethylesterasen (PME)) zum Pek-

tinabbau. PMEs demethylieren die veresterten Galakturonsäuremoleküle, wobei Methanol und Polygalakturonsäure entsteht. Nun können die PGs und PLs den weiteren Abbau des Pektins vornehmen. PGs hydrolysieren dafür die glykosidischen Bindungen zwischen den Galakturonsäuremolekülen, während PLs in der Lage sind, die Polygalakturonsäure in Oligogalakturonsäuremoleküle abzubauen (Valette-Collet *et al.*, 2003). Durch den Pektinabbau kommt es zu einer Schwächung der Zellwand, wodurch die Penetration der Phytopathogene erleichtert wird (Kikot *et al.*, 2009). Neben diesen CWDEs sezernieren phytopathogene Pilze und Oomyceten weitere Effektoren.

Effektorproteine

Einige Beispiele für sezernierte Effektorproteine aus phytopathogenen Pilzen und Oomyceten sind im Folgenden aufgeführt. Cmu1, ein Effektorprotein aus *Ustilago maydis* (Erreger des Maisbeulenbrands, biotropher Pilz), wird während der Infektion in die Pflanzenzellen geschleust und für die Virulenz *in planta* benötigt. Cmu1 inhibiert die Synthese von Salicylsäure, indem es die Vorläufermoleküle aus dem Shikimatbiosyntheseweg entzieht. Salicylsäure gilt als Schlüsselhormon in der pflanzlichen Abwehr. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion von Salicylsäure direkt mit der Virulenz von *Ustilago maydis in planta* korreliert (Djamei *et al.*, 2011). Aus *Cladosporium fulvum* (Erreger der Samt- und Braunfleckenkrankheit von Tomate) sind verschiedene apoplastisch wirkende Effektoren bekannt, beispielsweise verschiedene Avr-Genprodukte Avr-X sowie Ecp1 bis Ecp7. Für die Avr- und Ecp-Proteine aus *C. fulvum* sind die entsprechenden R-Gene der Tomate bekannt. Diese sind als Cf-2, Cf-4, Cf-9 bzw. Cf-Ecp bezeichnet. Tomatenpflanzen, die das entsprechende R-Gen tragen, lösen Abwehrreaktionen aus, sobald eines der Avr-Genprodukte aus *C. fulvum* erkannt wird (de Wit *et al.*, 2009). Avr4 aus *C. fulvum* fungiert als Virulenzfaktor, der dazu beiträgt, dass *C. fulvum* die pflanzliche Abwehrreaktion unterlaufen kann. Untersuchungen ergaben, dass Avr4 eine Chitin-Bindedomäne besitzt. Durch die Bindung von Avr4 an Chitin wird *C. fulvum* gegen pflanzliche Chitinasen geschützt (van den Burg *et al.*, 2006). Eine ähnliche Rolle besitzt Slp1 (sezerniertes LysM Protein 1) aus *Magnaporthe grisea* (Reisbrandpilz). Es bindet an freigesetzte Oligosaccharide des Chitins der pilzlichen Zellwand, um die Erkennung durch die Pflanze zu verhindern. Die Erkennung des Chitins des Pilzes erfolgt durch den CEBiP-Rezeptor der Pflanze. Slp1 sorgt dafür, dass keine freigesetzten Oligosaccharide des Chitins aus der pilzlichen Zellwand vorliegen, indem es sie selbst bindet. Somit verhindert Slp1 die Erkennung der Oligosaccharide durch CEBiP und das damit verbundene Auslösen der Abwehrreaktion der Pflanze (Mentlak *et al.*, 2012).

Phytophthora spp. gehören zu den phytopathogenen Oomyceten. Sie besitzen eine Vielzahl von sezernierten RxLR-Effektoren, die in die Pflanzenzelle transloziert werden (Bozkurt *et al.*, 2012). Avr3a ist ein RxLR-Protein aus *Phytophthora infestans*, das die durch Infestin ausgelöste Abwehrreaktion der Pflanze supprimiert, indem es mit der pflanzlichen E3-Ligase CMPG1

interagiert. Daraus folgend kann CMPG1 nicht mehr für das Auslösen der Abwehrreaktionen sorgen (Bos *et al.*, 2006, 2010). RTP1 aus *Uromyces fabae* (Rostpilz auf Erbsen) besitzt kein RxLR-Motiv, wird aber durch einen unbekanntem Mechanismus in den Nukleus der Pflanzenzelle transloziert und dort akkumuliert. Es wird angenommen, dass RTP1 möglicherweise eine Rolle in der Manipulation der Genexpression der Wirtspflanze während der Infektion spielt (Kemen *et al.*, 2005).

Sekundärstoffe

Neben CWDEs und Effektorproteinen können niedermolekulare Substanzen (Sekundärmetabolite) zum Beispiel als Toxine eine Rolle in der Pflanze-Pathogen-Interaktion spielen. Produkte des Sekundärstoffwechsels gehören bspw. zu den Substanzklassen der Polyketide, Terpenoide bzw. Tryptophanderivate. Ihre Synthese erfolgt durch Polyketidsynthasen (PKS), nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS), deren Hybride (PKS-NRPS) sowie Terpencyclasen (TC) und Dimethylallyltryptophansynthasen (DMATS).

Bekannte Sekundärmetabolite mit Einfluss auf die Pflanze-Pathogen-Interaktion sind zum Beispiel das Polyketid Botzinsäure („botcinic acid“) und das Sesquiterpen Botrydial aus *Botrytis cinerea* (Dalmis *et al.*, 2011). T-Toxin aus *Cochliobolus heterostrophus* (Maispathogen) umfasst eine Familie von langkettigen Polyketiden (C₃₅ bis C₄₀, Yang *et al.*, 1996). Ein weiteres bekanntes Polyketid, das als Toxin wirkt, ist ACR-Toxin aus *Alternaria alternata* (Schimmelpilz, Izumi *et al.*, 2012).

Pilzliche PKS sind Megasyntasen mit verschiedenen Domänen (Abb. 1.2). Die Domänenzusammensetzung kann variieren. So besitzt bspw. nicht jede PKS eine Enoylreduktase (ER)- oder Methyltransferasedomäne (MT). Allerdings besitzt jede PKS folgende Domänen: β -Ketoacylsynthase (KS) und Acyltransferase (AT) sowie ein Acyl Carrier Protein (ACP). Die KS- und AT-Domäne katalysieren die Kettenverlängerung (mit Malonyl-CoA), während das ACP das sich in der Synthese befindliche Molekül innerhalb der Megasyntase zu den Domänen bewegt. PKS, die nur KS, AT und ACP beinhalten, werden als minimalistische PKS bezeichnet (Khosla und Harbury, 2001). Des Weiteren zählen sie zu den nicht-reduzierenden PKS, da sie keine der reduzierenden Domänen tragen (Abb. 1.2). Zu den reduzierenden Domänen zählen: β -Ketoreduktase (KR), Dehydratase (DH), Methyltransferase (MT) und Enoylreduktase (ER). Die KR reduziert Carbonylgruppen zu Hydroxylgruppen und die DH führt Doppelbindungen durch Eliminierung von Wassermolekülen ein. Doppelbindungen werden durch die ER zu Einfachbindungen reduziert und MTs fügen Methylreste in das Molekül ein. Viele PKS besitzen zusätzlich eine Terminationsdomäne (TE). Durch diese wird das am ACP synthetisierte Molekül freigesetzt.

Botzinsäure und Botrydial sind die beiden Haupttoxine aus *Botrytis cinerea*. Es konnte gezeigt werden, dass beide zur Virulenz des Pilzes beitragen. *B. cinerea*-Stämme, die beide Substanzen produzieren, sind virulenter als Stämme, die ausschließlich Botrydial syntheti-

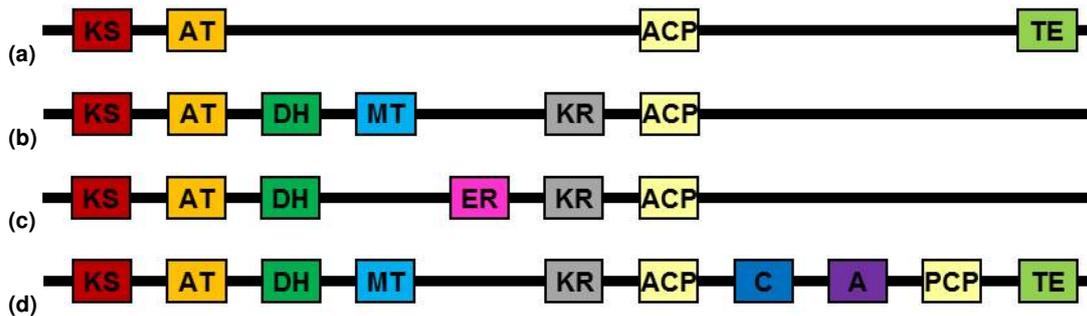


Abbildung 1.2.: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Polyketidsynthasen (PKS) und Hybriden aus PKS und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (PKS-NRPS). (a) nicht-reduzierende PKS, (b) und (c) PKS mit reduzierenden Domänen, (d) PKS-NRPS-Hybrid. (KS) β -Ketoacylsynthase, (AT) Acyltransferase, (DH) Dehydratase, (MT) Methyltransferase, (ER) Enoylreduktase, (KR) β -Ketoreduktase, (ACP) Acyl Carrier Protein, (C) Kondensation, (A) Adenylierung, (PCP) Peptidyl Carrier Protein, (TE) Termination

sieren (Reino *et al.*, 2004). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mutanten von *B. cinerea*, die keines der beiden Toxine produzieren, nicht virulent sind. Daraus wird geschlossen, dass Botzinsäure und Botrydial für das Absterben der Wirtszellen wie auch für die Kolonisierung des Pflanzengewebes durch *B. cinerea* benötigt werden (Dalmis *et al.*, 2011). T-Toxin ist notwendig für die Virulenz von *C. heterostrophus*. Durch Deletion eines PKS-Gens (*PKS1*) in *C. heterostrophus* wird die Produktion von T-Toxin verhindert. Gleichzeitig zeigen die Mutanten keine Virulenz (Yang *et al.*, 1996). Ähnliche Beobachtungen konnten für ACR-Toxin aus *A. alternata* gemacht werden. ACR-Toxin wird durch das Genprodukt von *ACRTS2* (PKS) synthetisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Vorhandensein von *ACRTS2* essentiell für die Produktion von ACR-Toxin wie auch für die Pathogenität von *A. alternata* ist (Izumi *et al.*, 2012).

Neben den PKS sind PKS-NRPS-Hybride bekannt, die an das entstandene Polyketid Aminosäuren kondensieren können. Im NRPS-Teil der PKS-NRPS befinden sich eine Kondensations (C)- und eine Adenylierungsdomäne (A) sowie ein Peptidyl Carrier Protein (PCP, Abb. 1.2). Das PCP ähnelt strukturell dem ACP und bringt die Aminosäure in die Nähe des zuvor synthetisierten Polyketids, wo C die Kondensation vornimmt (Khosla und Harbury, 2001; Staunton und Weisman, 2001). Ein Beispiel für ein PKS-NRPS-Hybrid, das eine Rolle in der Pflanze-Pathogen-Interaktion spielt, ist *ACE1* aus *Magnaporthe grisea* (Böhnert *et al.*, 2004). Dabei wirkt das durch das *Avr*-Genprodukt *ACE1* synthetisierte Produkt als Virulenzfaktor und nicht das Enzym selbst. *ACE1* wird ausschließlich während der Penetration der Wirtspflanze exprimiert. Nach Mutationen in der katalytischen Domäne der β -Ketoacylsynthase von *ACE1* erfolgt keine Erkennung des Pilzes durch resistente Pflanzen. Daher wird angenommen, dass das Produkt von *ACE1* von der Pflanze erkannt wird, wodurch die pflanzliche Abwehrreaktion ausgelöst wird (Böhnert *et al.*, 2004; Collemare *et al.*, 2008b).

Weitere Schlüsselenzyme im Sekundärmetabolismus von Pilzen sind nicht-ribosomale Pep-

tidsynthetasen (NRPS), die aus mehreren hintereinander geschalteten A- und C-Domänen mit einem PCP bestehen. NRPS kondensieren Aminosäuren miteinander und sind in der Lage, D-Aminosäuren sowie nicht-proteinogene Aminosäuren zu verwenden. Weitere charakteristische Merkmale von nicht-ribosomalen Peptiden sind ihre zyklischen Strukturen, Heterozyklen sowie eine nachträgliche Glykosylierung zur Bildung von Glykopeptiden (Walsh, 2004). Beispiele für nicht-ribosomale Peptide sind Enniatin aus *Fusarium* spp. (Haese *et al.*, 1993; Herrmann *et al.*, 1996), AM-Toxin aus *A. alternata* (Pathotyp Apfel, Johnson *et al.*, 2000) sowie HC-Toxin aus *C. carbonum* (Panaccione *et al.*, 1992) und Victorin aus *C. victoriae* (Panaccione, 1993). Enniatin ist ein durch NRPS synthetisiertes Depsipeptid, das allerdings nicht von allen *Fusarium*-Arten produziert wird (Haese *et al.*, 1993; Herrmann *et al.*, 1996). Herrmann *et al.* (1996) konnten zeigen, dass Enniatin-synthetisierende Stämme, wie auch nicht-synthetisierende Stämme gleichermaßen Nekrosen auf Kartoffelknollen auslösen. Auch durch Enniatin alleine kommt es zu Nekrosen. Es wird daraus geschlossen, dass Enniatin eine Bedeutung für die Pathogenität der Enniatin-synthetisierenden *Fusarium*-Stämme hat (Herrmann *et al.*, 1996). AM-Toxin (zyklisches Peptid), das von *A. alternata* (Pathotyp Apfel) produziert wird, ist wichtig für die Virulenz des Pathogens. *A.-alternata*-Deletionsmutanten, die nicht in der Lage sind, AM-Toxin zu produzieren, lösen gleichzeitig keine Symptome auf Äpfeln aus (Johnson *et al.*, 2000).

Die katalytisch aktive *holo*-Form von ACP und PCP ist wichtig für die Aktivität von PKS, NRPS und PKS-NRPS. Beide liegen zunächst als inaktives *apo*ACP bzw. *apo*PCP vor. Um sie zu aktivieren, wird die prosthetische Phosphopantetheinylgruppe auf einen Serinrest des ACP bzw. PCP übertragen. Hierfür sind spezielle Enzyme, die Phosphopantetheinyltransferasen (PPTasen) nötig, die spezifisch für ACP bzw. PCP sind (Lambalot *et al.*, 1996; Cane *et al.*, 1998). Die Deletion des PPTase-Gens *PPT1* im Maispathogen *Colletotrichum graminicola* führte zu Mutanten, die nicht mehr in der Lage waren, Lysin, Siderophore oder Polyketide zu synthetisieren. Gleichzeitig bildeten diese Mutanten sehr wenige nicht melanisierte Appressorien aus, die während des Penetrationsvorgangs zerbrachen. Wurde den Mutanten die Infektion von zuvor verwundeten Maispflanzen ermöglicht, konnten sie dennoch keine Symptome auslösen (Horbach *et al.*, 2009).

Die Produkte von PKS, PKS-NRPS und NRPS können nachträglichen Modifikationen unterzogen werden. Diese Modifikationen können bspw. durch Hydroxylasen, Glykosyltransferasen, Zyklastasen und Methyltransferasen erfolgen. Die Gene für diese Enzyme liegen im Genom meist in der Nähe der *PKS*-, *NRPS*- bzw. *PKS-NRPS*-Gene (Cane *et al.*, 1998; Khalidi *et al.*, 2010). Die Gesamtheit solcher Gene wird als Gencluster bezeichnet. Innerhalb eines Genclusters können sich neben Genen für Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus und modifizierenden Enzymen auch Gene für regulatorische Proteine befinden, zum Beispiel Transkriptionsfaktoren und „loss of aflR expression“ (Verlust der aflR Expression, *LaeA*, Keller *et al.*, 2005; Proctor *et al.*, 1995; Woloshuk *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1998). *LaeA* kodiert

eine Proteinmethyltransferase und spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle bei der Methylierung von Histonen und somit in der Regulation der Genexpression. Die Überexpression oder Deletion von *LaeA* in verschiedenen *Aspergillus*-Arten führte zur vermehrten Produktion bzw. dem Verschwinden verschiedener Sekundärmetabolite (Bok und Keller, 2004).

Zusammen mit CWDEs und Effektorproteinen stellen Polyketide und ihre Derivate Virulenzfaktoren dar, die während Keimung, Penetration und Wachstum des Pflanzenpathogens auf bzw. in der Pflanze eine große Rolle spielen können (Yang *et al.*, 1996; de Wit *et al.*, 2009; Horbach *et al.*, 2009; Dalmais *et al.*, 2011; Djamei *et al.*, 2011; Mentlak *et al.*, 2012).

1.4. Virulenzfaktoren von *Rhynchosporium*

Aus Kulturfiltraten von *R. commune* konnten durch unterschiedliche experimentelle Ansätze Virulenzfaktoren isoliert und identifiziert werden, bspw. die Nekrosen induzierenden Proteine (NIP, Wevelsiep *et al.*, 1991; Kirsten *et al.*, 2012). Die NIP bilden eine Gruppe von heterologen Proteinen mit einer Molekülmasse von < 10 kDa. Gereinigte NIP wurden in Gerstenblätter injiziert und verursachten Nekrosen, die den für das Pathogen typischen Symptomen ähneln. Nähere Untersuchungen ergaben, dass es sich bei NIP3 um ein Glykoprotein handelt, während NIP1 und NIP2 nicht glykosidiert vorliegen (Wevelsiep *et al.*, 1991). NIP1 und NIP3 sind in der Lage, die in der pflanzlichen Plasmalemma lokalisierte H⁺-ATPase zu stimulieren (Wevelsiep *et al.*, 1993). Diese Funktion ist auch von Fussicoccin (Terpenoid) aus *F. amygdali* bekannt. Fussicoccin stimuliert die ATPase der pflanzlichen Plasmamembran (Marrè, 1979). Durch Fussicoccin kommt es zu einem vermehrten Einstrom von Kalium- und Chloridionen sowie von Wasser durch die Schließzellen und zu einer irreversiblen Öffnung der Stomata. Daraus folgt das Welken und spätere Absterben der Blätter (Marrè, 1979; Knogge, 1996a,b). Für NIP1 konnte weiterhin gezeigt werden, dass es die Abwehrreaktion in Gerstenpflanzen, die das *Rrs1*-Gen tragen, auslöst (Hahn *et al.*, 1993). Daher gilt NIP1 als Produkt des Avirulenzgens *AvrRrs1* (Rohe *et al.*, 1995). *R. commune*-Isolate, die kein bzw. kein funktionelles *NIP1* besitzen, verhalten sich virulent auf *Rrs1*-Pflanzen (Rohe *et al.*, 1995).

Neben den NIP konnten im Kulturfiltrat von *R. commune* niedermolekulare Toxine identifiziert werden. Dabei handelt es sich um Rhynchosporoside (Auriol *et al.*, 1978) und ein phytotoxisches Glykoprotein (Mazars *et al.*, 1984). Rhynchosporoside sind Cellobioside von 1,2-Propandiol, die sowohl aus Kulturfiltrat als auch aus infizierten Gerstenblättern isoliert werden konnten. Die Toxine rufen auf Gerstenblättern Nekrosen und Chlorosen hervor, allerdings nicht auf allen Gerstensorten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Rhynchosporoside toxisch auf Pflanzen wirken, die von *R. commune* nicht infiziert werden können (Auriol *et al.*, 1978). Mazars *et al.* (1984) konnten im Kulturfiltrat von *R. commune* ein phytotoxisches Glykoprotein identifizieren. Werden Gerstenblätter zusammen mit dem Glykoprotein inkubiert, entwickeln sich die Symptome der *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit, die umso stärker sind und umso schneller erscheinen, je höher die Konzentration bzw. der Reinheitsgrad des Glykoproteins

war (Mazars *et al.*, 1984).

Im Kulturfiltrat von *R. orthosporum* konnte ein weiterer phytotoxisch wirkender Metabolit identifiziert werden. Es handelt sich um das Isocoumarin Orthosporin (Ichihara *et al.*, 1989). Orthosporin inhibiert das Wurzelwachstum der Wirtspflanzen von *R. orthosporum*, aber auch von Kopfsalat. Reagiert Orthosporin mit Diazomethan entsteht das methylierte Derivat Diaporthin (Ichihara *et al.*, 1989). Orthosporin und Diaporthin wurden auch in weiteren Pflanzenpathogenen identifiziert. Diaporthin ist als Toxin aus *Endothia parasitica* (Kastanienrindenkrebs, Bazziger, 1953; Boller *et al.*, 1957) bekannt. Orthosporin wurde in *Drechslera siccans* identifiziert (Hallock *et al.*, 1988). Beide konnten im Kulturfiltrat von *Aspergillus ochraceus* nachgewiesen werden (Harris und Mantle, 2001).

Zur Identifizierung weiterer Virulenzfaktoren (CWDEs, Effektorproteine, niedermolekulare Substanzen) wurde eine EST-Datenbank von *R. commune* erstellt (A. Navarro-Quezada und W. Knogge, unveröffentlicht). Effektorproteine sind zumeist klein und cysteinreich. Da sie sezerniert werden, besitzen sie mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid (Stergiopoulos und de Wit, 2009). Unter diesem Aspekt wurden die abgeleiteten Sequenzen aus der EST-Datenbank durchsucht. Insgesamt konnten so 1023 putativ sezernierte Proteine identifiziert werden. Darüber hinaus wurden die abgeleiteten Sequenzen der EST-Datenbank mit Hilfe von bekannten PKS-Sequenzen auf das Vorhandensein von PKS-Genen überprüft.

1.5. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Virulenzfaktoren (CWDEs, Effektorproteine und niedermolekulare Substanzen) des Gerstenpathogens *R. commune* zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Mit Hilfe einer EST-Datenbank von *R. commune* (A. Navarro-Quezada und W. Knogge, unveröffentlicht) wurden neun Gene ausgewählt, die mögliche Virulenzfaktoren kodieren. Diese sollten zunächst deletiert werden, um einen Hinweis auf Ihre Rolle während der Pathogenese zu erhalten. Mit der molekularbiologischen, biochemischen und bioinformatischen Charakterisierung der putativen Virulenzfaktoren befasst sich die vorliegende Dissertationsschrift.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Enzyme, Nukleinsäure- und Proteinstandards, Nukleotide, Vektoren, *P. infestans*-Stamm und Antikörper

Alle verwendeten Laborchemikalien, Antibiotika, X-Gal, sowie IPTG stammten von den Firmen Roth, Sigma und Serva. Yeast Nitrogen Base (YNB) wurde von der Firma Otto Nordwald, Organische Lösungsmittel von Merck, Agarose von Biozym und SARAN-Folie von ROTH bezogen.

Enzyme	Restriktionsendonukleasen	Fermentas
	T4-DNA-Ligase	Fermentas
	Dream-Taq-Polymerase	Fermentas
	HiFi-Taq-Polymerase	Fermentas
	SYBR-Green qRT-Mix	Fermentas
	RNase A	ROTH
	molekularbiologische „Kits“:	QIAquick Gel Extraction Kit
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit		Fermentas
TA Cloning Kit		Invitrogen
CloneJET PCR Cloning Kit		Fermentas
ECL-Kit		GE Healthcare
RNeasy Plant Mini Kit		QIAGEN
QIAfilter Plasmid Midi Kit		QIAGEN
Nukleinsäurestandards:		100 bp DNA Ladder
	1 kb DNA Ladder	Fermentas
Proteinstandards:	10-170 kDa Proteinmarker	Fermentas
Nukleotide:	Desoxynukleotide	Fermentas
	Oligonukleotide	eurofins MWG operon
	α -[³² P]-dATP	Hartmann
Vektoren:	pPalcA	Prof. Dr. P. Tudzynski (Universität Münster)
	pBK-CMV	Stratagene

	pFBT008	Prof. Dr. B. Thomma (Wageningen University and Research centre)
	pUC19	Invitrogen
	px-rk	Prof. Dr. B. Hause (IPB Halle)
<i>P. infestans</i> -Stamm:	208m2	Prof. Dr. S. Rosahl (IPB Halle)
Antikörper:	Kaninchen-anti- β -Lactamase	GE Healthcare
	Ziege-anti-Kaninchen-IgG	GE Healthcare

2.1.2. Geräte

ESI-UHPLC-QTOF-MS	Waters
Fluoreszenz-Mikroskop Apotome I	Zeiss
FT-ICR-MS	Bruker
HPLC	Waters
PCR-Maschine	BioRad
Precellys	peqlab
qRT-PCR-Maschine	Stratagene
Spritzenpumpen-ESI-MS API 3200	AB Sciex
Typhoon-Scanner	GE Healthcare

2.1.3. Medien, Puffer und Lösungen

In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Medien (Massenangaben bezogen auf 1 L) aufgeführt. Medien wurden stets autoklaviert. Anschließend konnte den Medien Antibiotika, IPTG, X-Gal oder Pflanzenextrakt zugefügt werden. Die Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika, IPTG bzw. X-Gal sind Tabelle 2.2 zu entnehmen.

Pflanzenextrakt aus Gerstenpflanzen wurde folgendermaßen hergestellt: 110 g Blätter wurden in 100 mL eiskaltem 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 25000 x g für 25 min bei 4°C. Der Überstand wurde mehrfach durch einen Papierfilter filtriert (0,45 μ m und 0,22 μ m). Der Pflanzenextrakt wurde bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Tabelle 2.3 gibt eine Übersicht über die verwendeten Lösungen und Puffer. Massenangaben beziehen sich jeweils auf 1 Liter Lösung bzw. Puffer.

Tabelle 2.1.: Zusammensetzung der verwendeten Medien.

Medium	Zusammensetzung
10x FRIES Nr. 3 ergänzt mit Saccharose und Hefeextrakt (FRIES-Medium)	50 g di-Ammoniumtartrat, 10 g NH ₄ NO ₃ , 1,3 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O, 10 g KH ₂ PO ₄ , 5 g MgSO ₄ * 7 H ₂ O, 1 g NaCl, pH 6,0; 75 g Saccharose, 10 g Hefeextrakt; vor dem Autoklavieren auf 1 x verdünnt
Haferbohnenmedium (HB)	34 g Bohnenmehl, 17 g Hafermehl, 8,5 g Saccharose, 15 g Bactoagar, 30 min gerührt (zum Quellen), 15 min 90°C
LB flüssig	5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 10 g Trypton
LB fest (LB-Agar)	LB flüssig plus 15 g Bactoagar
Limabohnenmedium (LIMBO) flüssig	50 g Limabohnen in 500 mL H ₂ O autoklaviert, 400 mL H ₂ O zugegeben, stark geschüttelt, filtriert, Filtrat plus zweifaches Volumen H ₂ O
LIMBO fest (LIMBO-Agar)	LIMBO flüssig plus 16 g Bactoagar
LIMBO fest mit Saccharose	LIMBO fest plus 205,4 g Saccharose
Medium „Yeast Nitrogen Base“ (YNB) flüssig	6,7 g YNB, 5 g Saccharose
YNB fest	YNB flüssig plus 16 g Bactoagar

Tabelle 2.2.: Konzentration der verwendeten Antibiotika.

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal)	32 μ g/mL
Ampicillin (Amp)	100 μ g/mL
Carbenicillin (Carb)	100 μ g/mL
Hygromycin (Hyg)	100 μ g/mL
Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)	1 mM
Kanamycin (Kan)	30 μ g/mL
Phleomycin (ble)	20 μ g/mL
Tetracyclin (Tet)	12,5 μ g/mL

Tabelle 2.3.: Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Puffer bzw. Lösung	Zusammensetzung
Isolierung von Plasmid-DNA	
Lösung 1	10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl, pH 8,0
Lösung 2	0,2 M NaOH, 1% (w/v) SDS
Lösung 3	3 M CH ₃ COONa, pH 5,0
Gelelektrophorese	
6x DNA-Ladepuffer	0,01% (w/v) Bromphenolblau, 60 mM EDTA, 60 % (v/v) Glycerin
50x TAE	2 M Tris/HCl, 50 mM EDTA, pH 8,3 (CH ₃ COOH)
SDS-PAGE	
10x SDS-Laufpuffer	5,0 M Tris/HCl, 1,9 M Glycin, 1%(w/v) SDS
2x SDS-Probenpuffer	125 mM Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) Glycerin, 10% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,01% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Western Blot	
10x TBST-Puffer	200 mM Tris/HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,6; Zugabe von 0,1% (v/v) Tween 20 beim Verdünnen auf 1x
10x Transfer-Puffer	200 mM Tris/HCl, 1,5 M Glycin, pH 8,6; Zugabe von 20% (v/v) MeOH beim Verdünnen auf 1x
Southern Blot	
20x SSC-Puffer	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
CHURCH-Puffer	67 g Na ₂ HPO ₄ , 2 mL H ₃ PO ₄ , 10 g BSA, 372 mg EDTA, 70 g SDS, nach dem Autoklavieren: 1 mL Salmon Sperm DNA (10 mg/mL)
Waschpuffer	3x SSC-Puffer, 0,1% SDS
DNA-Isolierung	
DNA Extraktionspuffer	1% N-Lauroylsarcosine (Natriumsalz), 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Polyvidon 25, pH 8,0 (mit HCl)
Protoplastenherstellung	
Protoplastenpuffer 1	10 mM Tris/HCl, 0,7 M KCl, 50 mM CaCl ₂ , pH 7,5
Protoplastenpuffer 2	10 mM Tris, 50 mM CaCl ₂ , 1 M Sorbitol
50% PEG6000	gelöst in Protoplastenpuffer 2

2.2. Arbeiten mit *Rhynchosporium commune*

Sämtliche Arbeiten wurden mit dem Wildtyp-Isolat UK7 bzw. mit den daraus erstellten Deletionsmutanten von *R. commune* durchgeführt.

2.2.1. Anzucht von *R. commune* im Flüssigmedium

Für die Anzucht von *R. commune* wurden verschiedene Medien (FRIES-Medium, LIMBO-Medium, YNB, Tab. 2.1) genutzt. 200 μL Sporensuspension (Titer: $5 \cdot 10^7$) wurden mit 1 L Medium gemischt. Davon wurde jeweils 50 mL in eine große Petrischale gegeben ($d = 30$ cm), bzw. Erlenmeyerkolben mit 100 mL ($V_{\text{Kolben}} = 250$ mL), 250 mL ($V_{\text{Kolben}} = 500$ mL) und 500 mL ($V_{\text{Kolben}} = 2000$ mL) befüllt. Es folgte eine 14-tägige Inkubation bei 17°C im Dunkeln unter langsamen Schütteln. Anschließend wurde das Pilzmyzel vom Medium getrennt (Filtration mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe, Filter: $0,45$ μm). Das Myzel wurde für die Isolierung von Protoplasten, DNA bzw. RNA genutzt bzw. zur späteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Das Kulturfiltrat wurde für die Isolierung von Sekundärmetaboliten verwendet.

2.2.2. Reisolierung von *R. commune* aus Gerstenblättern

Die Reisolierung von *R. commune* erfolgte nach Inokulation von Gerstenpflanzen (cv. Ingrid). Etwa 14 d nach Inokulation wurden die Blätter mit Symptomen in 1 bis 2 cm lange Stücke geschnitten, mit 70% EtOH gewaschen und anschließend mit 2% Natriumhypochlorit oberflächensterilisiert. Es folgte ein Waschschrift mit H_2O . Anschließend wurden die Blattstücke auf LIMBO-Agarplatten (12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tet) verteilt. Während der Inkubationszeit bei 17°C im Dunkeln (10 bis 14 d) wuchs Pilz aus den Blattstücken auf den LIMBO-Agar. Das Myzel wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten, auf LIMBO-Agar (ohne Antibiotikum) klein geschnitten und mit H_2O verteilt. Es folgte eine erneute Inkubation von 14 d bei 17°C im Dunkeln. Anschließend konnten die Sporen isoliert werden (Kapitel 2.2.3).

2.2.3. Isolierung von Sporen von *R. commune*

Die Isolierung von Sporen erfolgte von LIMBO-Agar-Platten, die mit Sporen beimpft wurden und 14 d bei 17°C inkubiert wurden. Jeweils 3 bzw. 4 Platten wurden nacheinander mit zweimal 10 mL Wasser überspült und die Sporen mit Hilfe einer sterilen Einmal-Pipette von der Oberfläche abgekratzt. Die Sporenlösung wurde über einen 4-lagigen Glaswolle-Filter filtriert. Das Filtrat wurde 15 min (17°C , $3000 \times g$) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Sporensediment wurde in einer geeigneten Menge (200 μL bis 1 mL) H_2O aufgenommen. Die Bestimmung des Titers (1:200 Verdünnung) erfolgte mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Einstellung des Sporentiters erfolgte auf $5 \cdot 10^7$. Anschließend wurde die Sporensuspension in 200 μL -Aliquots zunächst bei -20°C eingefroren. Nach 24 h erfolgte die weitere Lagerung

bei -80°C . Isolierte Sporen nach der Reisolierung werden als 0. Transfer bezeichnet. Wurde LIMBO-Agar mit Sporen des 0. Transfer beimpft wird der 1. Transfer erhalten usw.

2.2.4. Anlegen von Dauerkulturen von *R. commune*

Zum Anlegen von Pilzdauerkulturen wurde Myzel aus LIMBO-Agar ausgeschnitten. Die Myzelstücke wurden in ein 2 mL-Kryo-Röhrchen gegeben und mit einem 1:1-Gemisch aus 17% Milchpulver und 50% Glycerin aufgefüllt. Die Röhrchen wurden anschließend langsam auf -80°C gekühlt (Isopropanol-Gefriercontainer) und später in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.5. Inokulation von *Hordeum vulgare* mit *R. commune*

Zehn Gerstenpflanzen (7 d) wurden gleichmäßig mit 2 mL Suspension von $5 \cdot 10^6$ Sporen in Tween20- H_2O (0,1 % [v/v]) besprüht. Zu Beginn erfolgte die Inkubation der Pflanzen bei Dunkelheit (1 d), 100% Luftfeuchte (2 d) und einer Temperatur von 17°C . Die weitere Inkubation fand bei 50% Luftfeuchte, 17°C und einem Lichtregime von 14 h Licht und 10 h Dunkelheit statt. Die Probennahme (5 Primärblätter pro Zeitpunkt) erfolgte je nach Experiment 0, 1, 3, 6, 7, 10, 14 und 21 Tage nach Inokulation (dpi). Des Weiteren wurden 14 bzw. 21 Tage nach Inokulation die Symptome photographisch dokumentiert.

2.2.6. Präparation von Protoplasten aus *R. commune*

Sämtliche Arbeiten zur Präparation von Protoplasten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Sieben bis zehn Tage altes Myzel wurde sedimentiert und ca. 2 g in 20 mL Protoplastenpuffer 1 resuspendiert, es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Myzel erneut in 5 mL Protoplastenpuffer 1 aufgenommen. Anschließend wurde das Myzel mithilfe eines Ultra-Turrax (IKA) zerkleinert und homogenisiert (ca. 5 s). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 rpm, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das Myzel in 15 mL Protoplastenpuffer 1 aufgenommen. Anschließend wurden 125 mg Lysozym (aus *Trichoderma harzianum*) gelöst in 10 mL Protoplastenpuffer 1 zur Suspension gegeben. Nach einer 6-stündigen Inkubationszeit (29°C , 60 rpm) folgte ein Filtrationsschritt durch einen 3-lagigen Glaswolle-Filter. Der Filter wurde mit 25 mL Protoplastenpuffer 1 gespült und das Filtrat bei 4800 rpm 5 min sedimentiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 30 mL Protoplastenpuffer 1 (4800 rpm, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, und die Protoplasten in 500 μL Protoplastenpuffer 1 aufgenommen. Es folgte die Bestimmung des Titors (Verdünnung 1:200) mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Protoplasten wurden auf einen Titer von $5 \cdot 10^7$ eingestellt. Anschließend wurden die Protoplasten für die Transformation eingesetzt.

2.2.7. Transformation von Protoplasten aus *R. commune*

Für die Transformation von Protoplasten aus *R. commune* wurden 200 μL Protoplasten (Titer: $5 \cdot 10^7$) mit gereinigtem PCR-Produkt gemischt. Anschließend wurden 500 μL 50% PEG 6000 hinzu gegeben. Die Suspension wurde auf fünf Platten LIMBO-Agar + Saccharose gegeben und mit Hilfe von 300 bis 500 μL Protoplastenpuffer 2 verteilt. Nach dem Trocknen wurden die Platten bei 17°C im Dunkeln inkubiert. Nach einem Tag Inkubationszeit wurde das Selektionsmedium (10 μL Phleomycin in 400 μL FRIES-Medium pro Platte) auf den Platten verteilt. Eine weitere Inkubationszeit von 10 bis 14 d bei 17°C ohne Licht schloss sich an.

2.3. Arbeiten mit *Phytophthora infestans*

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde mit dem GFP-exprimierenden *P. infestans*-Stamm 208m2 (Si-Ammour *et al.*, 2003) gearbeitet. Die Kultivierung von *P. infestans* erfolgte auf HB-Medium bei 17°C im Dunkeln. Nach 11 d wurden zum Abschwemmen der Sporangien 8 mL H_2O auf das Myzel gegeben und kräftig geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Es folgte die Bestimmung des Titers (Verdünnung 1:200) mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Die Sporangien wurden auf einen Titer $1 \cdot 10^5$ eingestellt. Zur Untersuchung des Wachstums von *P. infestans* in Anwesenheit verschiedener Substanzen wurden in jedes Loch einer 48-Loch-Platte 900 μL HB-Medium gegeben. Anschließend wurde in jedes Loch *P.-infestans*-Sporangiensuspension (Titer: $1 \cdot 10^5$) gegeben. Die sofort gemessene GFP-Fluoreszenz (Cytofluor II) diente als Nullwert. Nach 24 h wurden die zu untersuchenden Substanzen in die jeweiligen Löcher gegeben. Die Messung der GFP-Fluoreszenz erfolgte täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 17°C im Dunkeln.

2.4. Arbeiten mit *Escherichia coli*

Im Laufe der Arbeiten wurde ausschließlich mit dem *E. coli*-Stamm XL1Blue (Resistenz: Tet) gearbeitet.

2.4.1. Erstellung von *E. coli*-Dauerkulturen (Glycerinkulturen)

Die Überdauerung von *E. coli*-Zellen kann bei -80°C in Form von Glycerinkulturen erfolgen. Hierfür wurde die *E. coli*-Flüssigkultur zu gleichen Teilen mit sterilem 50% (v/v) Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.2. Herstellung elektrokompetenter *E. coli*- Zellen

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden für die Transformation mittels Elektroporation (s. Kapitel 2.4.3) benötigt. 5 mL einer Vorkultur wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln an-

gezogen und am nächsten Tag zu 500 mL LB-Flüssigmedium plus Antibiotikum gegeben. Es folgte die Inkubation unter Schütteln bei 37°C bis die optische Dichte bei 600 nm (OD 600) zwischen 0,5 und 0,7 betrug. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 x g und 4°C 20 min sedimentiert, in 500 mL eiskaltem, sterilem H₂O resuspendiert und erneut bei 3000 x g und 4°C 15 min sedimentiert. Nach Resuspension in 175 mL eiskaltem, sterilem H₂O folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (s. oben). Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Bakteriensediment wurde anschließend in 50 mL sterilem 10%-igem Glycerin resuspendiert und durch Zentrifugation bei 3000 x g (4°C, 10 min) erneut sedimentiert. Nun erfolgte die Aufnahme der Zellen in 2 mL sterilem 10%-igem Glycerin. Die elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurden in Aliquots zu 50 µL in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Eine Überprüfung der Kompetenz der Zellen erfolgte durch Transformation mit dem Vektor pUC19.

2.4.3. Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Für die Transformation wurden 30 µL der elektrokompetenten *E. coli*-Zellen mit 1 µL der zu transferierenden DNA versetzt und einem Elektroschock von 2,5 kV (125 µF, 200 Ohm) unterzogen. Danach wurden die Zellen sofort zu 500 µL LB-Medium gegeben und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Drigalski-Spatels auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

2.4.4. Animpfen von *E. coli*-Flüssigkulturen bzw. Vorkulturen

Für Flüssigkulturen wurden 5 bis 50 mL (je nach Protokoll) LB-Flüssigmedium im Kulturröhrchen (Greiner) bzw. in einem sterilen Kolben mit der entsprechenden Menge an Antibiotika versetzt und mit einer Kolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C unter Schütteln.

2.5. Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

Die Isolierung von Plasmid-DNA, genomischer DNA bzw. RNA aus *E. coli*, *R. commune* und Gerste erfolgte nach den unten beschriebenen Methoden. Zur Isolierung von DNA bzw. RNA aus Pilz- bzw. Pflanzenmaterial wurden die Proben in 20-mL-Röhrchen des „Cryogenic Grinder“ (YETI) überführt und mit 3 Stahlkugeln (d= 4 - 5 mm) versehen. Die Homogenisierung der Proben erfolgte im „YETI“ nach folgendem Programm: fünfmal 30 s mit jeweils 30 s Pause. Das homogenisierte Pilzmyzel bzw. Pflanzenmaterial konnte für die Isolierung von DNA und RNA (s. Kapitel 2.5.1.2 bzw. 2.5.1.4) verwendet werden.

2.5.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-, Midi-Prep)

5 mL einer *E. coli*-Übernachtskultur (s. Kap. 2.4.4) wurden bei 3000 x g 10 min zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 100 μ L Lösung 1 resuspendiert und nach Zugabe von 200 μ L Lösung 2 sowie 10 μ L RNase A bei RT 15 min inkubiert. Anschließend wurden 200 μ L Lösung 3 zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 9878 x g für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und mit 70%-igem EtOH gewaschen. Nachdem die Plasmid-DNA getrocknet war, wurde sie in 20 μ L H₂O aufgenommen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Zur Isolierung einer größeren Menge Plasmid-DNA wurde der „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN) laut Herstellerangaben verwendet. Nach der Elution der Plasmid-DNA erfolgte die Aufbewahrung bei -20°C.

2.5.1.2. Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung von DNA aus Pilz- bzw. Pflanzenmaterial erfolgte in 2-mL-Eppendorfgefäßen. Diese wurden mit ca. 200 mg homogenisiertem Material (s. Kap. 2.5.1) befüllt, anschließend wurde 1 mL Extraktionspuffer zugegeben. Nach starkem Durchmischen wurden 5 μ L RNase A (10mg/mL) zugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt von 15 min bei 37°C. Anschließend wurden 200 μ L PCI zugegeben und die Proben 15 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min (9878 x g, 4°C). Anschließend wurde die obere Phase zu 1 mL Isopropanol gegeben, um die DNA zu fällen. Die Fällung der DNA wurde unterstützt indem die Proben für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert wurden. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 9878 x g und 4°C wurde die DNA sedimentiert. Es folgte ein Waschschrift mit 70% Ethanol. Im Anschluss wurde die DNA getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 50 μ L H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.1.3. Isolierung von genomischer DNA (Mutanten-Screen)

Zur Isolierung von DNA aus putativen Deletionsmutanten wurde folgendes Protokoll verwendet: Es wurde ein kleines Stück der angewachsenen Pilzmutante in ein 2-mL-Schraubdeckelgefäß mit Keramikkügelchen gegeben und mit 1 mL einer Lösung aus 0,5 M NaCl und 1% SDS bedeckt. Es folgte der Aufschluss im „Precellys“ (peqlab) mit folgendem Programm: dreimal 30 s mit jeweils 30 s Pause. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 9878 x g (RT) zentrifugiert und der Überstand mit Isopropanol gefällt. Die Fällung der DNA wurde unterstützt indem die Proben für mindestens eine Stunde bei 4°C inkubiert wurden. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 9878 x g und 4°C wurde die DNA sedimentiert. Es folgte ein Waschschrift mit 70% EtOH und im Anschluss daran wurde die DNA getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in 20 μ L H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.5.1.4. Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte mit dem „RNeasy Plant Mini Kit“ von QIAgen nach den Angaben des Herstellers. Der DNase-Verdau erfolgte laut QIAgen-Protokoll auf der Säule. Nach Elution der RNA wurde diese mit 1 μ L Ribolock versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide, deren Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten sowie die erwartete Größe des Amplikons sind den Tabellen A.1 und A.4 im Anhang zu entnehmen. Im Zuge dieser Dissertation wurden folgende Polymerasen verwendet: DreamTaq, sowie High Fidelity-Mix von Fermentas. Die Anwendung der Polymerasen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Einige Amplifikationen wurden mittels „Touchdown“-PCR (TDW) durchgeführt. Bei dieser speziellen Form der PCR wird in den ersten Synthese-Zyklen die Anlagerungstemperatur nur knapp unterhalb der Denaturierungstemperatur eingestellt. Die Oligonukleotide binden somit höchst spezifisch. Danach wird die Anlagerungstemperatur in jedem Zyklus um 1°C herabgesetzt. Damit soll die Amplifikation von unspezifischen Sequenzen verhindert werden. Beide Formen der PCR wurden in einem Thermocycler (Bio-Rad) nach unten stehenden Protokollen durchgeführt. Nach abgeschlossener PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe elektrophoretischer Auftrennung überprüft.

PCR:

1 Zyklus:	2 min	95°C	initiale Denaturierung
34 Zyklen:	30 s	94°C	Denaturierung
	30 s	45 - 65°C	Anlagerungstemperatur (Tab. A.4)
	30 s - 4 min	68/ 72°C	Synthese (Elongation, Tab. A.4)
	1 min - 8 min	72°C	finaler Syntheseschritt (doppelte Elongationszeit, Tab. A.4)
1 Zyklus:	unendlich	14°C	Abkühlen der Reaktion

Touchdown-PCR:

1 Zyklus:	2 min	95°C	initiale Denaturierung
15 Zyklen:	30 s	94°C	Denaturierung
	30 s	65°C (-1°C pro Zyklus)	Anlagerungstemperatur (Tab. A.4)
	30 s - 4 min	68/ 72°C	Synthese (Elongation, Tab. A.4)
	1 min - 8 min	72°C	finaler Syntheseschritt (doppelte Elongationszeit, Tab. A.4)
19 Zyklen:	30 s	94°C	Denaturierung
	30 s	50°C	Anlagerungstemperatur
	30 s - 4 min	68/ 72°C	Synthese (Elongation, Tab. A.4)
	1 min - 8 min	72°C	finaler Syntheseschritt (doppelte Elongationszeit, Tab. A.4)
1 Zyklus:	unendlich	14°C	Abkühlen der Reaktion

2.5.3. quantitative PCR (qPCR)

Die qPCR wurde verwendet, um die Pilzbiomasse *in planta* (qPCR) sowie die relative Expression (qRT-PCR) verschiedener Gene aus *R. commune* zu bestimmen. Die Quantifizierung wird durch die Fluoreszenzmessung am Ende eines jeden PCR-Zyklus durchgeführt, dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge des Amplikons zu. Gemessen wurde die Fluoreszenz des Farbstoffes SYBR-Green. Dieser lagert sich in der synthetisierten DNA ein. Neben SYBR-Green wird in der PCR der Referenzfluoreszenzfarbstoff ROX eingesetzt. Die Fluoreszenz von ROX dient als Hintergrund zur Normalisierung des SYBR-Green. Die ermittelten Ct-Werte („Cycle of threshold“, MxPro-Software) geben den PCR-Zyklus an, in dem die Fluoreszenz des SYBR-Green erstmalig über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt, dies geht einher mit dem maximalen Anstieg der Amplifikationskurve. Unter Verwendung von Referenzgenen konnten die erhaltenen Ct-Werte miteinander verglichen werden. Die relativen Wachstums- und Expressionsverhältnisse (ratio) wurden anhand der PCR Effizienzen (E) und der Differenz der Ct-Werte (der zu vergleichenden Ansätze) berechnet: eine unbehandelte Kontrolle (entspricht in diesem Fall 0) gegenüber einer behandelten Probe (Pfaffl, 2001).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_{t\text{Referenzgen, (Kontrolle - Probe)}}}}{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_{t\text{Zielgen, (Kontrolle - Probe)}}}}$$

Zur Bestimmung der Pilzbiomasse *in planta* wurde als Referenzgen *HvHtrA* (Graap, 2013) aus Gerste verwendet, auf Pilzseite wurde ein Fragment der *GPD* (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) amplifiziert. In Vorversuchen wurde festgestellt, dass die Oligonukleotide HO05J24_RT_s und HO05J24_RT_as (Amplifikation *HvHtrA*) bzw. *GPD_RT_s* und *GPD_RT_as* spezifisch für Gerste bzw. *Rhynchosporium* sind. Zur Quantifizierung von Transkriptmengen wurde zunächst RNA isoliert, die in cDNA (laut Herstellerangaben: „RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit“) umgeschrieben wurde. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt für die qRT-

PCR eingesetzt. Zur Ermittlung der relativen Expression verschiedener Gene diente *GPD* als Referenzgen, die zu untersuchenden Gene dienten als Zielgen bzw. als Gen, dessen Expression bestimmt werden sollte (Pfaffl, 2001). Die Sequenzen der Oligonukleotide für die qPCR sowie die ermittelten Effizienzwerte der Oligonukleotidpaare sind in den Tabellen A.1 sowie A.5 im Anhang zusammen gefasst. Die qPCR wurde mit dem SYBR-Green-Mix von Fermentas nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei ein Gesamtvolumen von 10 μL anstelle von 25 μL genutzt wurde. Die Proben wurden dem unten stehenden Programm unterzogen. Die Auswertung erfolgte mittels des Programms MxPro von Stratagene.

1 Zyklus:	10 min	95°C
50 Zyklen:	30 sec	95°C
	30 sec	60°C
	30 sec	72°C
1 Zyklus:	1 min	95°C
	30 sec	60°C
	30 sec	95°C
	30 sec	25°C

2.5.4. Restriktion von DNA

Die Restriktion wurde zur Überprüfung von klonierten Plasmiden sowie zur Umklonierung verwendet. Für die Restriktion von Plasmiden wurden 2 μg der Plasmid-DNA (s. Kap. 2.5.1.1) mit 1 U des Restriktionsenzym zwei bis drei Stunden bei der enzymespezifischen Temperatur (Herstellerangaben) inkubiert. Des Weiteren wurde die Methode der Restriktion für die Überprüfung von genomischer DNA mittels Southern Blot eingesetzt. Hierbei wurden 5 bis 10 μg der genomischen DNA mit 2 U der entsprechenden Enzyme versetzt und über Nacht bei der enzymespezifischen Temperatur (Herstellerangaben) inkubiert. Nach der Restriktion wurde der Ansatz mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.5.5. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA erfolgte mit Agarosegelen von 0,8% bis 1% (w/v) Agarose. Hierfür wurde Agarose in 1x TAE-Puffer geschmolzen und nach Zugabe von EtBr (1:100000) bzw. StainG (1:100) (beide Farbstoffe interkalieren in Nukleinsäuren) zum Gießen des Gels verwendet. Als Laufpuffer diente 1x TAE und die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Detektion der Banden erfolgte unter UV-Licht.

2.5.6. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen ausgeschnitten und nach den Angaben des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAgen) eluiert. Die Elution erfolgte dabei abweichend vom Protokoll

mit 20 μL H_2O .

2.5.7. Ligation

Mit Restriktionsendonukleasen geschnittene DNA-Fragmente und durch diese Enzyme linearisierte Vektoren konnten durch Zugabe von T4-DNA-Ligase und dem entsprechenden Puffer ligiert werden. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Die Ligation von PCR-Produkten erfolgte nach den Angaben des „TA Cloning-Kit“ (Invitrogen, Vektor: pCR2.1) bzw. „CloneJet PCR Cloning Kit“ (Fermentas, Vektor: pJet), wobei die Ansatzgröße jeweils halbiert wurde.

2.5.8. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte durch die Firma LGC Genomics (Berlin) nach deren Angaben mit den entsprechenden Oligonukleotiden.

2.5.9. DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Die Methode des „Southern Blot“ ermöglicht den Nachweis einer bestimmten Gensequenz in einem DNA-Gemisch. Dabei wird die DNA mit einer spezifischen Sonde hybridisiert, die nur an die bestimmte Sequenz bindet (Southern, 1975).

2.5.9.1. Vorbereitung der DNA zur Hybridisierung

5 bis 10 μg der zu untersuchenden DNA wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurden die Taschen des Agarosegel verschlossen, indem sie mit Agarose befüllt wurden. Es folgte ein 15-minütiger Depurinierungsschritt in 0,25 M HCl gefolgt von zwei kurzen Waschschritten mit Wasser und einer 30-minütigen Neutralisierung in 0,5 M NaOH. Zur Überführung der DNA vom Agarosegel auf eine Nitrocellulosemembran (Roti-Nylon plus, positiv geladen, Porengröße 0,45 μm) wurde der Vacuum Blotter (Model 785) von Biorad genutzt. Dieser Schritt erfolgte in 10x SSC-Puffer und dauerte 90 min. Die Membran wurde 5 min in 2x SSC-Puffer inkubiert, getrocknet und 30 min bei 80°C gebacken. Die Aufbewahrung der Membran erfolgte bei -20°C, bis sie mit einer genspezifischen Sonde hybridisiert wurde.

2.5.9.2. Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde

Die Sonden zur Hybridisierung wurden mit α -[^{32}P]-dATP radioaktiv markiert. Die entsprechenden Sonden wurden in die Vektoren pJet bzw. pCR2.1 kloniert und mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt. Die Bande der Sonde wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und eluiert (in 20 μL H_2O). Die Sondenherstellung erfolgte nach den Angaben des „Megaprime DNA-Labeling Kit“ (GE Healthcare). Es wurden 10 μL der Gelelution eingesetzt. Zur

Entfernung von nicht inkorporiertem radioaktivem α - $[^{32}\text{P}]$ -dATP wurde die Sonde mit „Illustra MicroSpin G-50 Columns“ (GE Healthcare) nach Herstellerangaben gereinigt. Es folgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C gefolgt von einem kurzen Abkühlen auf Eis. Die Sonde konnte nun für die Hybridisierung eingesetzt werden. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Sonde bei 4°C gelagert, um sie für weitere Hybridisierungen nutzen zu können.

2.5.9.3. Hybridisierung

Vor der Hybridisierung mit einer genspezifischen Sonde wurde die Membran einer Prähybridisierung in CHURCH-Puffer unterzogen (1 h, 42°C). Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde (1 bis 3 d, 42°C) in 50 mL CHURCH-Puffer. Zum Entfernen unspezifisch gebundener Sonde wurde die Membran dreimal 20 min mit Waschpuffer gewaschen (65°C). Anschließend wurde die Membran in SARAN-Folie eingeschlagen und in eine Kassette auf einen Phospho-Screen gelegt. Nach 24 h erfolgte die Auswertung am Typhoon-Scanner (GE Healthcare). Nach erfolgreicher Auswertung wurde die Membran mit 0,5% SDS von sämtlicher Sonde frei gewaschen (10 min, 95°C) und konnte einer erneuten Hybridisierung mit einer weiteren Sonde unterzogen werden.

2.6. Arbeiten mit Proteinen

2.6.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde nach der Standardmethode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Zusammensetzungen von Trenn- bzw. Sammelgel sind unten aufgeführt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proteinproben in 2x Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C 5 min denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 100 V während die Proben in das Sammelgel liefen, bzw. bei 150 V während der Auftrennung im Trenngel.

Sammelgel	Trenngel (15%)	
3,8 mL	3,6 mL	H ₂ O
830 μL	5 mL	30% Acrylamid Mix
315 μL		2 M Tris (pH 6,8)
	1,3 mL	3 M Tris (pH 6,8)
50 μL	100 μL	10% SDS
75 μL	100 μL	10% APS
4 μL	4 μL	TEMED

2.6.2. Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Die Übertragung der Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in einer Transferkammer bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 1 h. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 5%-igem (w/v) Milchpulver in 1x TBST inkubiert. Die Inkubation des primären Antikörpers (Kaninchen-anti- β -Lactamase, 1:15000) erfolgte in 5%-igem (w/v) Milchpulver in 1x TBST-Lösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran 6 x 10 min in 1x TBST gewaschen und 1 h mit einem Peroxidase-gekoppeltem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG, 1:5000) in 5%-igem (w/v) Milchpulver in 1x TBST-Lösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (6 x 10 min mit 1x TBST) erfolgte der Nachweis der Peroxidaseaktivität mit Hilfe des „ECL-Kit“ (GE Healthcare) nach den Angaben des Herstellers. Die Membran wurde in SARAN-Folie eingewickelt, anschließend wurde ein Röntgenfilm auf die Membran gelegt, der zu verschiedenen Zeitpunkten entwickelt wurde.

3. Ergebnisse

3.1. Erstellung von Deletionsmutanten in *R. commune*

3.1.1. Auswahl der zu deletierenden Gene

Die Auswahl der Gene zur Deletion erfolgte anhand einer EST-Datenbank von *R. commune* Wildtyp UK7 (A. Navarro-Quezada und W. Knogge, unveröffentlicht). In die Auswahl wurden Gene einbezogen, deren Genprodukte die Zellwand destabilisieren (CWDEs, „cell wall degrading enzymes“, zellwandabbauende Enzyme). Zusätzlich erfolgte eine Auswahl von Genen die Polyketidsynthasen kodieren, da diese niedermolekulare Substanzen produzieren, die möglicherweise als Virulenzfaktoren wirken. Weitere Auswahlkriterien zur Identifizierung von Effektorproteinen sind beispielsweise die Größe (< 30 kDa), der Cysteingehalt (Effektorproteine sind zumeist klein und cysteinreich), ihre Expression während der Pathogenese sowie die Vorhersage als extrazelluläre (WoLF-PSort-Algorithmus, Horton *et al.*, 2007) bzw. sezernierte Proteine (SignalP-Algorithmus, Petersen *et al.*, 2011). Weiterhin sollten keine Homologien zu anderen Pilzeffektoren vorliegen (Stergiopoulos und de Wit, 2009; Syme *et al.*, 2013). Ein weiteres Kriterium für mögliche Effektoren sind Gene, die nur in *R. commune*, aber nicht in den anderen *Rhynchosporium*-Arten vorhanden sind. Allerdings lagen die Genomannotationen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor, daher konnte das zuletzt genannte Kriterium nicht mit einbezogen werden.

Folgende Gene wurden aus der EST-Datenbank ausgewählt: ein Gen, das eine Pektinmethylesterase (PME) kodiert, vier Gene, die Polyketidsynthasen (PKS) kodieren sowie vier Gene, deren Genprodukte mögliche Effektorproteine darstellen. Tabelle 3.1 zeigt eine Übersicht über die ausgewählten Gene, ihre Gen-ID in der EST-Datenbank, die spätere Genbezeichnung sowie die mögliche Funktion des abgeleiteten Genprodukts laut Pfam (Punta *et al.*, 2011).

PMEs gehören zu den CWDEs. Sie verringern den Methylierungsgrad von Pektin, einem Bestandteil der pflanzlichen Zellwand, wodurch die Zellwand destabilisiert wird (Pelloux *et al.*, 2007). Dadurch kann die Zellwand leichter durch Pektatlyasen (PLs) und Polygalakturonasen (PGs) abgebaut werden. Der Abbau der pflanzlichen Zellwand ist wichtig für Pathogene, weil so die Penetration des Pilzes erleichtert wird (Pelloux *et al.*, 2007). Die Deletion von *PME1* in *Botrytis cinerea* führt bspw. zu einer Mutante, die keine volle Virulenz auf verschiedenen Wirten zeigt (Valette-Collet *et al.*, 2003).

Die von PKS gebildeten Produkte können als Toxine wirken und somit einen Einfluss auf die Wirtspflanze haben. Zum Beispiel ist ACE1 (PKS-NRPS-Hybrid) ein Avirulenzgenprodukt von

Tabelle 3.1.: Übersicht und Expression der für die Erstellung der Deletionsmutanten ausgewählten Gene.
(PME) Pektinmethylesterase, (RxP) *Rhynchosporium*-RxLR-Protein, (PKS) Polyketidsynthase, (dpi)
Tage nach Inokulation, (+) Expression, (-) keine Expression

Gen-ID	mögliche Funktion des Genprodukts	Expression		
		0 dpi	2 dpi	6 dpi
zellwandabbauendes Enzym				
11029 (<i>PME1</i>)	Pektinmethylesterase	+	+	+
Gene für putative Effektorproteine				
04424	kleines, cysteinreiches Protein, spezifisch für <i>R. commune</i>	-	+	+
11236	Glycosylphosphatidylinositolanker	+	+	+
01266 (<i>RxP1</i>)	putatives Protein mit RxLR-Motiv, spezifisch für <i>R. commune</i>	+	-	+
19382	putatives Protein mit RxLR-Motiv, spezifisch für <i>R. commune</i>	+	+	+
Polyketidsynthasen				
07338 (<i>PKS1</i>)	PKS	+	+	+
03915 (<i>PKS2</i>)	PKS	+	+	+
05345 (<i>PKS3</i>)	PKS	+	+	+
06040 (<i>PKS4</i>)	PKS	+	+	-

Magnaporthe grisea. ACE1 bzw. der durch ACE1 synthetisierte Sekundärmetabolit spielt eine Rolle für die Virulenz des Pilzes (Böhnert *et al.*, 2004; Collemare *et al.*, 2008b).

Bei den vier ausgewählten Genen, die mögliche Effektorproteine kodieren, handelt es sich unter anderem um ein Gen, dessen Genprodukt Homologien zu einem Glykosylphosphatidylinositolanker (GPI) aufweist. GPI verankern Oberflächenproteine in der Zellmembran (Tsai *et al.*, 2012). Diese Oberflächenproteine könnten dafür sorgen, dass *R. commune* die Erkennung durch pflanzliche Rezeptoren umgehen kann. Durch die Deletion des Ankers wäre es denkbar, dass gleich mehrere Effektorproteine, die möglicherweise die Pflanze-Pathogen-Interaktion beeinflussen, an der Oberfläche von *R. commune* verschwinden. *Trypanosoma brucei*, der Auslöser der Schlafkrankheit verändert die durch GPI in der Zellmembran verankerten Oberflächenproteine, um so die Erkennung durch das Immunsystem des Menschen zu verhindern (Wang *et al.*, 2010). Für die anderen drei Genprodukte konnten keine homologen Proteine gefunden werden (NCBI-Blast, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009), was darauf hinweist, dass sie möglicherweise spezifisch für *R. commune* und die Interaktion mit Gerste sind. Eines dieser drei Genprodukte ist klein, cysteinreich und wird durch den SignalP-Algorithmus (Petersen *et al.*, 2011) als sezerniert klassifiziert. Die anderen beiden werden durch den SignalP-Algorithmus als nicht sezerniert eingestuft, allerdings ergibt eine Überprüfung mit dem SecretomeP-Algorithmus (Bendtsen *et al.*, 2004) eine Klassifizierung als möglicherweise unkonventionell sezernierte Proteine. Weiterhin wurde in diesen beiden Proteinen ein RxLR-Motiv festgestellt, dass wie in den *Phytophthora*-RxLR-Effektoren relativ nah am

N-Terminus lokalisiert ist (Win *et al.*, 2007). RxLR-Effektoren sind bisher ausschließlich aus Oomyceten bekannt. Bei RxLR-Effektoren handelt es sich um Proteine, die nach der Sekretion durch das Pathogen, in die Pflanzenzelle transloziert werden. Es konnte gezeigt werden, dass dafür das RxLR-Motiv als Translokationssignal benötigt wird (Bozkurt *et al.*, 2012).

Eine Analyse von cDNA ergab, dass alle ausgewählten Gene *in planta* exprimiert werden. Für diese Analyse wurden Proben 0, 2 und 6 dpi verwendet. Aus den Proben wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und eine PCR mit den entsprechenden Oligonukleotidpaaren (Tab. A.3 im Anhang, Spalte „WT-Gen vorhanden“) durchgeführt, die entsprechenden Anlagerungstemperaturen und Syntheszeiten sind Tabelle A.4 im Anhang zu entnehmen. In Tabelle 3.1 ist aufgeführt, welches Gen *in planta* zu den verschiedenen Zeitpunkten exprimiert ist. Abbildung 3.1 zeigt beispielhaft eine Analyse von Gen-ID 01266 bzw. 19382. Diese sind bspw. zu den Zeitpunkten 0 und 6 dpi (01266) bzw. 0, 2 und 6 dpi (19382) *in planta* exprimiert. Da alle der ausgewählten Gene zu mindestens zwei Zeitpunkten *in planta* exprimiert sind, sollten von allen ausgewählten Genen Deletionsmutanten erstellt werden.



Abbildung 3.1.: Expression ausgewählter Gene *in planta*. (a) Expression Gen-ID 01266, (b) Expression Gen-ID 19382, (1) unbehandelte Kontrolle, (2, 3, 4) 0, 2 bzw. 6 dpi

3.1.2. Erstellung der Deletionsmutanten

Die Erstellung der Deletionsmutanten erfolgte durch den Austausch des entsprechenden Gens (GOI, „gene of interest“) gegen eine Resistenzkassette (homologe Rekombination). Dafür war es nötig, entsprechende Deletionskonstrukte zu erstellen, in welchen die Resistenzkassette (Phleomycin) vom 5'- und 3'-Bereich des GOI flankiert wird. In Abbildung 3.2 ist schematisch der Aufbau der Deletionskonstrukte dargestellt (Kuwayama *et al.*, 2002).

Experimentell wurden zuerst der 5'-Bereich, die Phleomycinkassette sowie der 3'-Bereich des entsprechenden Gens einzeln amplifiziert (Abb. 3.2a und b) und die PCR-Produkte anschließend einer PCR mit allen drei Einzelfragmenten unterzogen (Fusions-PCR, Abb. 3.2c, Kuwayama *et al.*, 2002). In Tabelle A.2 im Anhang sind die genutzten Oligonukleotidpaare zur Amplifikation der Einzelfragmente sowie für die Fusions-PCR aufgeführt. In Abbildung 3.3a, b und c sind beispielhaft Gelbilder der Amplifikation von 5'-Bereich, Phleomycinkassette, 3'-Bereich sowie die Fusions-PCR der drei Einzelfragmente gezeigt. Die PCR-Produkte der Einzelfragmente wurden per Gelelektion aus dem Agarosegel gereinigt und zur Fusions-PCR eingesetzt.

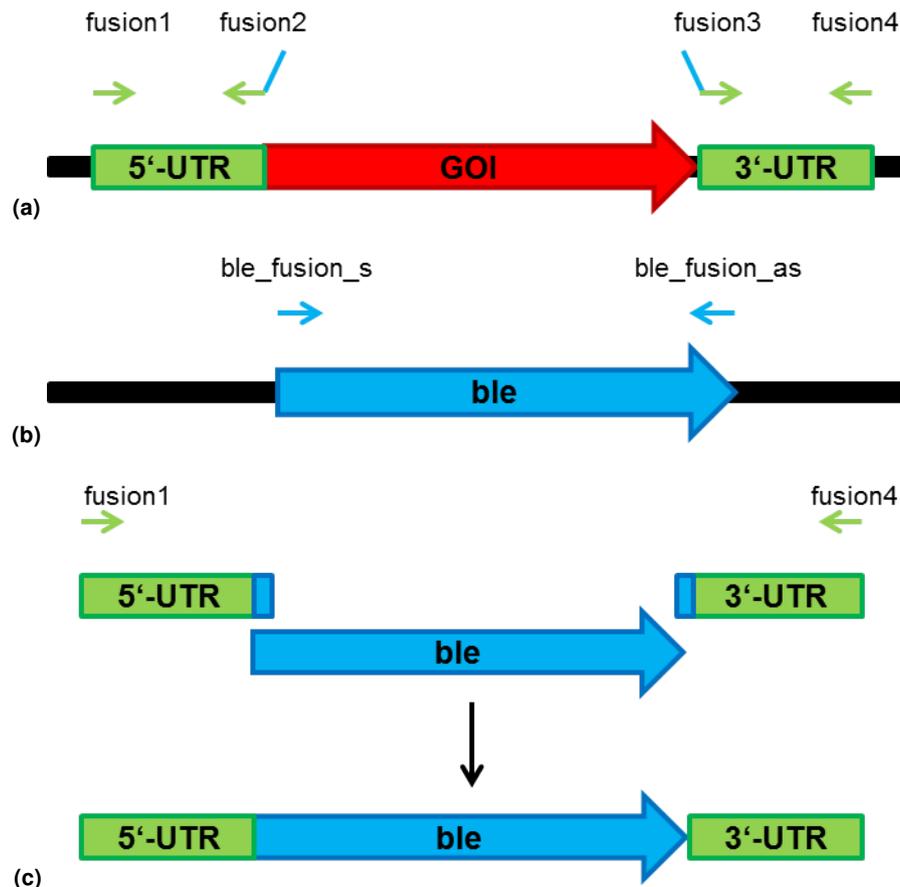


Abbildung 3.2.: Schematische Darstellung zum Aufbau der Deletionskonstrukte. (a) Amplifikation des 3'- bzw. 5'-Fragments, (b) Amplifikation der Phleomycinkassette, (c) Fusions-PCR zur Amplifikation des Deletionskonstrukts, (UTR) untranslatierte Region, (ble) Phleomycinkassette, (GOI) Zielgen

Die Fusions-PCR wurde mit den in Tabelle A.4 (s. Anhang) angegebenen Elongationszeiten als Touchdown-PCR durchgeführt. Daraus resultierende Deletionskonstrukte (Abb. 3.3c, Pfeil rechts) wurden wiederum per Gelelution gereinigt. Es folgte die Bestimmung der DNA-Menge um später die Transformationsfrequenz bzw. die Effizienz der homologen Rekombination berechnen zu können. Anschließend wurden die Deletionskonstrukte in Protoplasten transferiert.

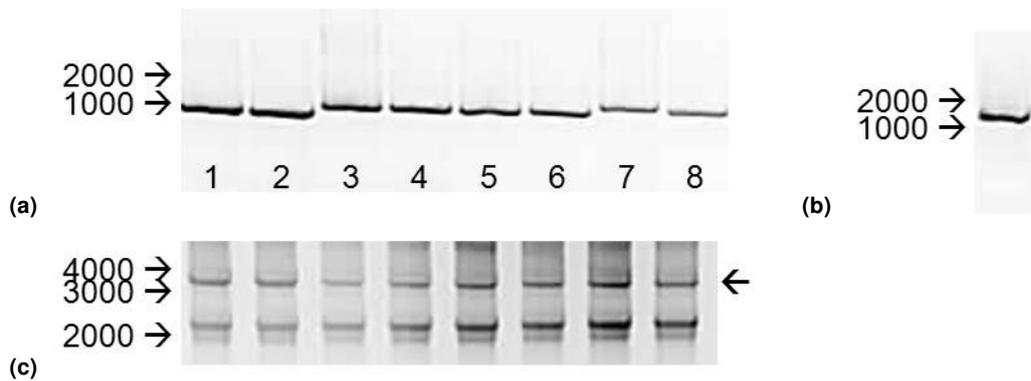


Abbildung 3.3.: Erstellung der Deletionskonstrukte mittels PCR. (a) PCR zur Amplifikation des 5'- bzw. 3'-Fragments, (1 + 2) 5'- bzw. 3'-Fragment Gen-ID 07338, (3 + 4) 5'- bzw. 3'-Fragment Gen-ID 04424, (5 + 6) 5'- bzw. 3'-Fragment Gen-ID 11029, (7 + 8) 5'- bzw. 3'-Fragment Gen-ID 06040, (b) PCR zur Amplifikation der Phleomycinkassette, (c) Fusions-PCR zur Amplifikation des Deletionskonstrukts für Gen-ID 07338, Pfeil rechts zeigt die Höhe der Bande an, die zur Transformation gereinigt wurde

3.1.3. Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten mittels PCR (Mutanten-Screen)

Die homologe Rekombination ist schematisch in Abbildung 3.4 dargestellt. Durch die Sequenzen der 5'- bzw. 3'-Bereiche der zu deletierenden Gene kann es zu einer homologen Rekombination kommen, die das GOI gegen die Resistenzkassette (ble, Phleomycin) austauscht. Vierzehn Tage nach der Protoplastentransformation erfolgte eine Vereinzelung der gewachsenen *R.-commune*-Kolonien auf Selektionsmedium mit Phleomycin. Auf diesem sollten nur Kolonien wachsen, die das Deletionskonstrukt mit der Phleomycinkassette tragen. Da das Ereignis der homologen Rekombination nicht zwangsläufig stattfinden muss, sondern zusätzlich und vorwiegend Integrationen an anderer Stelle im Genom erfolgen können, wurde die DNA sämtlicher Kolonien nach weiteren 14 Tagen mittels PCR überprüft. Damit sollte gezeigt werden, ob es sich um homologe oder heterologe Rekombinanten handelt.

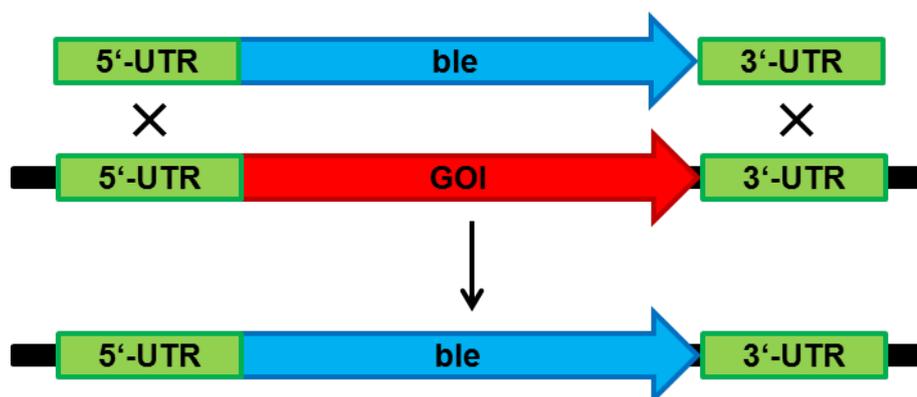


Abbildung 3.4.: Schematische Darstellung der homologen Rekombination. (UTR) untranslatierte Region, (ble) Phleomycinkassette, (GOI) zu deletierendes Zielgen

Abbildung 3.5 gibt eine Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide für die Überprüfung der erzeugten Rekombinanten. Zur Überprüfung wurde DNA laut Protokoll 2.5.1.3 isoliert und eine PCR mit den Oligonukleotiden entsprechend Abbildung 3.5 durchgeführt (Tab. A.1, A.3 und A.4 im Anhang). Die erste PCR (Oligonukleotide s/ as des entsprechenden Gens) sollte zeigen, ob das Wildtypgen noch vorhanden ist. Mutanten, die keine Wildtypbande zeigten, wurden mittels PCR auf die richtige Bandengröße bei Verwendung der Oligonukleotide fusionA und fusionB, test5' und test_5'Int(as) (5'-Integrationsstelle) bzw. test_3'Int(s) und test3' (3'-Integrationsstelle) überprüft. Die Überprüfung mittels der Oligonukleotide fusionA und fusionB ergibt unterschiedliche Amplikongrößen im Wildtypgen bzw. Deletionskonstrukt (Abb. 3.5 und Tab. A.4). Bei der Überprüfung der Integrationsstellen ergibt sich nur eine Bande, wenn die Integration an der richtigen Stelle im Genom erfolgt ist, da ein Oligonukleotid innerhalb und eines außerhalb des Deletionskonstruktes bindet (Abbildung 3.5).

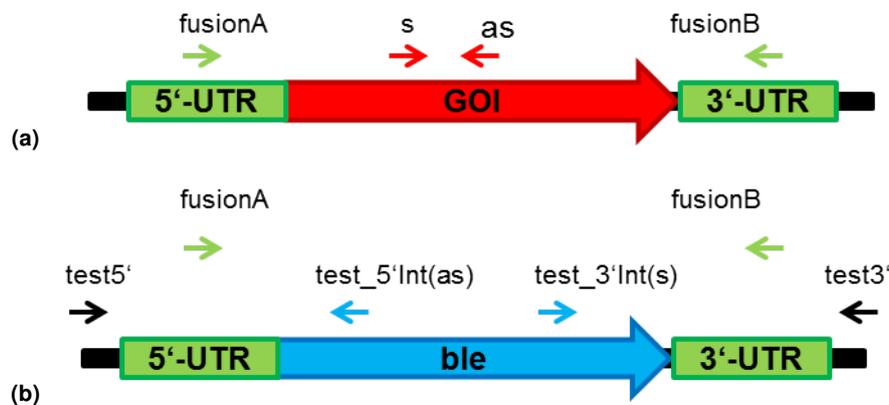


Abbildung 3.5.: Schematische Übersicht der Oligonukleotide für die Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten (Mutanten-Screen). (a) Oligonukleotide zur Überprüfung des Vorhandenseins des Wildtypgens, (b) Oligonukleotide zur Überprüfung des Vorhandenseins des Deletionskonstrukts (fusionA und fusionB) bzw. zur Überprüfung der 5'- und 3'-Integrationsstellen (5'-Int und test5' bzw. 3'-Int und test3'), (UTR) untranslatierte Region, (ble) Phleomycinkassette, (GOI) zu deletierendes Zielgen

Tabelle A.3 im Anhang zeigt eine Übersicht über die genutzten Oligonukleotide zur Überprüfung der homologen Rekombinanten. In Abbildung 3.6 ist beispielhaft ein Gelbild für die Überprüfung via PCR gezeigt. Abbildung 3.6a zeigt hierbei die PCR zum Nachweis des Wildtypgens. Die fehlende Bande ist ein Hinweis auf eine positive homologe Rekombination, während die restlichen Proben eine Bande zeigen, wie auch der Wildtyp und somit keine homologen Rekombinanten sind. Abbildung 3.6b zeigt die Kontrolle, ob das Deletionskonstrukt vorhanden ist, dabei ist zu sehen, dass in zwei Proben die Bande in Höhe des Deletionskonstrukts (3000 bp) sowie in der Größe des Wildtypgens erhalten wird (ca. 5300 bp). In diesen Mutanten ist das Deletionskonstrukt nicht an der gewünschten Stelle im Genom integriert. Im Gegensatz dazu zeigt sich in einer Probe ausschließlich eine Bande in Größe des Deletionskonstrukts, was bedeutet, dass es sich hier um eine homologe Rekombinante handelt. Als Kontrolle dient

DNA vom Wildtyp UK7, die ausschließlich die Wildtypbande bei ca. 5300 bp zeigt. Die Abbildungen 3.6c und d zeigen die Überprüfung der Integrationsstellen im 5'- und 3'-Bereich. In den drei abgebildeten Mutanten konnten die 5'- und 3'-Integrationsstellen bestätigt werden, während in der Kontrolle mit DNA von Wildtyp UK7 keine Bande in der PCR erhalten wird, da nur einer der beiden Oligonukleotide binden kann. Zur nochmaligen Überprüfung der Integrationsstellen wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel gereinigt und eine Sequenzierung mit den entsprechenden Oligonukleotiden durchgeführt (Daten nicht gezeigt).

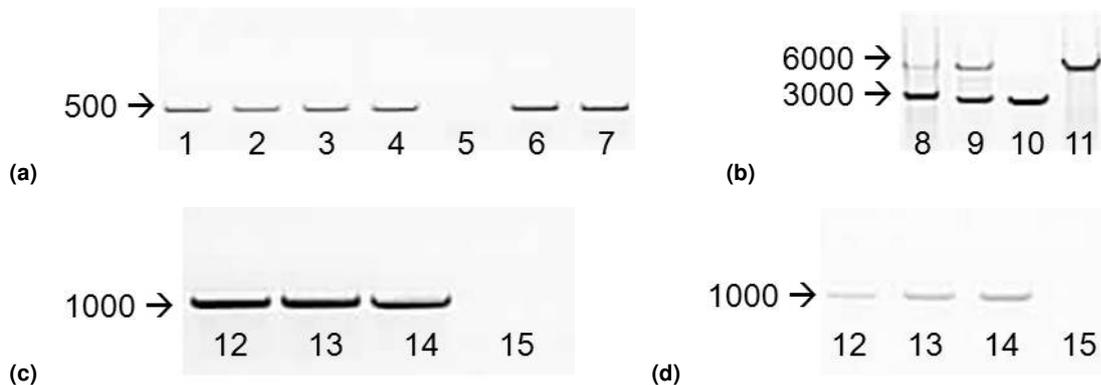


Abbildung 3.6.: Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten (Mutanten-Screen). (a) PCR zur Überprüfung Wildtypgen Gen-ID 03915, (1 - 4, 6) Mutanten ohne homologe Rekombination, (5) Mutante mit homologer Rekombination, (7) UK7 - Wildtyp, (b) PCR zur Überprüfung der Insertion des Deletionskonstrukts Gen-ID 07338, (8 + 9) Wildtypgen und Deletionskonstrukt vorhanden, (10) nur Deletionskonstrukt vorhanden, (11) Wildtyp UK7, (c + d) PCR zur Überprüfung der 5'- bzw. 3'-Integrationsstelle Gen-ID 07338, (12 - 14) Integrationsstellen positiv, (15) Wildtyp UK7

Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht darüber, wieviele Kolonien nach der ersten Selektion umgesetzt werden konnten, wieviele Kolonien angewachsen sind sowie die tatsächliche Anzahl an homologen Mutanten nach Überprüfung mittels PCR. Weiterhin ist in dieser Tabelle die Transformationsfrequenz sowie die Effizienz der homologen Rekombination angegeben. Es konnten drei unabhängige Mutanten für *PKS1* (Gen-ID 07338, #15, #180, #227), jeweils eine Mutante für *PKS2* (Gen-ID 03915, #4101) bzw. *PKS3* (Gen-ID 05345, #5135), fünf unabhängige Deletionsmutanten für *PME1* (Gen-ID 11029, #431, #443, #456, #488, #497) sowie zwei unabhängige Deletionsmutanten für *RxP1* (Gen-ID 01266, #2055, #2217) identifiziert werden. Für die Erstellung von Dauerkulturen und weiterführende Experimente wurden die identifizierten homologen Rekombinanten zunächst auf LIMBO-Agar angezogen. Es folgte eine Passage über eine susceptible Gerstensorte zur Reisolierung von Sporen, die für die nachfolgenden Arbeiten benötigt wurden.

Es war nicht möglich, Deletionsmutanten für die Gene *PKS4* und Gen-IDs 04424, 11236 (GPI) und 19382 zu generieren. Ein Grund könnte zumindest für Gen-ID 04424 die vergleichsweise niedrige Transformationsfrequenz sein. Für *PKS4* und die Gen-IDs 11236 und 19382 ist die Transformationsfrequenz mit der von *PME1* vergleichbar, wo gleich fünf positive Rekomb-

binanten erhalten wurden. Ein weiterer Grund für das Fehlschlagen der Deletion könnte sein, dass die Deletion lethal für *R. commune* ist. Möglicherweise nehmen die Genprodukte eine Schlüsselrolle während der Entwicklung von *R. commune* ein. Beispielsweise führt die Deletion von *PPF1* („putative factor in pathogenicity“, putativer Pathogenitätsfaktor) in *R. commune* zu einer apathogenen Mutante, die kaum überlebensfähig ist (Siersleben, 2011). Eventuell liegt dieser Fall auch für *PKS4* bzw. die Gen-IDs 04424, 11236 und 19382 vor. Weiterhin wäre es möglich, dass die Gene in großer Nähe zu bzw. im Bereich von Heterochromatin liegen. In heterochromatischen Bereichen können aufgrund des starken Verpackungsgrades keine Strangbrüche erfolgen. Somit kann eine homologe Rekombination hier selten bzw. gar nicht stattfinden (Peterson, 2011). Da die Transformationsfrequenzen der erfolgreichen Deletionen kaum von denen der fehlgeschlagenen Deletionen abweichen, kann keine Aussage getroffen werden, ob die Deletion von *PKS4* und den Gen-IDs 04424, 11236 und 19382 lethal ist oder andere biologische Hintergründe hat.

Tabelle 3.2.: Zusammenfassung der erstellten Deletionsmutanten. (PME) Pektinmethylesterase, (RxP) *Rhynchosporium-RxLR*-Protein, (PKS) Polyketidsynthasen, Transformationsfrequenz ist die Anzahl der Rekombinanten pro μg eingesetzter DNA, Effizienz der homologen Rekombination ist das Verhältnis positiver zur Gesamtzahl der Rekombinanten

Gen-ID	eingesetzte DNA-Menge [μg]	Anzahl der Rekombinanten		Transformationsfrequenz [Rekombinanten/ μg DNA]	Effizienz der homologen Rekombination [%]
		umgesetzt	angewachsen positiv		
zellwandabbauendes Enzym					
11029 (PME1)	8,5	248	186	21,9	2,7
Gene für putative Effektorproteine					
04424	5	45	42	8,4	-
11236	8	236	187	23,4	-
01266 (RxP1)	20	1840	1782	89,1	0,11
19382	20	576	528	26,4	-
Polyketidsynthasen					
07338 (PKS1)	8,5	358	302	35,5	1,0
03915 (PKS2)	20	948	822	41,1	0,12
05345 (PKS3)	14	864	768	54,9	0,13
06040 (PKS4)	20	640	605	30,3	-

3.1.4. Überprüfung der erstellten Deletionsmutanten mittels DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Eine weitere Verifizierung der Mutanten sowie die Überprüfung möglicher mehrfacher Integrationen des Deletionskonstruktes erfolgte mittels DNA-Hybridisierung (Southern Blot). Als Sonden wurden das 5'- (*PKS3*) bzw. 3'-Fragment (*PKS1*, *PKS2*, *PME1*, *RxP1*) des entsprechenden Deletionskonstrukts genutzt, um nachzuweisen, dass das Deletionskonstrukt das Wildtypgen ersetzt hat. Die Sonden wurden mittels PCR amplifiziert (Tab. A.1 und A.4) und nach Angaben der Hersteller in die Vektoren pCR2.1 bzw. pJet kloniert. Zur Hybridisierung erfolgte die Restriktion der Sonden-DNA aus den Vektoren und eine anschließende radioaktive Markierung mit α - ^{32}P -dATP. Abbildung 3.7 zeigt schematisch, an welchen Stellen im Genom vom Wildtyp UK7 bzw. der erstellten Deletionsmutanten, die entsprechenden Sonden hybridisieren.

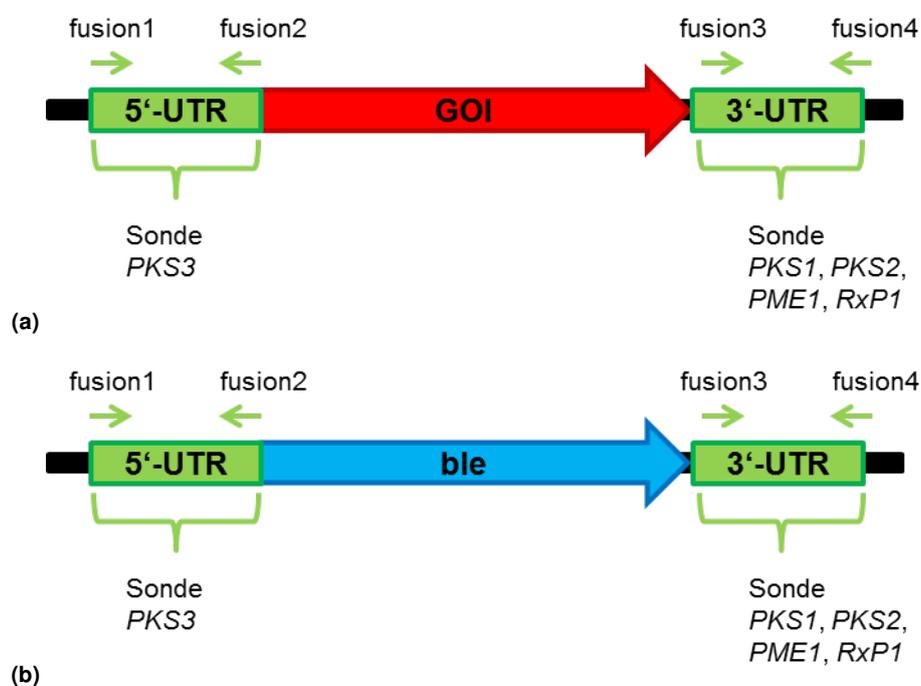


Abbildung 3.7.: Schematische Übersicht zur Sondenhybridisierung im Wildtypgen bzw. im Deletionskonstrukt der erstellten Deletionsmutanten. (a) Sondenhybridisierung im Wildtypgen, (b) Sondenhybridisierung im Deletionskonstrukt der erstellten Mutante, (5'- bzw. 3'-UTR) 5'- bzw. 3'-untranslatierte Region, (ble) Phleomycinkassette, (GOI) Zielgen

Durch *in-silico*-Restriktion der DNA konnte im Vorfeld bestimmt werden, bei welcher Größe ein Signal nach der Hybridisierung erwartet wird. Tabelle 3.3 zeigt eine Übersicht über die genutzten Restriktionsendonukleasen für die Vorbereitung der DNA-Hybridisierung. Außerdem sind die Größen der erwarteten Fragmente in den Deletionsmutanten (KO) bzw. Wildtyp (WT) aufgeführt.

Tabelle 3.3.: Übersicht zur DNA-Hybridisierung der Deletionsmutanten. (PME) Pektinmethylesterase, (RxP) *Rhynchoporum*-RxLR-Protein, (PKS) Polyketidsynthesen

	deletiertes Gen	Restriktionsendonukleasen	Signal [bp] nach Hybridisierung
zellwandabbauendes Enzym			
KO	<i>PME1</i>	XhoI/ EcoRV	3086
WT			981
Gen für putatives Effektorprotein			
KO	<i>RxP1</i>	Scal	2693
WT			2011
Polyketidsynthesen			
KO	<i>PKS1</i>	NcoI	1785
WT			2013
KO	<i>PKS2</i>	NarI/ EcoRV	2901
WT			4096
KO	<i>PKS3</i>	Scal	1590
WT			10000

Die Ergebnisse der DNA-Hybridisierungen (Phosphor-Screens) sind im Anhang abgebildet (Anhang B ab S. 141). Abbildung B.1 im Anhang stellt die Ergebnisse der DNA-Hybridisierung der Deletionsmutanten von *PME1* dar. In allen Deletionsmutanten treten die erwarteten Banden auf (Vgl. Tab. 3.3). Die Deletionsmutanten #431 und #497 zeigen jeweils eine nicht erwartete Bande bei ca. 2800 bp bzw. ca. 4000 bp, die anzeigen, dass das Deletionskonstrukt an einer weiteren Stelle im Genom integriert hat. In Abbildung B.2 ist die DNA-Hybridisierung für die beiden *RxP1*-Deletionsmutanten dargestellt. Für Mutante #2055 ist dabei erkennbar, dass neben der erwarteten Bande bei 2693 bp noch eine weitere Bande bei ca. 3200 bp auftritt, die ein Hinweis auf eine zweite Insertion des Deletionskonstruktes ist. Abbildung B.3 im Anhang zeigt die Ergebnisse der DNA-Hybridisierung der Deletionsmutanten für *PKS1*. Die Hybridisierung mit der Sonde zeigt in allen Deletionsmutanten bzw. dem Wildtyp die erwarteten Banden (Tabelle 3.3). In der Deletionsmutante #180 ist außerdem eine zusätzliche Bande bei etwa 5000 bp zu erkennen, die aufzeigt, dass in dieser Mutante das Deletionskonstrukt ein zweites Mal integriert ist. Für die Deletionsmutanten für *PKS2* sowie *PKS3* ergab die Hybridisierung nur Banden in der erwarteten Größe (Abb. B.4 und B.5, Vgl. mit Tab. 3.3). Für die weitere Charakterisierung der Deletionsmutanten wurden nur solche mit einfacher Integration des Deletionskonstruktes verwendet, da ein Einfluss der zweiten Integration nicht ausgeschlossen werden kann.

3.2. Untersuchungen zum zellwandabbauenden Enzym PME1

Die Überprüfung der Genomannotationen der verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten *R. commune*, *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* ergab, dass neben *PME1* noch vier (*R. secalis* und *R. agropyri*) bzw. drei weitere Pektinmethylesterasen (*R. orthosporum*) existieren. Die PME1-4 bzw. 5 aus den verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten sind homolog zueinander, wobei es vor allem zu den Homologen in *R. orthosporum* größere Unterschiede gibt, die durch eine Phylogenie-Analyse deutlich werden (Abb. 3.8).

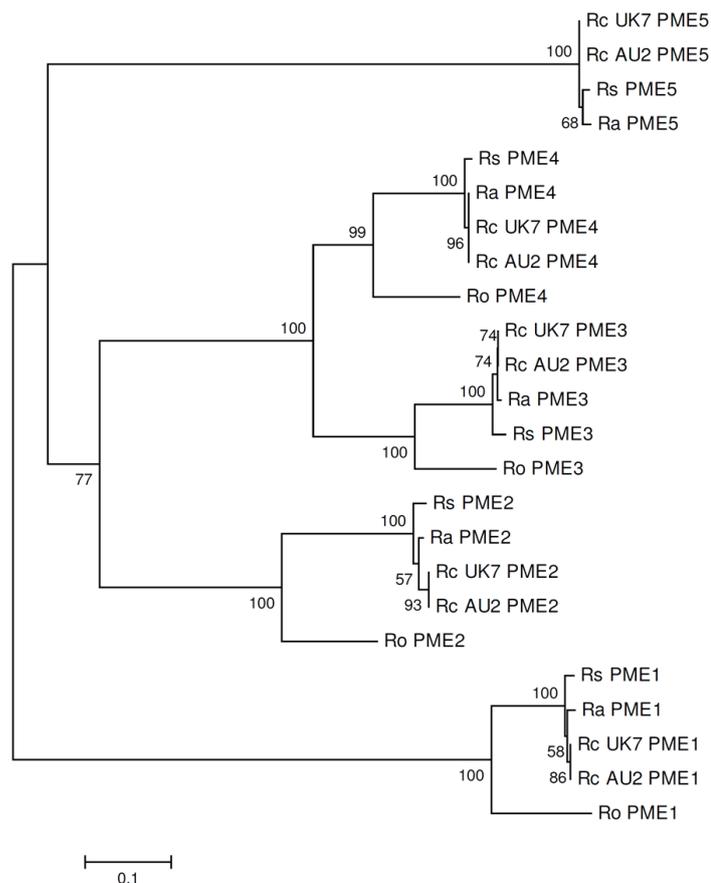


Abbildung 3.8.: Phylogenie sämtlicher PMEs aus den verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten. (Rc) *R. commune* (Isolate UK7 bzw. AU2, Lehnackers und Knogge, 1990), (Rs) *R. secalis* (Isolat RS02CH-6a.1, Zaffarano *et al.*, 2008), (Ra) *R. agropyri* (Isolat RS04CH-RacA.6.1, bereitgestellt durch Prof. B. McDonald, ETH Zürich), (Ro) *R. orthosporum* (Isolat RS04CH-BärA.1.1.3, bereitgestellt durch Prof. B. McDonald, ETH Zürich), Phylogenie erstellt mit MEGA5 (Neighbor-Joining, Bootstrap: 1000; Tamura *et al.*, 2011)

Für nähere Hinweise auf ein mögliches Wirken von PME1-5 während der Pathogenese wurde eine Expressionsanalyse *in planta* durchgeführt. Dafür wurden die hoch susceptible Gerstensorte Ingrid sowie die moderat susceptible Gerstensorte Atlas mit UK7 (Titer: $5 \cdot 10^6$) inokuliert und 0, 1, 3, 6, 10, 14 und 21 dpi jeweils fünf Blätter zur Isolierung von RNA geerntet. Die RNA

wurde in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde zur qRT-PCR eingesetzt, um die Expression von *PME1-5* zu bestimmen. Dabei ist ersichtlich, dass *PME5* in beiden Interaktionen wesentlich schwächer exprimiert wird als die anderen vier *PMEs* (Abb. 3.9). Die Expression von *PME1* findet schon in den Sporen statt und nimmt danach während der Pathogenese ab. Auch die *PME4*-Expression hat ihr erstes Maximum in den Sporen, das zweite Maximum der *PME4*-Expression wird 3 dpi erreicht. Die Expression von *PME2* ist 3 dpi am höchsten (Interaktion Ingrid + UK7, Abbildung 3.9a). In der Interaktion Atlas + UK7 scheint sich dieses Maximum ein wenig zum Zeitpunkt 6 dpi zu verschieben (Abbildung 3.9c). Weiterhin zeigen *PME1-5* in der UK7-Interaktion mit der Sorte Ingrid ab 10 dpi im Vergleich zu den frühen Zeitpunkten der Probenahme keine nennenswerte Expression. Dieser Effekt erscheint bei der Interaktion von Atlas + UK7 weniger dramatisch (Abb. 3.9).

Zur Untersuchung, ob die Deletion von *PME1* einen Einfluss auf das Pilzwachstum hat, wurde die pilzliche Biomasse *in planta* quantifiziert. *UK7ΔPME1* produziert in beiden Interaktionen (hoch bzw. moderat suszeptibel) eine größere Pilzbiomasse *in planta* im Vergleich zum Wildtyp UK7 (Abb. 3.10, Wang, 2013). Dieser Unterschied ist ab 7 (hoch suszeptible Gerstensorte) bzw. 14 dpi (moderat suszeptible Gerstensorte) signifikant (t-Test). Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung der Pilzbiomasse *in planta* wurden die Krankheitssymptome dokumentiert (Abb. 3.10, Wang, 2013). Dabei ist ersichtlich, dass die Deletion von *PME1* im Vergleich zum Wildtyp UK7 auf der hoch suszeptiblen Gerstensorte zu einer schwächeren bzw. langsameren Ausbildung der Symptome führt, was daran erkennbar ist, dass die Blätter 14 dpi nach Inokulation mit *UK7ΔPME1* weniger nekrotisch sind und noch größere Flächen Blattgrün aufweisen (Abb. 3.10a, Wang, 2013). Diese Unterschiede sind auf der moderat suszeptiblen Gerstensorte nicht zu erkennen (Abb. 3.10b, Wang, 2013).

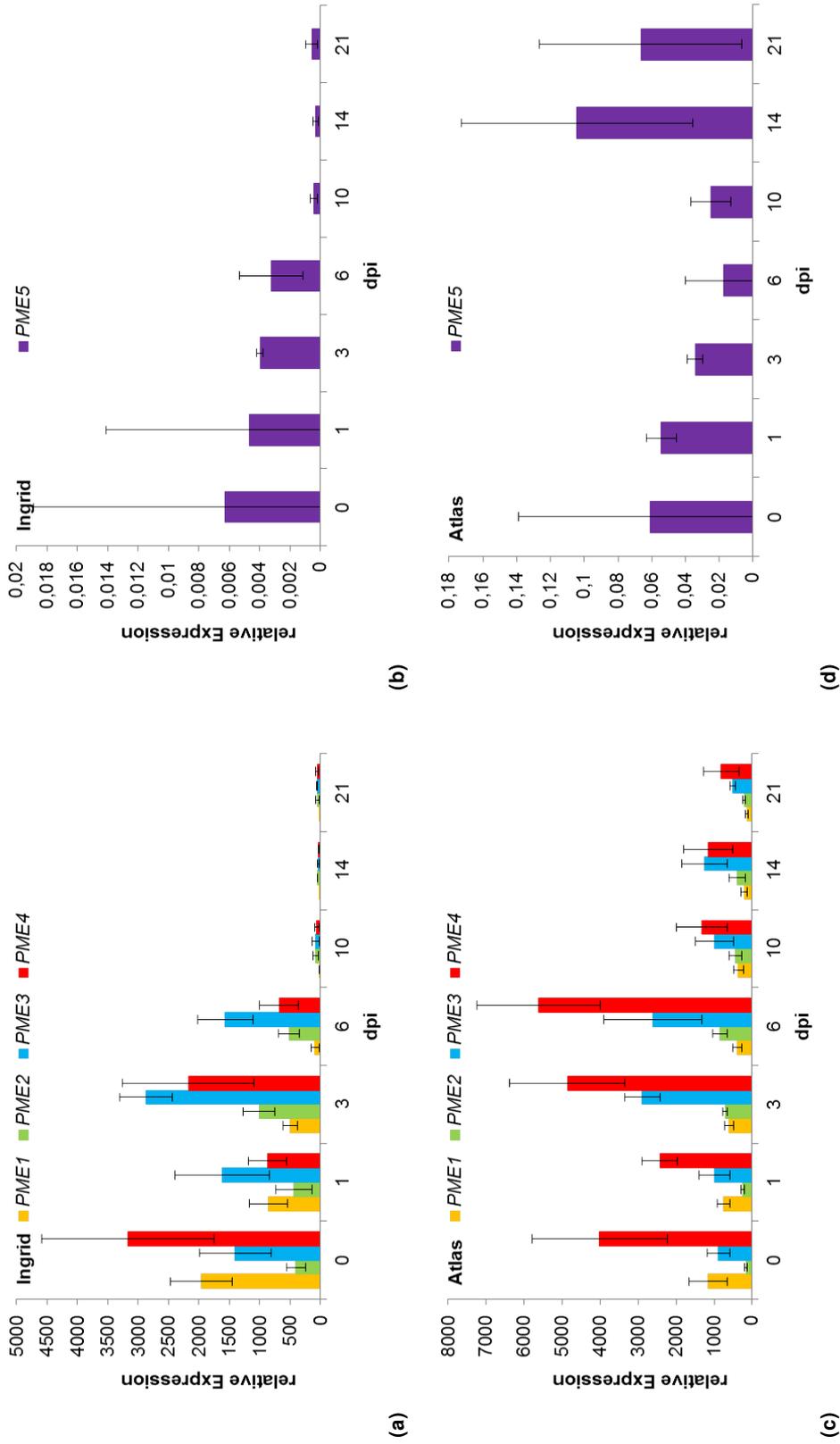


Abbildung 3.9.: Expression von PME1-5 in planta während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Expression PME1-4 während der Interaktion mit Ingrid, (b) Expression PME5 während der Interaktion mit Ingrid, (c) Expression PME1-4 während der Interaktion mit Atlas, (d) Expression PME5 während der Interaktion mit Atlas, n=4

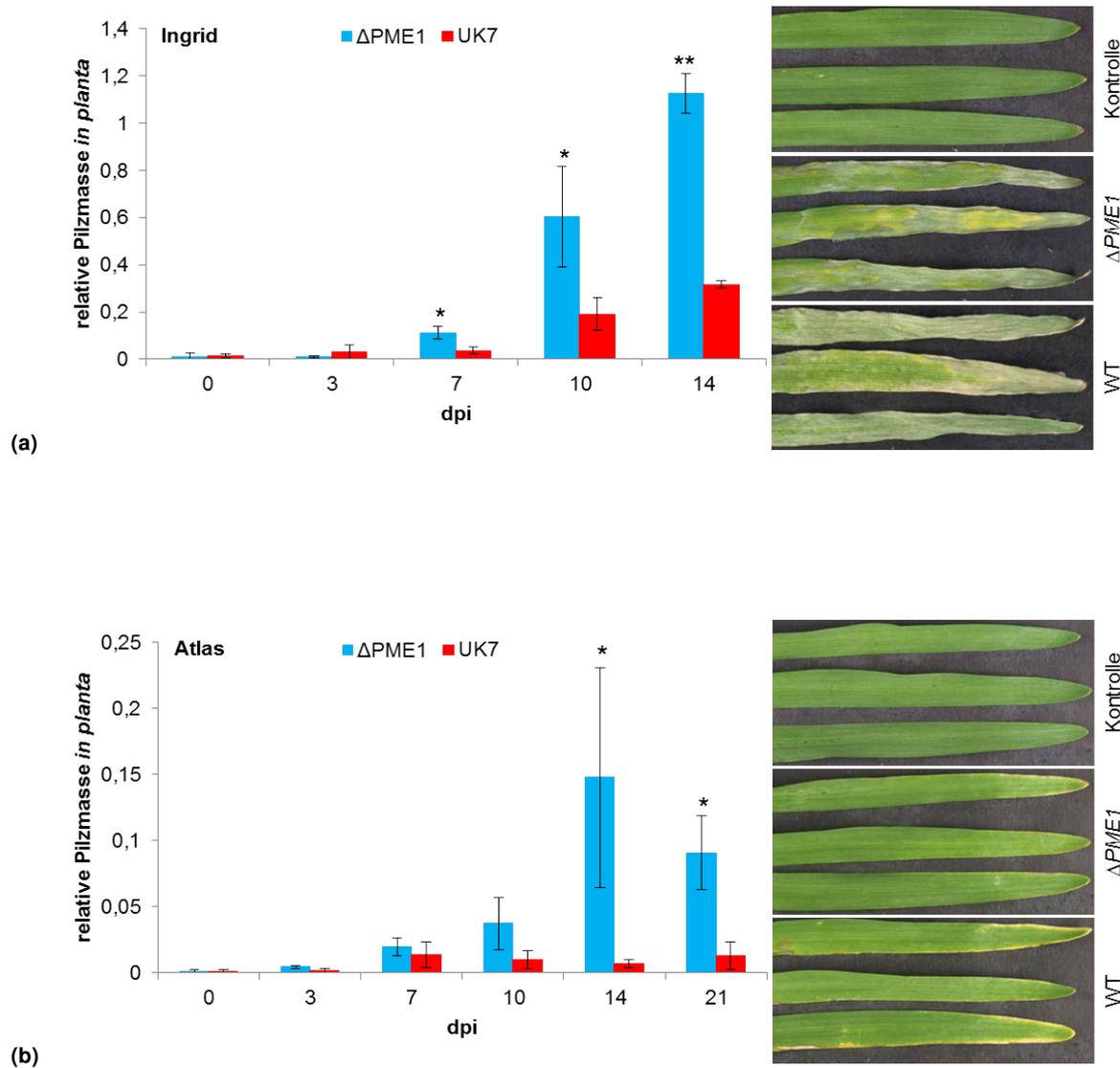


Abbildung 3.10.: Pilzquantifizierung *in planta* und Krankheitssymptome von UK7 Δ PME1 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, () $p < 0,005$, $n = 4$, Dokumentation der Symptome: 14 dpi; Wang (2013)**

3.3. Untersuchungen zum möglichen Effektorprotein RxP1

Auf Grundlage von EST-Sequenzen (A. Navarro-Quezada und W. Knogge, unveröffentlicht) konnten 32 mögliche Proteine mit RxLR-Motiv in *R. commune* abgeleitet werden. Spätere *in-silico*-Analysen dieser 32 Proteine mit Hilfe der Genomsequenz von *R. commune* konnten 23 Proteine bestätigen. In fünf dieser 23 Proteine liegt das RxLR-Motiv N-terminal (innerhalb der ersten 100 Aminosäuren). *Phytophthora*-Effektoren besitzen nicht nur ein RxLR-Motiv, sondern ein RxLR-dEER-Doppelmotiv, dass für die Translokation des Proteins in die Pflanzenzelle zuständig ist (Whisson *et al.*, 2007). Ein solches RxLR-dEER-Doppelmotiv konnte nur in einem der fünf Proteine mit N-terminalem RxLR-Motiv identifiziert werden (RxP1). Im Rahmen dieser Arbeit wurde beabsichtigt zwei der möglichen Effektoren mit RxLR-Motiv zu deletieren. Dabei handelt es sich zum einen um das Protein mit dem RxLR-dEER-Doppelmotiv (RxP1, Gen-ID 01266) und zum anderen um ein Genprodukt (Gen-ID 19382), dessen RxLR-Motiv sich N-terminal (Aminosäure 8 bis 11) befindet. Erfolgreich war die Deletion für *RxP1*.

Zur Untersuchung des Einflusses der Deletion von *RxP1* wurde das Pilzwachstum *in planta* quantifiziert und die entstehenden Krankheitssymptome dokumentiert. *UK7ΔRxP1* produziert *in planta* eine signifikant höhere Pilzbiomasse im Vergleich zum Wildtyp UK7 (Interaktion mit hoch und moderat suszeptibler Gerstensorte, Abb. 3.11, Matern, 2011). Dieses verstärkte Pilzwachstum *in planta* geht einher mit einer schnelleren Ausbildung der Krankheitssymptome (Abb. 3.11, Matern, 2011). Blätter der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid sind nach Inokulation mit dem Wildtyp UK7 14 dpi zwar schon ausgetrocknet, aber noch grün. Im Gegensatz dazu zeigen Blätter der Sorte Ingrid inokuliert mit der Mutante starke Symptome, die sich als extrem trockenes und braunes Blatt zeigen. Diese schnellere Symptombildung zeigt sich auch auf der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas (14 dpi, Abb. 3.11, Matern, 2011).

RxP1 besitzt kein typisches Signalpeptid und wird durch den Algorithmus SignalP (Petersen *et al.*, 2011) als nicht sezerniert klassifiziert, allerdings wird durch den Algorithmus SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2004) eine mögliche unkonventionelle Sekretion vorher gesagt (Matern, 2011). Zur Untersuchung einer möglichen Sekretion von RxP1 sollten Lokalisationsstudien *in planta* durchgeführt werden. Dafür wurde cDNA von *RxP1* mit der kodierenden Sequenz für das rot fluoreszierende Protein mCherry fusioniert. Das Konstrukt steht unter der Kontrolle des ToxA-Promotors aus *Pyrenophora tritici-repentis* (Andrie *et al.*, 2005) für eine konstitutive und starke Expression von *RxP1-mCherry*. Das Fusionskonstrukt wurde in den Vektor pFBT008 kloniert, der den ToxA-Promotor sowie eine Kanamycinresistenz, zur Selektion in *E. coli* während der Klonierungsarbeiten, beinhaltet. Als weiterer Selektionsmarker befindet sich das Hygromycinresistenzgen *hph* auf dem Plasmid, das die Selektion positiv transformierter *R.-commune*-Transformanten ermöglicht. Abbildung 3.12 zeigt schematisch das Fusionskonstrukt aus *RxP1* und *mCherry* unter Kontrolle des ToxA-Promotors.

Zur Erstellung des Kontrukts wurde zunächst mit den Oligonukleotiden mCherry_NotI_s und

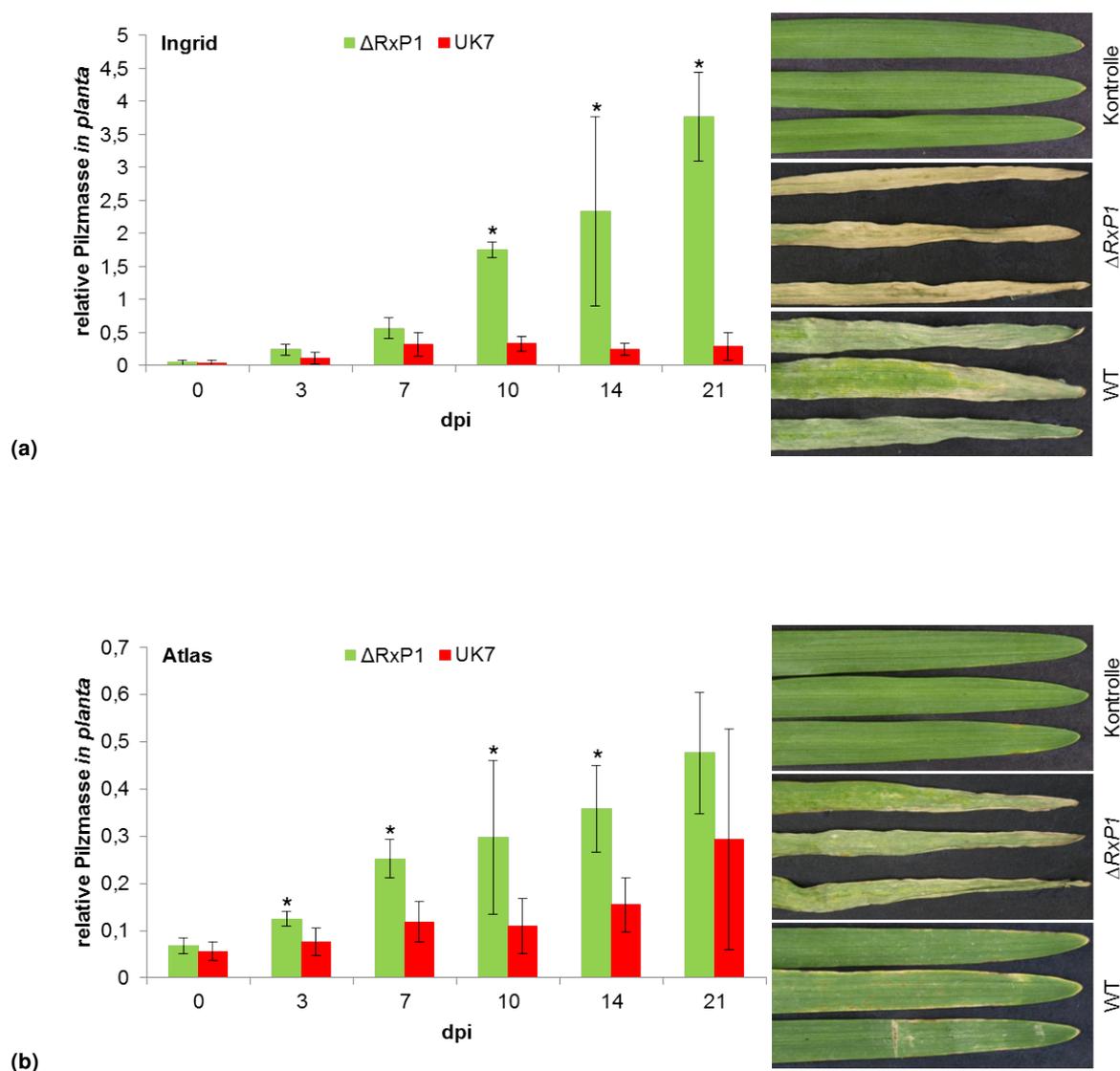


Abbildung 3.11.: Pilzquantifizierung *in planta* und Krankheitssymptome von UK7 Δ RxP1 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, $n = 4$, Dokumentation der Symptome: 14 dpi; Matern (2011)

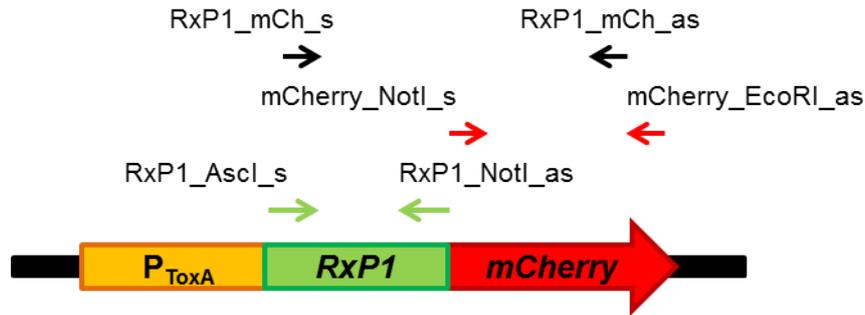


Abbildung 3.12.: Schematische Darstellung des RxP1-mCherry-Fusionskonstrukts. (P_{ToxA}) ToxA-Promotor aus *P. tritici-repentis*, (RxP1) *Rhynchosporium*-RxLR-Protein 1

mCherry_EcoRI_as die kodierende Sequenz des *mCherry* aus dem Vektor px-rk (Prof. Dr. B. Hause, IPB Halle) amplifiziert. Die Amplifikation der kodierenden Sequenz von *RxP1* erfolgte mit den Oligonukleotiden RxP1_AscI_s und RxP1_NotI_as (Abb. 3.12, Tabellen A.1 und A.4). Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel eluiert und in den Vektor pJet zwischenkloniert. Die erhaltenen Vektoren wurden zur Überprüfung der amplifizierten Sequenzen sequenziert (pJet1.2_forward und -reverse). Es folgte eine Reinigung der Plasmide mittels „QIAfilter Plasmid Midi Kit“ und das Ausschneiden des mCherry-Fragments mit NotI und EcoRI und des RxP1-Fragments mit AscI und NotI. Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Fragmente aus dem Agarosegel eluiert. Beide Fragmente wurden nun nacheinander in den pFBT008-Vektor hinter den ToxA-Promotor ligiert. Zur Überprüfung des fertig gestellten Vektors erfolgte die Sequenzierung mit den Oligonukleotiden ToxA2s_sequ und TrpC2as_sequ (Tab. A.1). Nach erfolgreicher Fertigstellung wurde der Vektor in eine *GFP*-exprimierende Mutante von *R. commune* (grün fluoreszierendes Protein, Kirsten *et al.*, 2011) transformiert. Die Selektion erfolgte mit Hygromycin. Die DNA der Transformanten wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden RxP1_mCh_s und RxP1_mCh_as überprüft (Abb. 3.12, Tab. A.1 und A.4). Bei dieser PCR ergibt sich nur ein Produkt, wenn das gesamte Fusionskonstrukt RxP1-mCherry integriert ist. Durch mikroskopische Analysen des Myzels (Mikroskop: Nikon AZ100, TxRed-Filter) wurde zudem gezeigt, dass das mCherry funktionsfähig ist. Positive Transformanten wurden zunächst auf LIMBO-Agar angezogen. Es folgte eine Passage über eine susceptible Gerstensorte zur Reisolierung von Sporen, die für nachfolgende Experimente benötigt wurden.

Für die Untersuchung der Lokalisation von RxP1-mCherry wurden Pflanzen der hoch susceptible Gerstensorte Ingrid mit $5 \cdot 10^6$ Sporen infiziert. Für die Mikroskopie wurden 3 dpi die Epidermen vom Rest des Blattes getrennt. Die Epidermen wurden unter Verwendung von GFP- bzw. TxRed-Filter am „Laser Scanning Microscope“ (LSM 710, Zeiss) mikroskopiert. Da ein GFP-exprimierendes Isolat gewählt wurde, konnte mit Hilfe des GFP-Filters der Pilz *in planta* identifiziert werden. Mit Hilfe des TxRed-Filter kann das mCherry lokalisiert werden. Zur Kontrolle wurde Wildtyp UK7 genutzt, der weder GFP noch mCherry enthält und somit mit GFP- bzw. TxRed-Filter keine grüne bzw. rote Fluoreszenz erkennen lässt (Abb. 3.13). Als Po-

sitivkontrolle wurde ein sezerniertes Effektorprotein aus *R. commune* (NIP2, Wevelsiep *et al.*, 1991; Kirsten *et al.*, 2012) mit mCherry fusioniert. Als Negativkontrolle diente auch NIP2, allerdings enthält das Fusionskonstrukt nicht die Sequenz, die für das NIP2-Signalpeptid (SP) kodiert. Die Mikroskopieergebnisse zeigen, dass NIP2-mCherry (ohne SP) innerhalb der Pilzhyphe lokalisiert ist, während NIP2-mCherry (mit SP) am Rand der Pilzhyphe lokalisiert ist. RxP1-mCherry ist wie NIP2-mCherry (mit SP) am Rand der Hyphen lokalisiert. Da für NIP2 die Sekretion gezeigt werden konnte (Wevelsiep *et al.*, 1991) könnten die Mikroskopieergebnisse von RxP1-mCherry darauf hinweisen, dass es sich bei RxP1 möglicherweise um ein sezerniertes Effektorprotein handelt. Weiterführende Experimente *in vitro* sollen Aufschluss darüber geben, ob RxP1-mCherry tatsächlich in die Umgebung abgegeben wird oder ob RxP1 an der Peripherie innerhalb der Hyphe lokalisiert ist.

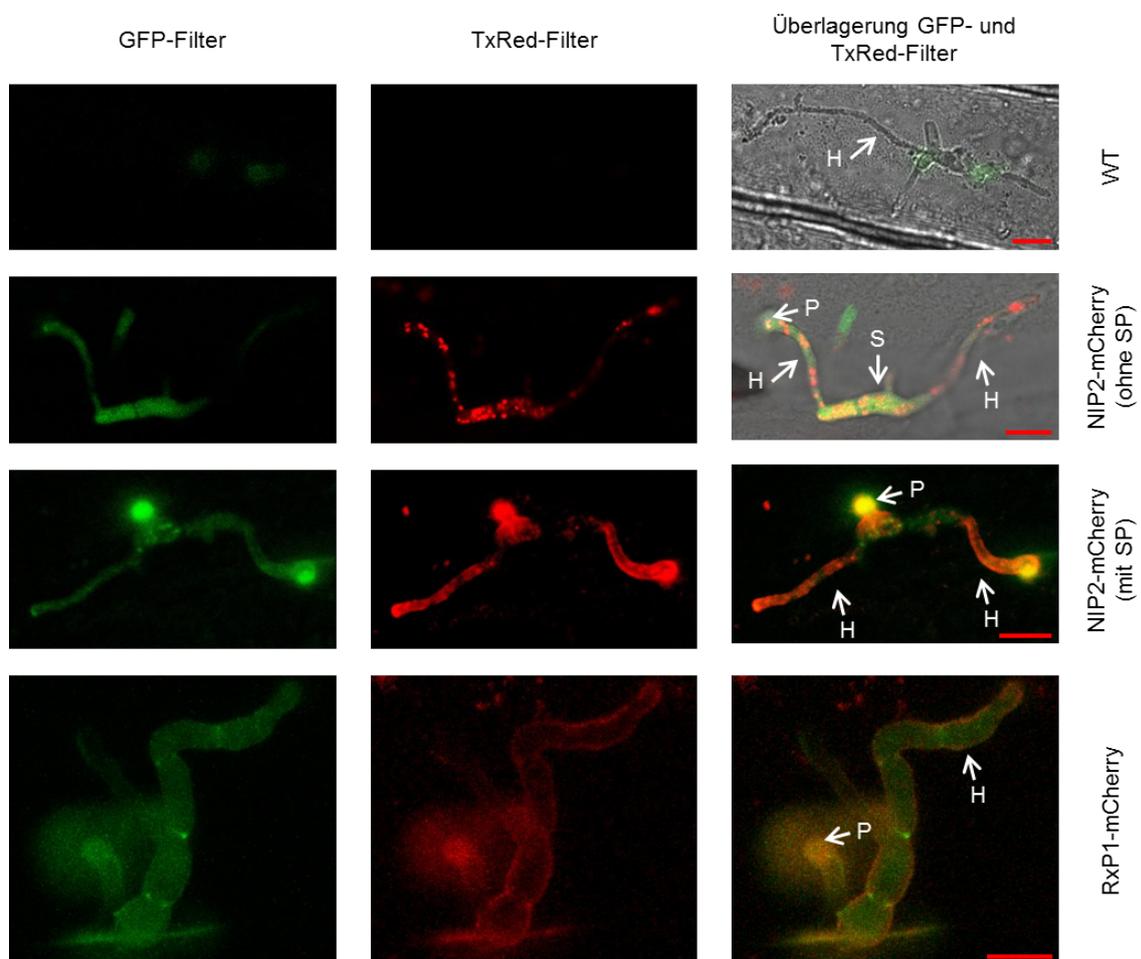


Abbildung 3.13.: RxP1-Lokalisation *in planta*. (WT) Wildtyp UK7 ohne GFP und mCherry, (SP) Signalpeptid, (H) Pilzhyphe, (P) Penetrationsstelle, (S) Spore; Maßstabsbalken = 10 μm

3.4. Untersuchungen zu Signalsequenzen (Signal Sequence Trap - SST)

Das in dieser Arbeit verwendete „signal sequence trap“ (SST) System ist ein prokaryotisches System zum Auffinden bzw. zur experimentellen Überprüfung von Signalpeptiden. Ursprünglich wurde es etabliert, um aus cDNA-Banken Gene herauszufiltern, die sezernierte und damit potentielle Effektorproteine kodieren. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das SST genutzt, um die *in silico* bestimmten Signalpeptide der putativen Effektoren PME1-5 (Kapitel 3.2) bzw. RxP1 (Kapitel 3.3) im biologischen System zu überprüfen. Für das verwendete SST-System wurde die β -Lactamase als Reporter gen genutzt (Tan *et al.*, 2003). Durch Klonierung wurde der Vektor pBK-CMV-fusion erzeugt, in dem die β -Lactamase ohne die für das Signalpeptid kodierende Sequenz vorliegt und somit nicht in das Periplasma sezerniert werden kann (Klonierung erfolgte wie in Tan *et al.* (2003) angegeben). *E. coli*-Zellen mit dieser „leaderless“ β -Lactamase waren nicht in der Lage, die Behandlung mit Carbenicillin zu überleben. Wird nun eine Sequenz, die für ein Signalpeptid kodiert, vor die „leaderless“ β -Lactamase kloniert, kommt es zur Sekretion und somit zum Wachstum der Zellen auf Carbenicillin. Abbildung 3.14 zeigt schematisch das Reporter gen β -Lactamase aus dem Vektor pBK-CMV-fusion. Zusätzlich befindet sich auf dem Vektor eine Kanamycin-Resistenz, die als Transformationskontrolle dient. In Tan *et al.* (2003) wurde das beschriebene (prokaryotische) SST-System für Signalpeptide aus Eukaryoten verwendet, so dass es in der vorliegenden Dissertation für putative Effektoren aus *R. commune* genutzt wurde. Dafür wurden die entsprechenden Vektoren ausgehend vom Vektor pBK-CMV (Stratagene) wie in Tan *et al.* (2003) erstellt. Der pBK-CMV- β -lac enthält die kodierende Sequenz der β -Lactamase, in pBK-CMV-leaderless- β -lac ist die kodierende Sequenz um die Sequenz für das Signalpeptid verkürzt. Außerdem wurde der Vektor pBK-CMV-fusion erstellt, der den Klonierungsvektor (über NotI und EcoRI, Abb. 3.14) für das gesamte SST-System darstellt. Zur internen Kontrolle des Systems wurde die Sequenz, die das Originalsignalpeptid der β -Lactamase kodiert, in den Vektor pBK-CMV-fusion ligiert.



Abbildung 3.14.: Schematische Abbildung des Reporter gens β -Lactamase im Vektor pBK-CMV-fusion.
(P_{lac}) Promotor der β -Lactamase, (NotI/ EcoRI) Restriktionsschnittstellen zur Ligation der Signalsequenzen

Zur Überprüfung des Systems für *R. commune* wurden zunächst Kontrollen erstellt. Zum einen wurden die Nukleotidsequenzen der bekannten Signalpeptide von NIP1, NIP2 und NIP3 verwendet (Kirsten *et al.*, 2012). Zusätzlich erfolgte die Klonierung der Nukleotidsequenz des Signalpeptids von NIP2 verlängert um 48 Nukleotide, die nicht mehr zum Signalpeptid gehören (SPaa NIP2), um zu überprüfen, ob diese Sequenz möglicherweise auch als kodierende

Sequenz für ein Signalpeptid fungieren kann. Als Negativkontrolle dienten die ersten 60 Nucleotide des GPD-Gens. Die Nucleotidsequenzen der Signalpeptide von NIP2, SPaa NIP2, sowie GPD wurden mittels PCR amplifiziert (Tab. A.1 und A.4 im Anhang). Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel gereinigt, mit den Enzymen NotI und EcoRI geschnitten und in den zuvor mit NotI und EcoRI behandelten Vektor pBK-CMV-fusion ligiert. Für die Nucleotidsequenzen der Signalpeptide von NIP1 und NIP3, sowie der internen Kontrolle mit dem Signalpeptid (SP) der β -Lactamase erfolgte eine Hybridisierung der in A.1 angegebenen Oligonucleotide durch Erhitzung auf 95°C (10 min) und anschließend langsamen Abkühlen, um eine doppelsträngige Sequenz mit den Restriktionsschnittstellen NotI und EcoRI zu erhalten. Die so erhaltenen doppelsträngigen Sequenzen konnten direkt in den Vektor pBK-CMV-fusion ligiert werden.

Zur experimentellen Überprüfung der *in-silico*-Vorhersagen von PME1-5 wurden die Nucleotidsequenzen der ermittelten Signalpeptide, wie die Nucleotidsequenzen der Signalpeptide für NIP1 und NIP3 kloniert (s. oben).

RxP1 wird vom SignalP-Algorithmus (Petersen *et al.*, 2011) als nicht sezerniert klassifiziert, allerdings erfolgt durch den SecretomeP-Algorithmus (Bendtsen *et al.*, 2004) eine Zuordnung des Proteins als putativ unkonventionell sezerniert (Matern, 2011). Zur Überprüfung, der durch die Algorithmen erhaltenen Ergebnisse, wurden für dieses Protein die Nucleotidsequenzen der ersten 15 bzw. 20 Aminosäuren (Bezeichnung SP15 RxP1 bzw. SP20 RxP1) in den Vektor pBK-CMV-fusion ligiert. Dies erfolgte wie für die Nucleotidsequenzen der Signalpeptide von NIP1 und NIP3 (s. oben). Die Überprüfung sämtlicher klonierter Konstrukte erfolgte mittels Sequenzierung mit den Sequenzieroligonucleotiden SST_seq_s und SST_seq_as (Tab. A.1). Tabelle 3.4 zeigt eine Übersicht über die Proteine, deren N-terminale Nucleotidsequenzen als mögliche Signalpeptide in den Vektor pBK-CMV-fusion ligiert wurden und ihre Vorhersagen mittels der Algorithmen SignalP (Petersen *et al.*, 2011) bzw. SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2004).

Tabelle 3.4.: *In-silico*-Analysen der putativ sezernierten Effektoren mit Hilfe von SignalP (Petersen *et al.*, 2011) bzw. SecretomeP (Bendtsen *et al.*, 2004). (+) sezerniert, (-) nicht sezerniert

Protein	sezerniert
NIP1	+
NIP2	+
NIP3	+
GPD	-
PME1	+
PME2	+
PME3	+
PME4	+
PME5	+
RxP1	- (unkonventionell)

Tabelle 3.5 zeigt eine Übersicht über alle erstellten Konstrukte. Diese wurden in *E. coli* transformiert. Anschließend erfolgte eine Überprüfung, ob die mit den SST-Vektoren transformierten *E.-coli*-Zellen in Gegenwart von Kanamycin und Carbenicillin wachsen. Das erwartete Wachstum der *E.-coli*-Zellen, die die entsprechenden Konstrukte beinhalten ist in Tabelle 3.5 aufgeführt.

Tabelle 3.5.: Übersicht der klonierten SST-Vektoren und das erwartete Wachstum der mit den SST-Vektoren transformierten *E.-coli*-Zellen auf Kanamycin (Kan) und Carbenicillin (Carb). (SP) Signalpeptid, (SP15 bzw. SP20) die ersten 45 bzw. 60 Nukleotide des RXP1

Konstrukt in pBK-CMV-fusion	Wachstum auf	
	Kan	Carb
<i>β-Lactamase</i>	+	+
„leaderless“ <i>β-Lactamase</i>	+	-
SP <i>β-lac</i> + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP NIP1 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP NIP2 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SPaa NIP2 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP NIP3 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
5' GPD + <i>β-Lactamase</i>	+	-
SP PME1 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP PME2 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP PME3 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP PME4 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP PME5 + <i>β-Lactamase</i>	+	+
SP15 RXP1 + <i>β-Lactamase</i>	+	?
SP20 RXP1 + <i>β-Lactamase</i>	+	?

In Gegenwart von Kanamycin sollten alle Zellen wachsen, da das zugehörige Resistenzgen auf dem Vektor pBK-CMV-fusion kodiert ist. Die experimentelle Überprüfung zeigt, dass alle *E. coli*-Zellen, die mit den verschiedenen Konstrukten des SST transformiert sind, in der Lage sind, auf LB-Platten mit Kanamycin zu wachsen (Abb. 3.15). In Gegenwart von Carbenicillin sollten sämtliche Zellen wachsen, die einen Vektor mit einem funktionellen Signalpeptid enthalten (Tab. 3.5). Dies betrifft alle, außer die Negativkontrollen „leaderless“ *β-Lactamase* und die *GPD*-Fusion sowie den Ausgangsvektor pBK-CMV-fusion. Bei den Nukleotidsequenzen des RXP1 gab es keine Erwartung, da unbekannt ist, ob eine unkonventionelle Sekretion vorliegt oder ein möglicherweise vorhandenes Signalpeptid vom SignalP-Algorithmus (Petersen *et al.*, 2011) nicht erkannt wird. In Abbildung 3.15b ist das experimentell ermittelte Wachstum auf Carbenicillin dargestellt, welches den Erwartungen entsprach, und zusätzlich zeigt, dass die ersten 45 Nukleotide von *RXP1* ein Signalpeptid im prokaryotischen System kodieren.

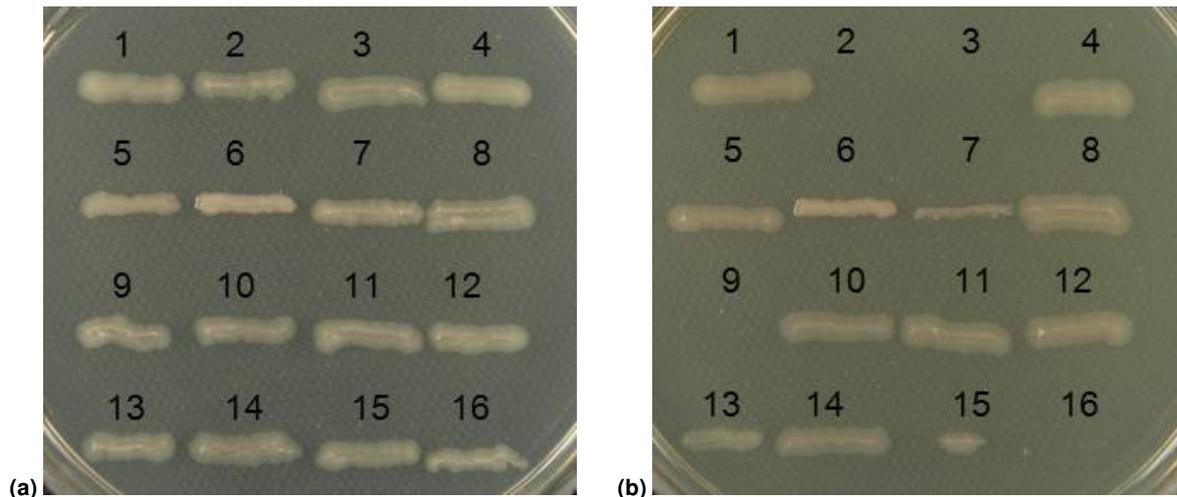


Abbildung 3.15.: Wachstum der mit den SST-Vektoren transformierten *E.-coli*-Zellen auf Kanamycin und Carbenicillin. (a) Wachstum auf LB-Agar + Kanamycin, (b) Wachstum auf LB-Agar + Carbenicillin + IPTG, (1) pBK-CMV + β -Lactamase, (2) pBK-CMV + „leaderless“ β -Lactamase, (3) pBK-CMV-fusion, (4) pBK-CMV-fusion + SP β -Lactamase, (5) pBK-CMV-fusion + SP NIP1, (6) pBK-CMV-fusion + SP NIP2, (7) pBK-CMV-fusion + SPaa NIP2, (8) pBK-CMV-fusion + SP NIP3, (9) pBK-CMV-fusion + 5' GPD, (10) pBK-CMV-fusion + SP PME1, (11) pBK-CMV-fusion + SP PME2, (12) pBK-CMV-fusion + SP PME3, (13) pBK-CMV-fusion + SP PME4, (14) pBK-CMV-fusion + SP PME5, (15) pBK-CMV-fusion + SP15 RxP1, (16) pBK-CMV-fusion + SP20 RxP1

Da die *E. coli*-Zellen mit den Vektoren pBK-CMV-fusion, pBK-CMV-fusion + „leaderless“ β -Lactamase, pBK-CMV-fusion + 5' GPD und pBK-CMV-fusion + SP20 RxP1 nicht auf Carbenicillin wachsen, sollte anhand einer Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden, dass in diesen Zellen dennoch β -Lactamase exprimiert wird. Hierfür wurden von allen *E. coli*-Zellen, die mit den in Tabelle 3.5 aufgeführten Konstrukten transformiert sind, Übernachtkulturen mit IPTG angezogen. Diese wurden zentrifugiert und das Zellsediment in 100 μ L 2x Ladepuffer für Proteine aufgenommen. Es folgte eine SDS-PAGE und ein Western Blot mit einem anti- β -Lactamase-Antikörper. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt und zeigen, dass sämtliche mit den SST-Vektoren transformierten *E.-coli*-Zellen β -Lactamase exprimieren. Das Protein wird allerdings durch die Nukleotidsequenzen, die nicht als Signalpeptid fungieren („leaderless“ β -Lactamase, 5' GPD und SP20 RxP1) nicht ins Periplasma sezerniert. Daraus folgend können diese Zellen nicht auf Carbenicillin wachsen, obwohl β -Lactamase exprimiert wird.

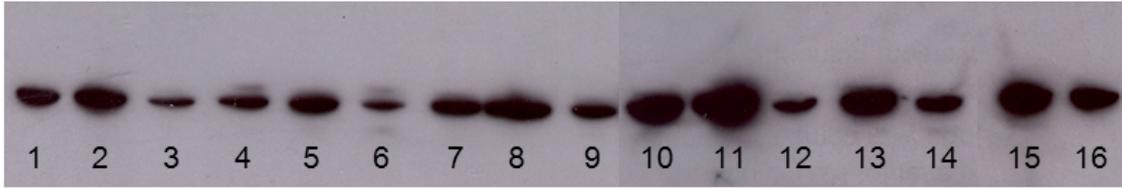


Abbildung 3.16.: Western Blot (anti- β -Lactamase) der mit den SST-Vektoren transformierten *E. coli*-Zellen.
 (1) pBK-CMV + β -Lactamase, (2) pBK-CMV + „leaderless“ β -Lactamase, (3) pBK-CMV-fusion, (4) pBK-CMV-fusion + SP β -Lactamase, (5) pBK-CMV-fusion + SP NIP1, (6) pBK-CMV-fusion + SP NIP2, (7) pBK-CMV-fusion + SPaa NIP2, (8) pBK-CMV-fusion + SP NIP3, (9) pBK-CMV-fusion + 5' GPD, (10) pBK-CMV-fusion + SP PME1, (11) pBK-CMV-fusion + SP PME2, (12) pBK-CMV-fusion + SP PME3, (13) pBK-CMV-fusion + SP PME4, (14) pBK-CMV-fusion + SP PME5, (15) pBK-CMV-fusion + SP15 RxP1, (16) pBK-CMV-fusion + SP20 RxP1

3.5. Untersuchungen zu den Enzymen aus dem Sekundärmetabolismus

3.5.1. *In-silico*-Analysen zu den Enzymen aus dem Sekundärmetabolismus

PKS (Polyketidsynthasen), NRPS (nicht-ribosomale Peptidsynthetasen), deren Hybride (PKS-NRPS) sowie Dimethylallyltryptophansynthasen (DMATS), Sesqui- und Diterpencyclasen (TC) sind Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus (Collemare *et al.*, 2008a). Die Identifizierung der PKS-Gene in den Genomen von *R. commune*, *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* erfolgte zunächst mit Hilfe der Aminosäuresequenz von ACE1 aus *Magnaporthe grisea* (CAG28797.1, Böhnert *et al.*, 2004). Die so identifizierten Sequenzen dienten erneut als Suchgrundlage für weitere mögliche Polyketidsynthasen. Durch zusätzliche Analysen mit Hilfe von NCBI Blast (blastp, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009) und der Pfam-Datenbank (Punta *et al.*, 2011) konnten die Domänen der PKS und PKS-NRPS identifiziert werden. Die Sequenzen der einzelnen Domänen wurden anschließend erneut zu einer weiteren Überprüfung der Genome verwendet. Auf diese Art konnten durch Nutzung der Sequenzen für Kondensations (C-) bzw. Adenylierungsdomänen (A) zusätzlich die NRPS-Gene identifiziert werden. Durch Vergleich der identifizierten PKS-Sequenzen der verschiedenen Genome konnten die Homologen in *R. commune*, *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* identifiziert werden. Weiterhin wurden Sesqui- bzw. Diterpencyclasen sowie DMATS in den Genomen der *Rhynchosporium*-Arten identifiziert. Für die Suche nach Sesquiterpencyclasen wurde die Aminosäuresequenz von *tri5* aus *Gibberella zeae* (XP_383713.1) genutzt, für die Suche nach Diterpencyclasen *cps/ks* aus *Gibberella fujikoro* (Q9UVY5) und als Suchgrundlage für die DMATS diente die Aminosäuresequenz von *dmaW* aus *Claviceps fusiformis* (Q12594; Vgl. Collemare *et al.*, 2008a). Durch diese Sequenzen identifizierte Gene dienten anschließend als erneute Grundlage für weitere Sequenzvergleiche. Dadurch wurden auch für die Sesqui- und Diterpencyclasen und die DMATS die Homologen in den einzelnen Genomen identifiziert.

Die Überprüfung der Genomdatenbanken der verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten *R. com-*

mune, *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* zeigten, dass die unterschiedlichen *Rhynchosporium*-Isolate und -Arten nicht nur die identifizierten *PKS*-Homologen kodieren. In *R. commune* (Isolat UK7) konnten zehn *PKS*- sowie drei *PKS-NRPS*-Gene identifiziert werden (*PKS1-13*). *PKS-NRPS*-Gene sind *PKS1*, *PKS11* und *PKS13*. Das *R. commune*-Isolat AU2 besitzt ein weiteres *PKS*-Gen (*PKS14*). In den *Rhynchosporium*-Arten *R. secalis* und *R. agropyri* wurden nur Homologe zu *PKS1-12* gefunden. Somit haben diese beiden Arten eine *PKS-NRPS* weniger im Genom kodiert (*PKS13*). In *R. orthosporum* ist die Anzahl an *PKS*- und *PKS-NRPS*-Genen (insgesamt neun) niedriger. Hier konnten nur Homologe für *PKS1-3*, *PKS5+6*, *PKS9+10* sowie *PKS12* gefunden werden. Zusätzlich konnte ein weiteres *PKS-NRPS*-Gen identifiziert werden, das in keiner anderen Art auftritt (*PKS15*).

Polyketidsynthasen werden für den Aufbau von Polyketiden benötigt. Polyketide bilden eine strukturell sehr diverse Gruppe an chemischen Substanzen, die durch verschiedene Enzymdomänen verlängert bzw. modifiziert werden. Zum Aufbau des Gerüsts sind dabei die β -Ketoacylsynthase (KS)- und Acyltransferase (AT)-Domäne sowie das Acyl Carrier Protein (ACP) nötig. Zur Einführung von Modifikationen sind folgende Domänen notwendig: Dehydratase (DH), Methyltransferase (MT), Enoylreduktase (ER) und β -Ketoreduktase (KR). *PKS* ohne diese reduzierenden Domänen werden als nicht-reduzierend bezeichnet. In den untersuchten *Rhynchosporium*-Arten ist nur eine der *PKS* nicht-reduzierend (*PKS3*). Zusätzlich wurde festgestellt, dass *PKS12* die einzige *PKS* in den *Rhynchosporium*-Arten ist, die vor der KS-Domäne noch eine Adenylatbildende Domäne (AFD, „Adenylate Forming Domain“) beinhaltet. Abbildung 3.17 zeigt die Phylogenie aller *PKS*, die aus den vier verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten bekannt sind. Zusätzlich sind in Abbildung 3.17 die einzelnen Domänen der *PKS* schematisch dargestellt. Diese wurden mit Hilfe von NCBI Blast (blastp, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009) und der Pfam-Datenbank (Punta *et al.*, 2011) ermittelt.

In *PKS13* (*PKS-NRPS*) fehlt die für diese Enzymklasse bekannte A-Domäne sowie das Peptidyl Carrier Protein (PCP). Zur Überprüfung, ob eventuell das Stoppcodon während der Annotation falsch gesetzt wurde, wurden PCRs mit verschiedenen Oligonukleotiden auf gDNA und cDNA von Wildtyp UK7 durchgeführt (Oligonukleotide: *PKS13_seq1s* mit *PKS13_seq2as* bzw. *PKS13_seq3as* bzw. *PKS13_seq4as*, Tabellen A.1 und A.4). Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel eluiert, in den Vektor pJet kloniert und der Vektor mit den Sequenzieroligonukleotiden pJET1.2_forward und pJET1.2_reverse (Tabelle A.1) sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass die Annotation von *PKS13* richtig ist und die Genomsequenz keine kodierenden Bereiche für die A-Domäne bzw. das PCP enthält (Daten nicht gezeigt).

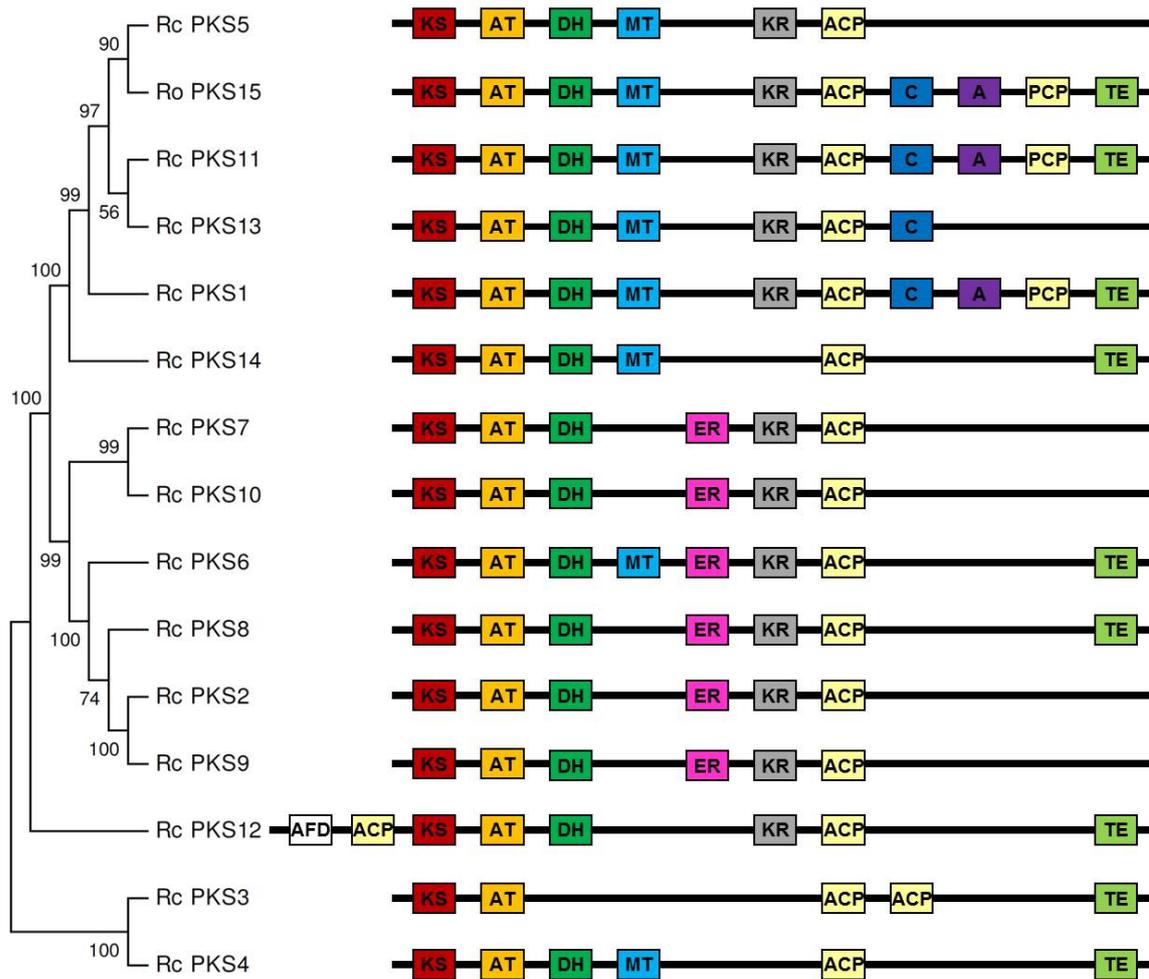


Abbildung 3.17.: Phylogenie und Übersicht Domänenstruktur (schematisch) der PKS und PKS-NRPS aus verschiedenen *Rhynchosporium*-Isolaten und -Arten. (Rc) *R. commune* (Isolate UK7 (PKS1-13) und AU2 (PKS14); Lehnackers und Knogge, 1990), (Ro) *R. orthosporum* (PKS 15; Isolat RS04CH-BärA.1.1.3, bereitgestellt durch Prof. B. McDonald, ETH Zürich), (PKS) Polyketidsynthase, (AFD) Adenylatbildende Domäne, (KS) β -Ketoacylsynthase, (AT) Acyltransferase, (DH) Dehydratase, (MT) Methyltransferase, (ER) Enoylreduktase, (KR) β -Ketoreduktase, (ACP) Acyl Carrier Protein, (C) Kondensation, (A) Adenylierung, (PCP) Peptidyl Carrier Protein, (TE) Termination, TE-Domänen im Einzelnen: PKS1, PKS8, PKS11 und RoPKS15: Oxidoreduktase, PKS3 und PKS12: Thioesterase, PKS4: Esterase, PKS6: O-Acyltransferase; Phylogenie erstellt mit MEGA5 (Neighbor-Joining, Bootstrap: 1000; Tamura *et al.*, 2011)

Neben den *PKS*- und *PKS-NRPS*-Genen wurde in den Genomen der vier *Rhynchosporium*-Arten eine weitere Enzymklasse des Sekundärmetabolismus untersucht. Hierbei handelt es sich um die nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), die aus Aminosäuren Sekundärmetabolite aufbauen können. NRPS bestehen aus C- und A-Domänen sowie dem PCP. Diese Domänen können mehrfach hintereinander auftreten. In *R. commune* (Isolat UK7) konnten vier NRPS-Gene identifiziert werden (*NRPS1-4*). Die Homologen wurden auch in *R. secalis* sowie *R. agropyri* gefunden. Zusätzlich zu *NRPS1-4* konnte für das *R. commune*-Isolat AU2 gezeigt werden, dass sich im Genom ein weiteres NRPS-Gen befindet (*NRPS5*). Das Genom von *R. orthosporum* enthält nur drei der in *R. commune* identifizierten NRPS-Gene (*NRPS2-4*). In Abbildung 3.18 ist die Phylogenie der fünf identifizierten NRPS aus *R. commune* gezeigt.

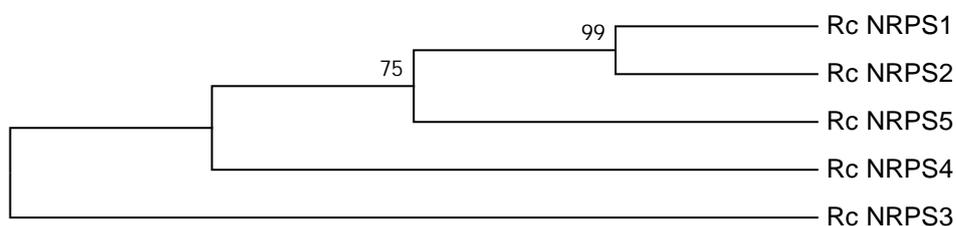


Abbildung 3.18.: Phylogenie der NRPS aus *R. commune*. (Rc) *R. commune* (Isolate UK7 (NRPS1-4) bzw. AU2 (NRPS5), Lehnackers und Knogge, 1990), (NRPS) nicht-ribosomale Peptidsynthetase, Phylogenie erstellt mit MEGA5 (Neighbor-Joining, Bootstrap: 1000; Tamura *et al.*, 2011)

Weitere Enzyme des Sekundärmetabolismus stellen die Sesqui- und Diterpencyclasen sowie die DMATS dar. Auch die Gene, die für diese Enzyme kodieren wurden in den Genomen der *Rhynchosporium*-Arten gesucht. Dabei konnte in allen untersuchten Genomen ein Gen für eine Sesquiterpencyclase gefunden werden. Allerdings befinden sich in den Genomen der verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten keine Gene für Diterpencyclasen. Weiterhin konnten in *R. commune*, *R. secalis* und *R. agropyri* drei Gene gefunden werden, die DMATS kodieren. In *R. orthosporum* sind nur zwei dieser drei DMATS-Gene vorhanden.

Tabelle 3.6 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der untersuchten Gene, die für die Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus in den verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten kodieren (Vgl. Collemare *et al.*, 2008a).

Tabelle 3.6.: Übersicht über die Anzahl an PKS, NRPS, PKS-NRPS, Sesqui- bzw. Diterpencyclasen und DMATS in den verschiedenen *Rhynchosporium*-Arten. (PKS) Polyketidsynthasen, (NRPS) nicht-ribosomale Peptidsynthetasen, (PKS-NRPS) Hybridenzyme aus PKS und NRPS, (DMATS) Dimethylallyltryptophansynthasen; Vgl. Collemare *et al.* (2008a)

<i>Rhynchosporium</i> -Art	PKS	NRPS	PKS-NRPS	Sesqui-/Diterpencyclasen	DMATS
<i>R. commune</i> UK7	10	4	3	1/0	3
<i>R. commune</i> AU2	11	5	3	1/0	3
<i>R. secalis</i>	10	4	2	1/0	3
<i>R. agropyri</i>	10	4	2	1/0	3
<i>R. orthosporum</i>	7	3	2	1/0	2

3.5.2. *In-silico*-Vorhersage von Genclustern des Sekundärmetabolismus im Genom von *R. commune*

Zur Identifizierung möglicher Sekundärstoffwechsel-Gencluster im Genom von *R. commune* wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet. Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Sekundärstoffwechsel-Genclustern bietet SMURF (Secondary Metabolite Unique Regions Finder, Khaldi *et al.*, 2010). Dieses Programm sucht putative Gencluster unabhängig von Sequenzmotiven, sondern anhand der Domänen der annotierten Proteine und ihrer Lage im genomischen Kontext (Khaldi *et al.*, 2010). Der zweite verwendete Algorithmus wurde am Hans-Knöll-Institut in Jena entwickelt (HKI Jena, Wolf *et al.*, 2013, im Folgenden als HKI bezeichnet). Den Clusteranalysen des HKI liegt die Suche nach überrepräsentierten Motiven in den Promotorbereichen im Umkreis der *PKS*-, *PKS-NRPS*- und *NRPS*-Gene zugrunde. Diese überrepräsentierten Motive kommen als mögliche Transkriptionsfaktorbindestellen in Frage. Mit ihrer Hilfe kann eine genomweite Suche und anschließend eine Sekundärstoffwechsel-Genclusteranalyse durchgeführt werden (Wolf *et al.*, 2013). Tabelle 3.7 zeigt eine Übersicht über die mit beiden Methoden identifizierten Gen-Cluster sowie eine Verlässlichkeit der Vorhersage. Nicht vorhandene Sekundärstoffwechsel-Gencluster (Tab. 3.7) bedeuten nicht, dass kein Cluster vorliegt, sondern können auch bedeuten, dass diese mit den verwendeten Algorithmen nicht erkannt werden. Für eine genauere Auswertung wurden folgende Cluster ausgewählt (in Tabelle 3.7 fett gedruckt): *PKS4*, *PKS10*, *PKS13* (*PKS-NRPS*), *PKS6*, *PKS8*, *PKS12*, *PKS9*, *NRPS2*, *PKS3* sowie *PKS2* und *PKS1* (*PKS-NRPS*).

PKS12 und *NRPS2* liegen möglicherweise zusammen in einem Gencluster, das gilt auch für einen Teil der Vorhersagen von *PKS13* (*PKS-NRPS*) und *PKS3*. Weiterhin liegt eine der *in silico* identifizierten DMATS im putativen Sekundärstoffwechsel-Gencluster von *PKS4*.

Die Tabellen C.1 (*PKS4*), C.2 (*PKS10*), C.3 (*PKS3* + *PKS13*), C.4 (*PKS6*), C.5 (*PKS8*), C.6 (*PKS12* + *NRPS2*), C.7 (*PKS9*), C.8 (*PKS2*) und C.9 (*PKS1*) im Anhang C ab S. 145 zeigen eine Übersicht über die in den Genclustern enthaltenen möglichen Gene und ihre putative annotierte Funktion. Weiterhin ist in diesen Tabellen dargestellt, welcher Teil der Cluster vom Algorithmus HKI bzw. SMURF vorhergesagt wurden. Der HKI-Algorithmus hat für einige der

Tabelle 3.7.: Übersicht über mögliche Sekundärstoffwechsel-Gencluster in *R. commune*. Die Verlässlichkeit der Vorhersage nimmt von oben nach unten ab, (PKS) Polyketidsynthase, (NRPS) nicht-ribosomale Peptidsynthetase, (PKS-NRPS) Hybridenzyme, (fett) in dieser Arbeit näher betrachtete Sekundärstoffwechsel-Gencluster (s. Anhang C ab S. 145), (HKI) Algorithmus HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), (SMURF) Algorithmus SMURF (Khaldi *et al.*, 2010), (+) Sekundärstoffwechsel-Gencluster-Vorhersage vorhanden, (-) laut Vorhersage kein Sekundärstoffwechsel-Gencluster

PKS, NRPS bzw. PKS-NRPS	HKI	SMURF
PKS4	+	+
PKS10	+	+
PKS13 (PKS-NRPS)	+	+
PKS6	+	+
PKS8	+	+
PKS12	+	+
PKS9	+	+
PKS11 (PKS-NRPS)	+	+
NRPS2	+	+
NRPS3	+	+
NRPS4	+	+
PKS3	+	-
PKS5	+	+
PKS7	+	+
PKS2	+	-
PKS1 (PKS-NRPS)	+	-
NRPS1	-	+

PKS-, *PKS-NRPS*- und *NRPS*-Gene mehrere Möglichkeiten für ein Sekundärstoffwechsel-Gencluster angegeben. Die Überlappungen sind in den Tabellen schwarz markiert. Gemeinsamkeiten der Vorhersagen durch HKI bzw. SMURF sind besonders bei den als verlässlich eingestufteten Vorhersagen zu den möglichen Clustern von PKS4 und PKS10 (Tab. 3.7, C.1, C.2 und Abb. C.1, C.2) zu erkennen. Insgesamt lässt sich sagen, dass SMURF weniger Gene innerhalb der Cluster vorhersagt als der Algorithmus vom HKI.

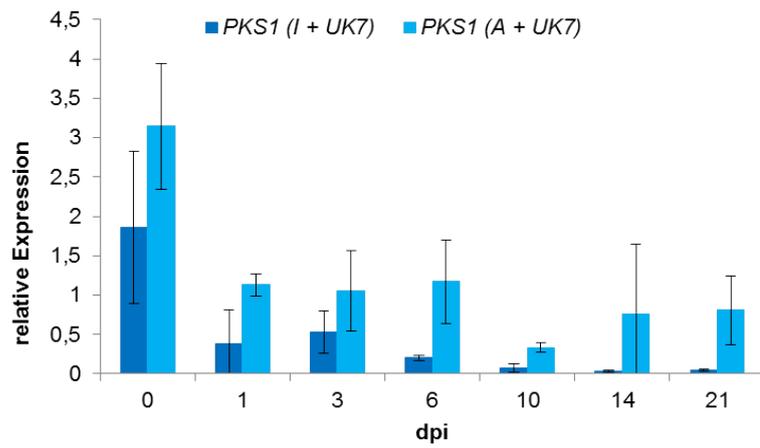
Die vorhergesagten Cluster beinhalten größtenteils Oxidoreduktasen, Transferasen und Lyasen. Zusätzlich sind Transkriptionsfaktoren, Transporter und zum Zellzyklus bzw. zur Replikationsmaschinerie gehörende Gene zu finden. Oxidoreduktasen, Transferasen und Lyasen, die sich im gleichen Cluster befinden, wie die PKS, PKS-NRPS und NRPS sind eventuell für nachfolgende Reaktionen an dem durch die PKS aufgebauten Molekül verantwortlich. Proteine der MFS („major facilitator superfamily“) sind Membrantransporter von Sekundärmetaboliten und innerhalb der vorhergesagten Cluster eventuell dafür verantwortlich, die synthetisierten Sekundärmetabolite zu ihrem Bestimmungsort zu transportieren. Vorhandene Transkriptionsfaktoren sind möglicherweise für die Regulation des gesamten Clusters verantwortlich. Gene, die zum Zellzyklus bzw. zur Replikationsmaschinerie gehören, könnten einen Aufschluss über mögliche Regulationsmechanismen der Cluster geben. Die Abbildungen C.1 (PKS4), C.2

(PKS10), C.3 (PKS3 + PKS13), C.4 (PKS6), C.5 (PKS8), C.6 (PKS12 + NRPS2), C.7 (PKS9), C.8 (PKS2) und C.9 (PKS1) im Anhang zeigen schematisch eine Übersicht über die Gene, ihre Orientierung sowie ihre Größe in den vorhergesagten Clustern. Die Einfärbung der Gene erfolgte hinsichtlich ihrer putativen Funktion. Mit Hilfe von Klammern und der Zahlen 1, 1*, 2 und 3 ist in den Abbildungen C.1 (PKS4), C.2 (PKS10), C.3 (PKS3 + PKS13), C.4 (PKS6), C.5 (PKS8), C.6 (PKS12 + NRPS2), C.7 (PKS9), C.8 (PKS2) und C.9 (PKS1) angegeben, welcher Teil der Sekundärstoffwechsel-Gencluster mit dem Algorithmus vom HKI bzw. SMURF vorhergesagt wurde (graue und schwarze Einfärbung in den Tabellen C.1 (PKS4), C.2 (PKS10), C.3 (PKS3 + PKS13), C.4 (PKS6), C.5 (PKS8), C.6 (PKS12 + NRPS2), C.7 (PKS9), C.8 (PKS2) und C.9 (PKS1)).

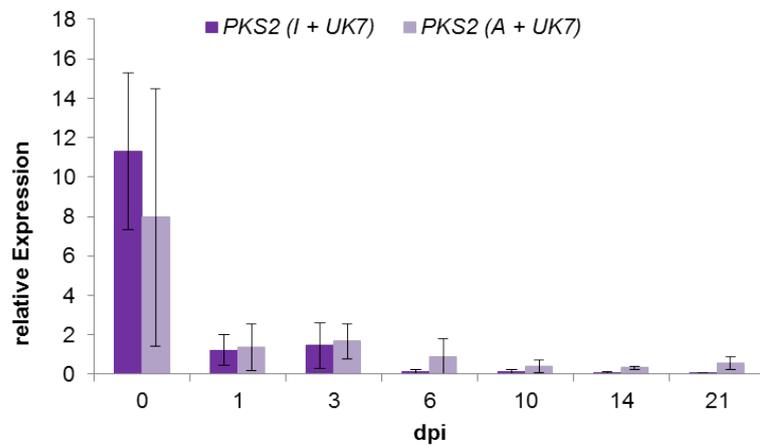
3.5.3. Expressionsanalyse der *PKS*, *PKS-NRPS* und *NRPS in planta*

Zur Überprüfung der Expression der *PKS* und *PKS-NRPS* sowie der *NRPS* während der Pilzinfektion im Gerstenblatt wurde eine Expressionsanalyse *in planta* durchgeführt. Dafür wurden die hoch susceptible Gerstensorte Ingrid sowie die moderat susceptible Gerstensorte Atlas mit dem Wildtyp UK7 inokuliert (Titer: $5 \cdot 10^6$). 0, 1, 3, 6, 10, 14 und 21 Tage nach Inokulation wurden jeweils fünf Blätter zur Isolierung von RNA gesammelt. Die isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die cDNA zur qRT-PCR eingesetzt. Für dieses Experiment wurden 4 biologische Replikate pro Interaktion angezogen ($n=4$). Die Ergebnisse der Expressionsanalyse bezüglich *PKS1*, *PKS2* und *PKS3* sind den Abbildungen 3.19a bis c zu entnehmen. Dabei ist zu sehen, dass das Expressionsprofil von *PKS1-3* in Ingrid bzw. Atlas ähnlich verläuft. Des Weiteren ist erkennbar, dass *PKS3* um ein etwa 1000-faches schwächer als *PKS1+2* exprimiert ist. Für *PKS1-3* lässt sich in den Abbildungen 3.19a bis c ablesen, dass sie zu frühen Zeitpunkten nach Inokulation am höchsten exprimiert sind und die Genexpression zu späteren Zeitpunkten schwächer wird.

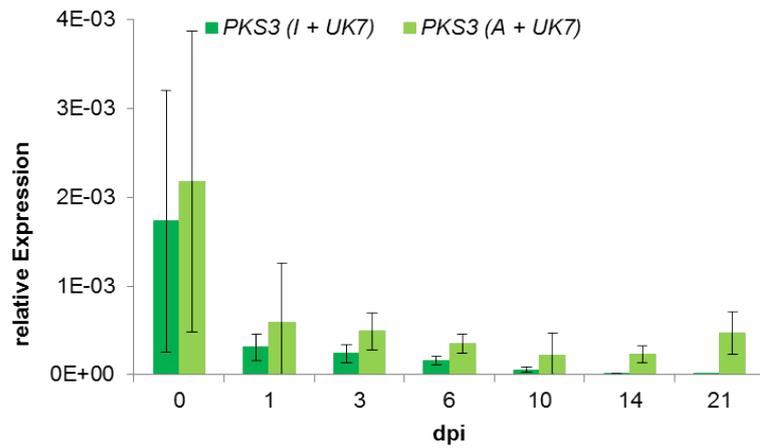
Die graphische Darstellung der Expression *in planta* von *PKS4-13* und *NRPS1-4* beider Interaktionen (Ingrid bzw. Atlas) sind in den Abbildungen D.1a bis f (*PKS4-9*), D.2a bis d (*PKS10-13*) und D.3a bis d (*NRPS1-4*) im Anhang D ab S. 157 aufgeführt. Dabei ist zu sehen, dass *PKS*, *PKS-NRPS* und *NRPS* unterschiedlich exprimiert werden und verschiedene Maxima zu verschiedenen Zeitpunkten aufweisen. Beispielsweise zeigen *PKS4* und *PKS10* ihr Expressionsmaximum 10 dpi, während *PKS6-9* und *PKS11+12* eher zu Beginn der Infektion exprimiert werden (Abbildungen D.1 und D.2 im Anhang). Auffällig ist, dass alle *PKS* mit Ausnahme von *PKS13* in den beiden Interaktionen ein ähnliches Expressionsprofil zeigen. Währenddessen zeigt die *PKS13*-Expression in der Interaktion Atlas + UK7 eine wesentlich höhere relative Expression im Vergleich zur Interaktion Ingrid + UK7. Auch in den Expressionsprofilen der *NRPS* ist abzulesen, dass in der Interaktion von Atlas mit UK7 alle vier *NRPS* eine wesentlich höhere Expression als in der Interaktion Ingrid mit UK7 zeigen (Abb. D.3).



(a)



(b)



(c)

Abbildung 3.19.: Expression von *PKS1-3* in planta während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) *PKS1*-Expression, (b) *PKS2*-Expression, (c) *PKS3*-Expression, (I) Ingrid: hoch susceptible Gerstensorte, (A) Atlas: moderat susceptible Gerstensorte, (dpi) Tage nach Inokulation, n=4

3.5.4. Charakterisierung der *PKS*-Deletionsmutanten

3.5.4.1. Wachstumsanalyse von *UK7ΔPKS1*, *UK7ΔPKS2* und *UK7ΔPKS3 in planta*

Zur näheren Charakterisierung von *UK7ΔPKS1*, *UK7ΔPKS2* und *UK7ΔPKS3* wurden die Gerstensorten Ingrid (hoch suszeptibel) und Atlas (moderat suszeptibel) mit den jeweiligen Isolaten infiziert und das Pilzwachstum *in planta* 0 bis 21 dpi sowie die Symptomausbildung dokumentiert. Dafür wurden die Gerstenpflanzen mit Sporen der Mutanten bzw. des Wildtyps inokuliert (Titer: $5 \cdot 10^6$) und zu den Zeitpunkten 0, 3, 7, 10, 14 und 21 dpi jeweils fünf Gerstenblätter für die Isolierung von DNA geerntet. Nach erfolgter DNA-Isolierung wurde die relative Pilzmasse *in planta* (qPCR) bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass besonders *UK7ΔPKS1* und *UK7ΔPKS3* auf Ingrid ein signifikant höheres Wachstum als der Wildtyp aufweisen (Abb. 3.20a und 3.21a). Dieser Unterschied ist bei *UK7ΔPKS2* nicht zu sehen (Abb. 3.22a). Auf der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas ist kein signifikanter Unterschied der relativen Pilzbiomasse *in planta* zwischen Deletionsmutanten und Wildtyp ersichtlich (Abb. 3.20b, 3.21b und 3.22b).

Zur Dokumentation der Symptome wurde Aufnahmen 14 dpi gemacht. Die Symptombilder zeigen, dass in der Interaktion Ingrid + *UK7ΔPKS1* bzw. *UK7ΔPKS3* die Symptome stärker auftreten bzw. eine größere Blattfläche nekrotisch ist (Abb. 3.20a und 3.21a). Für *UK7ΔPKS2* in der Interaktion mit Ingrid ist zu sehen, dass die Mutante sich anscheinend langsamer in Richtung Blattgrund ausweitet und tendenziell langsamer Symptome gebildet werden. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Symptome von Ingrid + *UK7ΔPKS2* eher chlorotisch (gelblich-grünlich) aussehen, während die Symptome von Ingrid + UK7 zu diesem Zeitpunkt stärker nekrotisch (bräunlich) sind (Abb. 3.22a). Aus diesem Grund wurde eine Quantifizierung des Pilzmyzels in einzelnen Blattsegmenten vorgenommen. Dafür wurden Gerstenpflanzen der hoch suszeptiblen Sorte Ingrid mit Sporen (Titer: $5 \cdot 10^6$) inokuliert und 14 dpi 20 Primärblätter geerntet. Die Blätter wurden in 3 cm lange Stücke (3 x 3 cm + Rest) unterteilt. Anschließend wurde DNA isoliert. Die Bestimmung der Pilzbiomasse *in planta* erfolgte mittels qPCR. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung 3.23 gezeigt. Dabei ist ersichtlich, dass in den vorderen Blattbereichen (A und B) signifikant mehr Biomasse von *UK7ΔPKS2* im Vergleich zum Wildtyp UK7 vorhanden ist. Zusätzlich ist zu sehen, dass die Biomasse von *UK7ΔPKS2* über das gesamte Blatt verteilt ist. Anscheinend wächst die Mutante nicht langsamer in Richtung Blattgrund, sondern bildet langsamer als der Wildtyp Symptome aus.

Beim Vergleich der Symptombilder der Interaktionen mit Atlas ist kein Unterschied zwischen den *PKS*-Deletionsmutanten zum Wildtyp UK7 erkennbar (Abb. 3.20b, 3.21b und 3.22b).

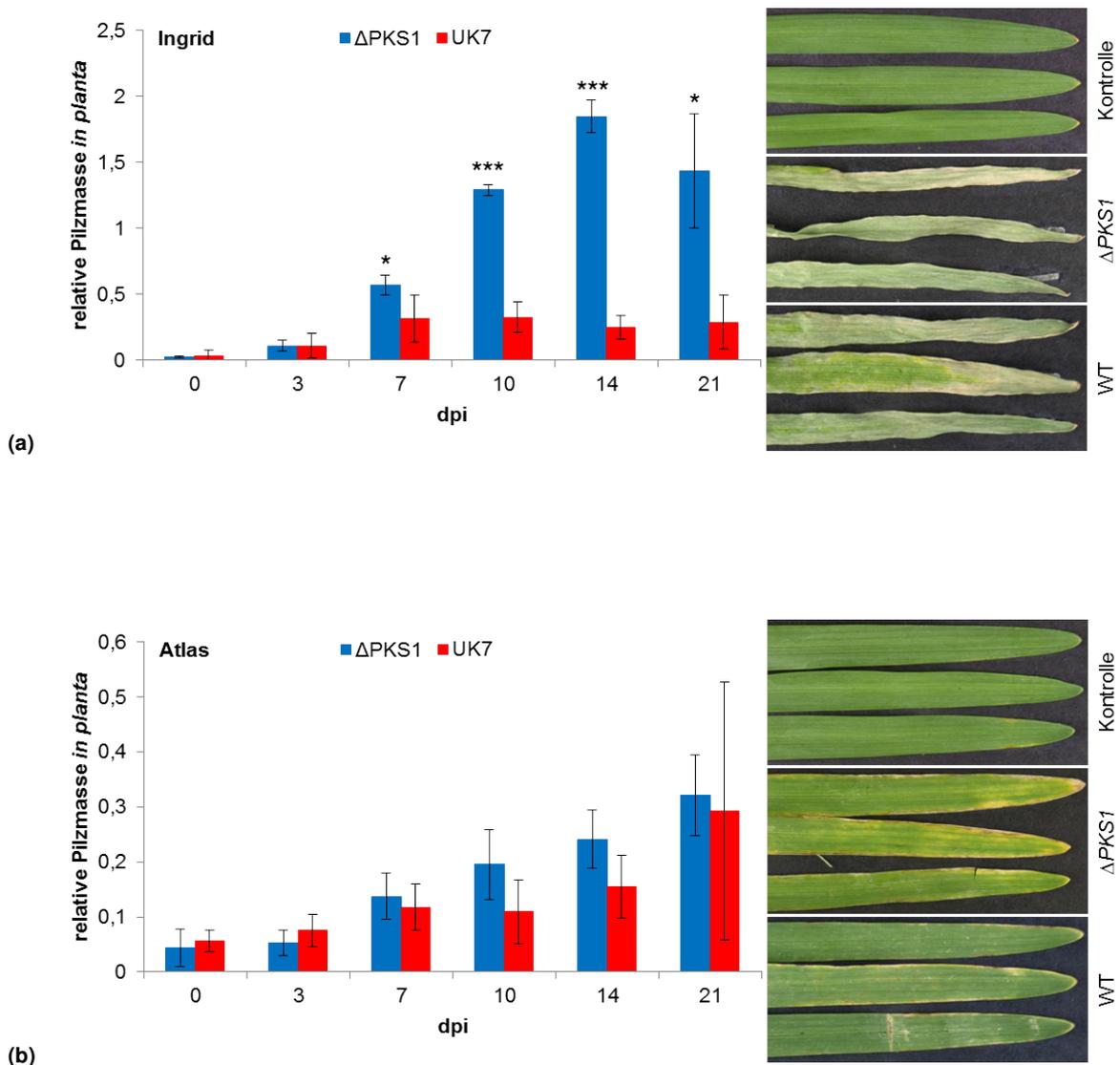


Abbildung 3.20.: Pilzquantifizierung *in planta* und Krankheitssymptome von UK7 Δ PKS1 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, (*) $p < 0,001$, $n=4$, Dokumentation der Symptome: 14 dpi**

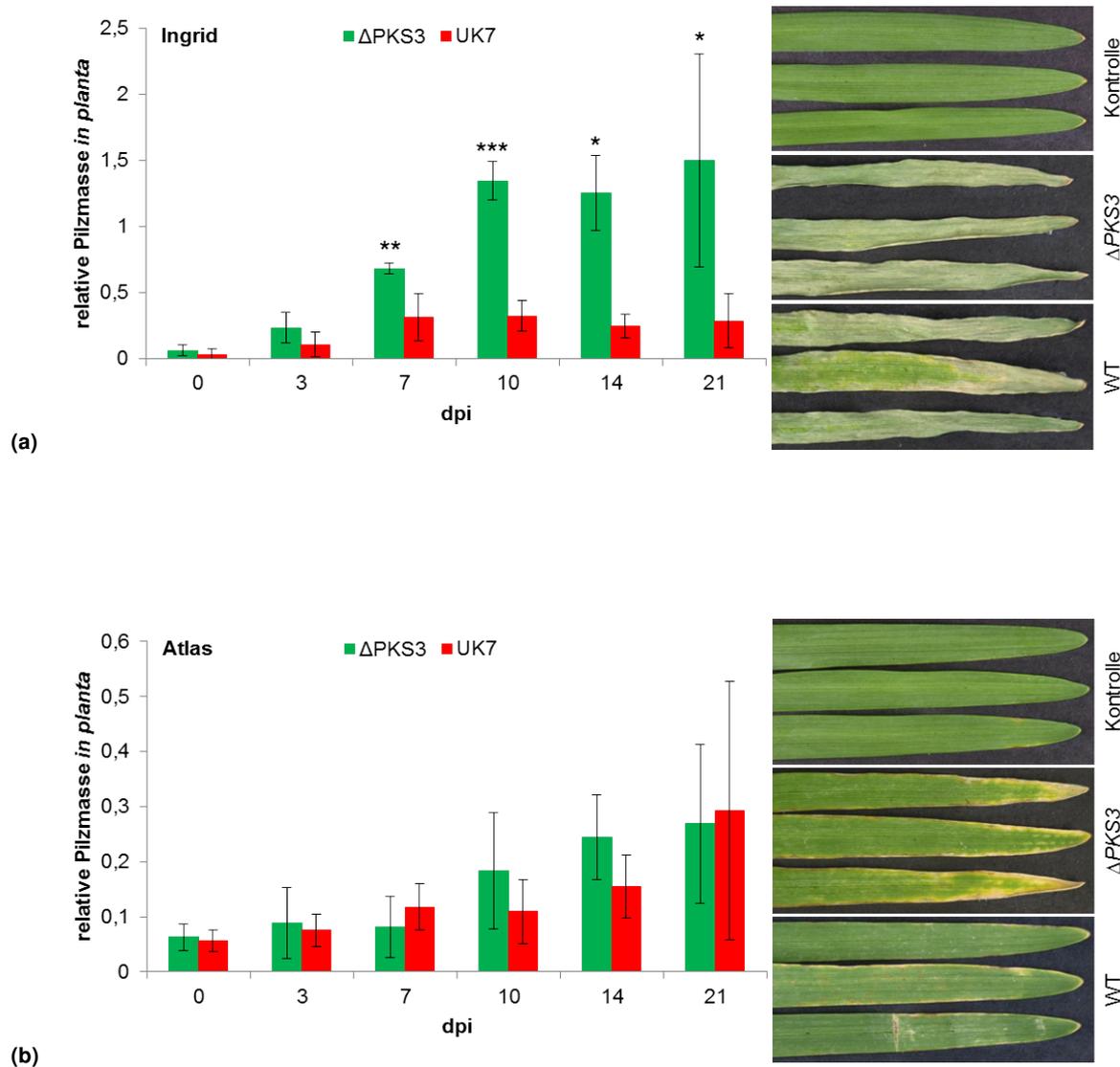


Abbildung 3.21.: Pilzquantifizierung *in planta* und Krankheitssymptome von UK7 Δ PKS3 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,005$, (***) $p < 0,001$, $n=4$, Dokumentation der Symptome: 14 dpi

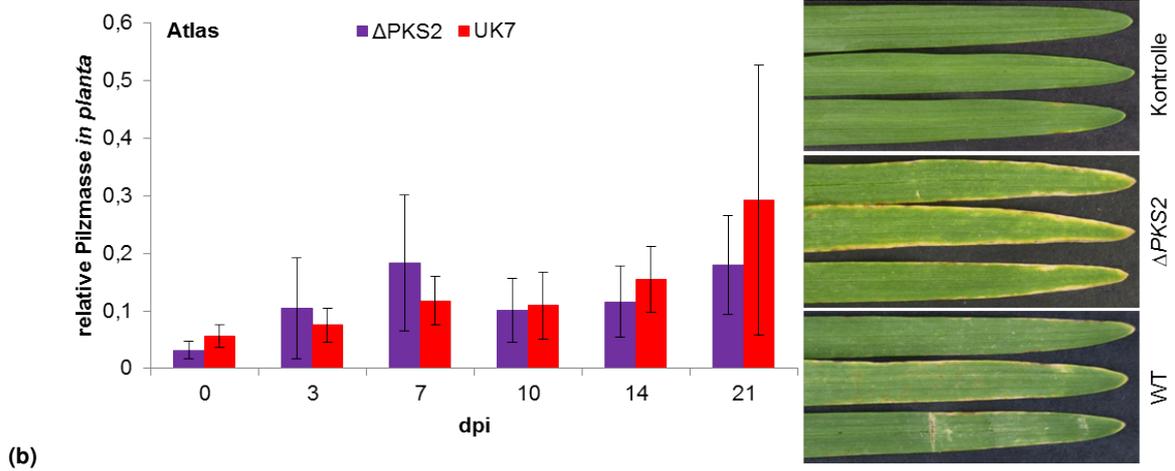
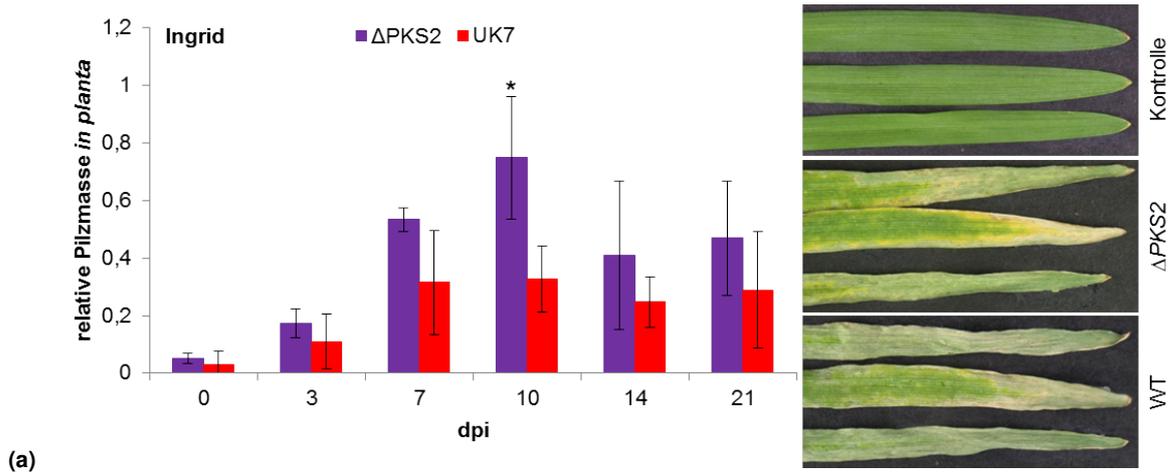


Abbildung 3.22.: Pilzquantifizierung *in planta* und Krankheitssymptome von UK7 Δ PKS2 während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, $n = 4$, Dokumentation der Symptome: 14 dpi

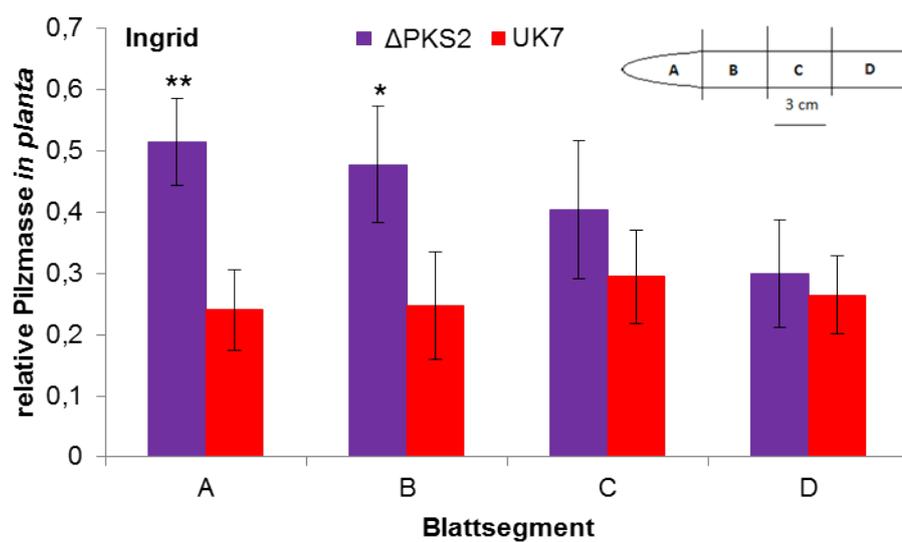


Abbildung 3.23.: Pilzquantifizierung *in planta* von UK7 Δ PKS2 in verschiedenen Blattsegmenten wahrend der Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, 14 dpi. (A, B, C) 3-cm-Abschnitte, (D) Rest des Blattes, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,005$, $n=4$

3.5.4.2. Wachstumsanalyse von UK7 Δ PKS1, UK7 Δ PKS2 und UK7 Δ PKS3 *ex planta*

Neben der Wachstumsanalyse *in planta*, die für UK7 Δ PKS1 und UK7 Δ PKS3 auf der hochsuszeptiblen Gerstensorte Ingrid ein stärkeres Wachstum im Vergleich zum Wildtyp UK7 zeigt (Kapitel 3.5.4.1), wurde das Wachstum *in vitro* nach 14 Tagen in YNB-Medium bestimmt. Hierfür wurde 50 mL YNB-Medium mit Sporen beimpft (Kapitel 2.2.1) und 14 Tage unter langsamen Schwenken bei 17°C in der Dunkelheit inkubiert. Das Myzel wurde filtriert und gewogen. Es ist zu erkennen, dass auch *in vitro* (nach 14 Tagen) die Deletionsmutanten UK7 Δ PKS1 und UK7 Δ PKS3 im Vergleich zum Wildtyp UK7 eine signifikant höhere Myzelmasse aufweisen. Beim Vergleich von UK7 Δ PKS2 mit Wildtyp UK7 ist dagegen kein Unterschied zu erkennen. Die Daten deuten darauf hin, dass die Deletion von *PKS1* bzw. *PKS3* einen Einfluss auf das Pilzwachstum *in* und *ex planta* hat, während für die Deletion von *PKS2* ein solcher Einfluss nicht zu erkennen ist.

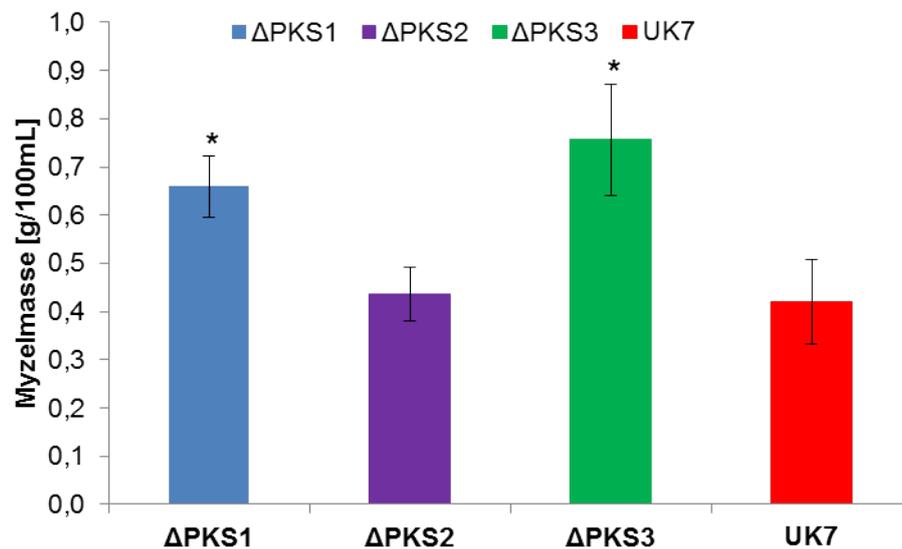


Abbildung 3.24.: Pilzwachstum *ex planta* (in YNB-MEDIUM, 14 d). Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, $n = 4$

3.5.5. Metabolomische Untersuchungen zu den möglichen Produkten von *PKS1*, *PKS2* und *PKS3*

Zur Untersuchung, welche Produkte durch *PKS1*, *PKS2* bzw. *PKS3* synthetisiert werden, wurde das Kulturfiltrat von $UK7\Delta PK S1$, $UK7\Delta PK S2$ und $UK7\Delta PK S3$ sowie des Wildtyps *UK7* einer LC/MS-Analyse unterzogen. Hierfür wurde 50 mL YNB-Medium mit Sporen beimpft (Kapitel 2.2.1) und für 14 Tage unter leichtem Schütteln bei 17°C und Dunkelheit angezogen. Das Filtrat wurde mit 2 N HCl angesäuert, dreimal gegen Ethylacetat (EA) ausgeschüttelt und die EA-Phase zur Trockne eingeengt. Die Messung wurde am ESI-FT-ICR (Bruker) durchgeführt. Beim Vergleich der aufgenommenen Massenspektren ist zu sehen, dass zwei Peaks, die im Massenspektrum des EA-Extraktes von Kulturfiltrat von Wildtyp *UK7* vorhanden sind, im Massenspektrum des EA-Extraktes von Kulturfiltrat von $UK7\Delta PK S1$ fehlen (Abb. 3.25). Die zu den Peaks gehörenden Masse-Ladungs-Verhältnisse betragen 289 und 291. Daraus ergeben sich zwei Substanzen mit den Summenformeln $C_{15}H_{14}O_6$ ($M = 290$ g/mol, $m/z = 289$) und $C_{15}H_{16}O_6$ ($M = 292$ g/mol, $m/z = 291$). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Struktur von $C_{15}H_{14}O_6$ sowie seine mögliche Funktion aufgeklärt werden.

In den Deletionsmutanten von *PKS2* bzw. *PKS3* konnte mit diesem experimentellen Ansatz (EA-Extraktion) kein Unterschied zum Wildtyp *UK7* festgestellt werden.

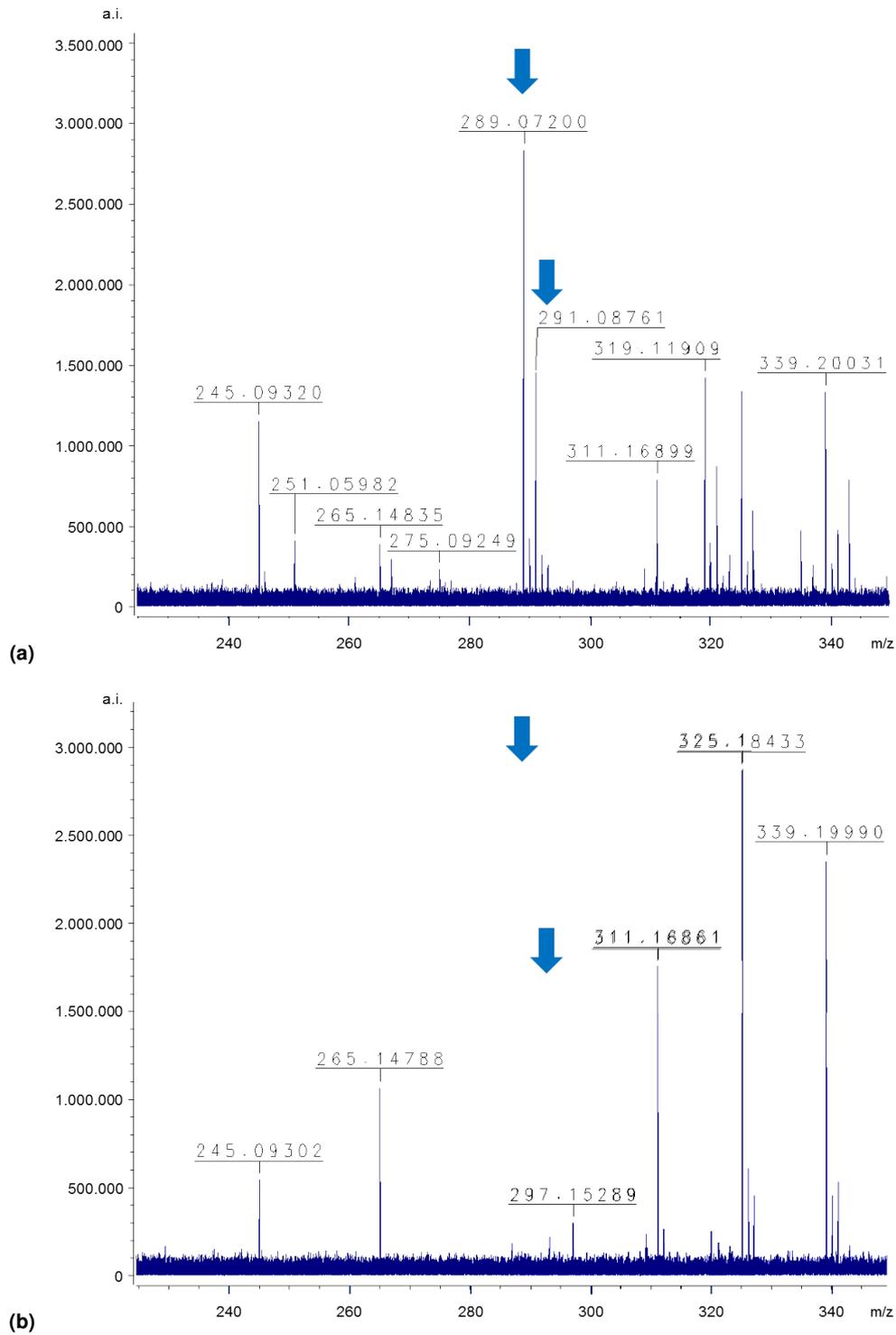


Abbildung 3.25.: Partielles Negativionen-ESI-FT-ICR-Massenspektrum (m/z 225 bis 350), Ethylacetat-extrakt aus Kulturfiltrat von Wildtyp UK7 bzw. UK7 Δ PKS1. (a) Ethylacetatextrakt aus Kulturfiltrat von Wildtyp UK7, (b) Ethylacetatextrakt aus Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS1, (a.i.) Absorptionsintensität, (m/z) Masse-Ladungs-Verhältnis

3.5.5.1. Quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$

Zur Strukturaufklärung mittels NMR gibt es zwei Anforderungen an die zu untersuchende Substanz: Quantität und Reinheit. Zur Aufklärung der Struktur von $C_{15}H_{14}O_6$ sollte in einem Vortest festgestellt werden, ob es möglich ist, durch den Einsatz verschiedener Medien eine höhere Ausbeute an $C_{15}H_{14}O_6$ zu erzielen. Weiterhin erfolgte eine quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat der Mutanten UK7 Δ PKS1, UK7 Δ PKS2 und UK7 Δ PKS3.

Zur Ermittlung, ob es quantitative Unterschiede von $C_{15}H_{14}O_6$ durch die Nutzung verschiedener Medien gibt, wurden folgende Medien verwendet: YNB, FRIES und LIMBO (Flüssigkultur). Dem YNB-Medium wurde nach 4 Tagen bzw. 7 Tagen Pflanzenextrakt (Kapitel 2.1.3) zugesetzt (1,2 mL pro 100 mL Medium), um zu untersuchen, ob der Einsatz von Pflanzenmaterial zu einer höheren Ausbeute von $C_{15}H_{14}O_6$ führt. Weiterhin wurden verschiedenen Ansatzgrößen ausgewählt (50 mL, 100 mL, 250 mL und 500 mL), wobei 50 mL in Petrischalen angesetzt wurden, die anderen Volumina in Kolben der entsprechenden Größe. Das Medium wurde 14 Tage bei 17°C im Dunkeln unter langsamen Schwenken inkubiert. Anschließend wurde das Medium filtriert (Wasserstrahlpumpe) und das Myzel gewogen. Das Kulturfiltrat wurde mit 2 N HCl angesäuert und anschließend dreimal mit EA ausgeschüttelt und bis zur Trockne eingengt. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 200 μ L MeOH und ein Reinigungsschritt über einen Spritzenfilter (4 mm, 0,2 μ m PTFE-Membran, Whatman). Die Messung wurde am ESI-UHPLC-QTOF-MS (Waters, im positiven Modus, $m/z=291$) durchgeführt. In Abbildung 3.27a ist zu erkennen, dass die Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ im Medium YNB (mit und ohne Zusatz von Pflanzenextrakt) am höchsten ist, während in den Medien FRIES und LIMBO vergleichsweise wenig $C_{15}H_{14}O_6$ nachgewiesen werden konnte. Weiterhin kann anhand der Abbildung 3.27a abgelesen werden, dass in einem Volumen von 50 mL eine größere Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ erzielt werden kann. Zusätzlich zeigt Abbildung 3.27, dass in den Medien FRIES und LIMBO im Vergleich zu YNB eine wesentlich höhere Myzelmasse produziert wird. Daraus kann geschlossen werden, dass die Myzelmasse nicht für eine größere Ausbeute an $C_{15}H_{14}O_6$ ausschlaggebend ist.

Nachdem festgestellt wurde, dass YNB im Vergleich zu FRIES bzw. LIMBO besser geeignet ist, um größere Mengen an $C_{15}H_{14}O_6$ zu erhalten, sollte geprüft werden, zu welchem Zeitpunkt das Kulturfiltrat geerntet werden kann. Dafür wurde 50 mL YNB-Medium mit Sporen beimpft (Kapitel 2.2.1) und bei 17°C im Dunkeln unter langsamen Schütteln inkubiert. Das Myzel und Kulturfiltrat wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet (Abb. 3.27). Das Myzel wurde gewogen und das Kulturfiltrat mit 2 N HCl angesäuert, anschließend dreimal mit EA ausgeschüttelt und bis zur Trockne eingengt. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 200 μ L MeOH und ein Reinigungsschritt über einen Spritzenfilter (4 mm, 0,2 μ m PTFE-Membran, Whatman). Die Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ wurde mittels ESI-UHPLC-QTOF-MS (Waters, im positiven Modus, $m/z=291$) bestimmt. Aus den Abbildungen 3.27c und d kann abgelesen werden, dass die Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ ab Tag 14 in etwa gleich bleibt. Gleiches gilt für die Myzel-

masse ab Tag 10. Aufgrund der hier vorliegenden Daten wurden zur Isolierung von $C_{15}H_{14}O_6$ aus dem Kulturfiltrat Petrischalen mit 50 mL YNB-Medium genutzt. Die Ernte des Kulturfiltrats erfolgte nach 14 Tagen.

Die ersten Analysen der Kulturfiltrate der PKS-Deletionsmutanten im Vergleich mit Wildtyp UK7 (ESI-FT-ICR, Bruker) ergaben Hinweise darauf, dass $C_{15}H_{14}O_6$ (fehlend im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS1) in einer niedrigeren Konzentration im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS3 vorliegt. Zur Überprüfung dieses Hinweises wurde 50 mL YNB-Medium mit Sporen beimpft (Kapitel 2.2.1) und 14 Tage bei 17°C im Dunkeln unter langsamen Schwenken inkubiert. Das Kulturfiltrat wurde mit 2 N HCl angesäuert und dreimal mit EA ausgeschüttelt. Die EA-Phase wurde zur Trockne eingengt. Die Proben wurden in 200 μ L MeOH aufgenommen und über einen Spritzenfilter (4 mm, 0,2 μ m PTFE-Membran, Whatman) gereinigt. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$ (ESI-UHPLC-QTOF-MS, Waters, positiver Modus, $m/z=291$). In YNB-Medium (Kontrolle), wie auch dem Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS1 ist kein $C_{15}H_{14}O_6$ vorhanden (Abb. 3.26). Im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS2 bzw. von Wildtyp UK7 konnten ähnliche Mengen an $C_{15}H_{14}O_6$ gemessen werden. Im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS3 zeigte sich hingegen, dass die Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ im Vergleich zum Kulturfiltrat von Wildtyp UK7 signifikant geringer ist (Abb. 3.26).

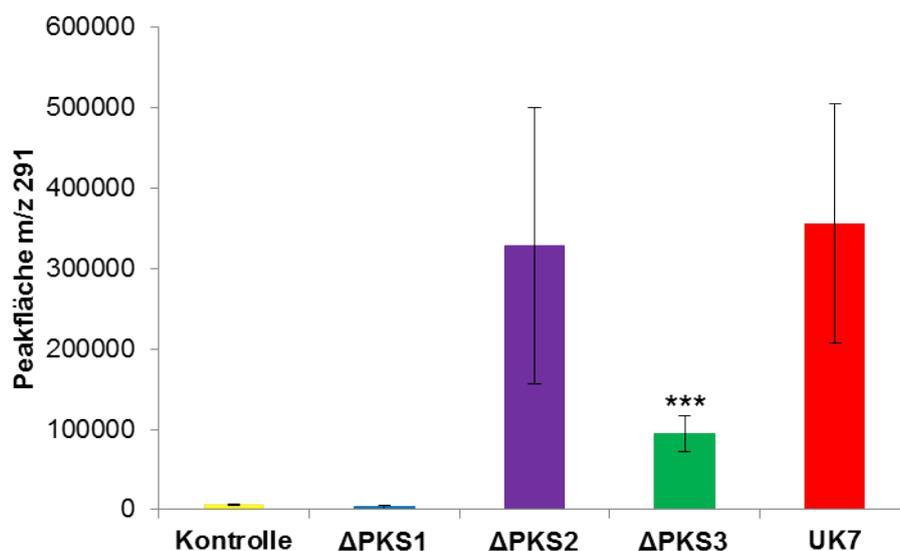
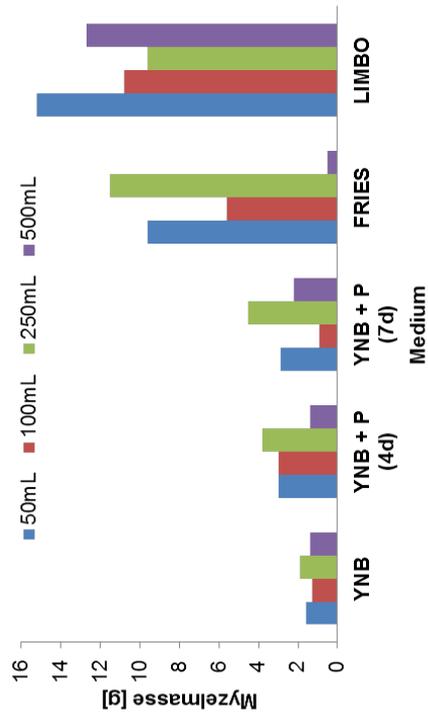
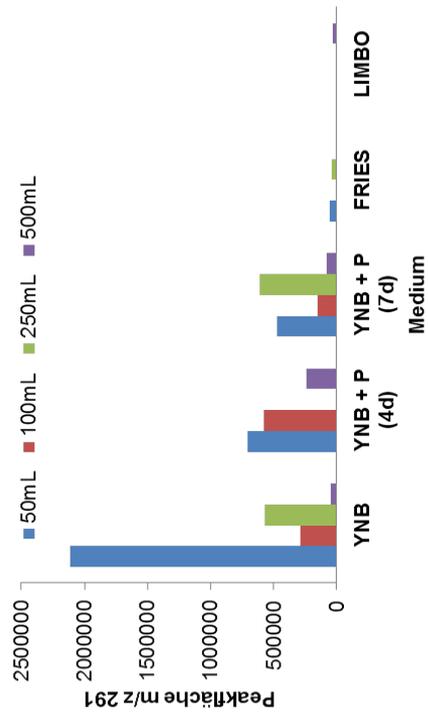


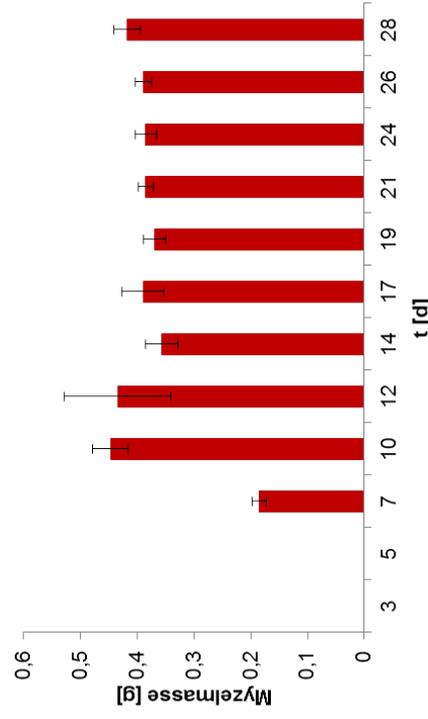
Abbildung 3.26.: Quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat der PKS-Deletionsmutanten und Wildtyp UK7. (m/z) Masse-Ladungs-Verhältnis (positiver Modus, $m/z=291$), Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: (***) $p<0,001$, $n=15$



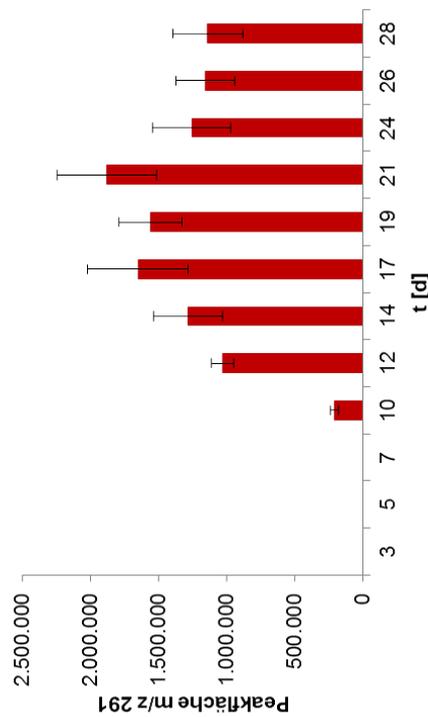
(a)



(b)



(c)



(d)

Abbildung 3.27.: Quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$ (Ethylacetatextrakt) und Bestimmung der Myzelmasse in verschiedenen Medien mit UK7. (a) quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$ (Ethylacetatextrakt) nach 14 d in verschiedenen Medien, $n=1$, (b) Bestimmung der Myzelmasse nach 14 d in verschiedenen Medien, $n=1$, (c) quantitative Bestimmung von $C_{15}H_{14}O_6$ (Ethylacetatextrakt) in YNB, $n=3$, (d) Bestimmung der Myzelmasse in YNB, $n=3$, (m/z) Masse-Ladungs-Verhältnis (positiver Modus, $m/z=291$), (YNB) YNB-Medium (YNB + P, 4d bzw. 7d) YNB-Medium dem nach 4 bzw. 7 Tagen Pflanzenextrakt zugesetzt wurde, (FRIES) FRIES-Medium, (LIMBO) LIMBO-Medium

3.5.5.2. Strukturaufklärung von $C_{15}H_{14}O_6$

Für die Strukturaufklärung von $C_{15}H_{14}O_6$ wurden verschiedene Ansätze gewählt. In einem ersten Versuch wurden 10 L Kulturfiltrat (UK7 in YNB-Medium, 14 d) mit 2 N HCl angesäuert und dreimal mit dem gleichen Volumen EA ausgeschüttelt und weitestgehend eingeeengt. Dieser Rohextrakt entsprach 126,5 mg. Die gesamte Menge wurde in Chloroform:MeOH 1:1 aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Trennung über Kieselgel (Korngröße: 0,04 - 0,063, Säule: 80 cm) mit Chloroform:MeOH 1:1. Es wurden 10-mL-Fractionen gesammelt und diese mittels Spritzenpumpen-ESI-MS (API 3200, AB Sciex) analysiert. Fractionen, die $C_{15}H_{14}O_6$ enthielten wurden vereinigt und mittels präparativer HPLC weiter gereinigt (Waters; LiChroCART-Säule, Material: LiChrospher, Porengröße: 100, Teilchengröße: 5, Modifikation: C18, l= 250 mm, d_i= 10 mm; Laufmittel H₂O/ MeOH; Gradient: 2% MeOH - 100% MeOH in 25 min; Fluss: 6,25 mL/ min, Fraktionssammlung: 15 s). Die Fractionen aus der präparativen HPLC wurden wiederum auf $C_{15}H_{14}O_6$ überprüft. Dabei ergaben sich nur Fractionen, die zusätzlich zu $C_{15}H_{14}O_6$ Verunreinigungen enthielten. Die Vereinigung der $C_{15}H_{14}O_6$ -enthaltenden Fractionen wurde anhand des Grades der Verunreinigung vorgenommen, wodurch sich zwei Fractionen (0,38 mg und 2,7 mg) ergaben. Da die Mengen der Fractionen relativ klein und der Anteil der Verunreinigungen für eine aussagekräftige ¹H-NMR zu groß waren, wurde ein weiterer Versuch zur Strukturaufklärung angesetzt.

In diesem zweiten Ansatz wurden 25 L Kulturfiltrat (UK7 in YNB-Medium, 14 d) angesäuert (2 N HCl) und dreimal mit dem gleichen Volumen EA ausgeschüttelt. Der EA-Extrakt wurde weitgehend eingeeengt. Der Rückstand hatte eine Masse von 550 mg. Nach Aufnahme des gesamten Rückstandes in MeOH erfolgte die Säulenchromatographie mit Sephadex LH20 (Säule: 80 cm) mit MeOH. Die Fractionen wurden mittels Spritzenpumpen-ESI-MS überprüft und die $C_{15}H_{14}O_6$ -beinhaltenden Fractionen vereinigt und über eine zweite Sephadex-Säule (LH20, 80 cm) mit Aceton:MeOH 4:1 weiter gereinigt. Die $C_{15}H_{14}O_6$ -beinhaltenden Fractionen (nach Spritzenpumpen-ESI-MS-Messung) wurden vereinigt und mittels einer dritten Sephadex-Säule (LH20, 50 cm) mit Dichlormethan:MeOH 1:1 weiter gereinigt. Die $C_{15}H_{14}O_6$ -beinhaltenden Fractionen wurden erneut vereinigt und über C18-Chromabond-Säulen gegeben. Dabei erfolgte die Elution mit 50% MeOH, 100% MeOH und 2 N HCl in 100% MeOH. $C_{15}H_{14}O_6$ befand sich danach in der Fraction, die mit 50% MeOH eluiert wurde. Anhand der Spritzenpumpen-ESI-MS konnte festgestellt werden, dass diese Fraction weiterhin Verunreinigungen beinhaltete. Diese konnten mittels präparativer HPLC nicht abgetrennt werden (Waters; LiChroCART-Säule, Material: LiChrospher, Porengröße: 100, Teilchengröße: 5, Modifikation: C18, l= 250 mm, d_i= 10 mm; Laufmittel H₂O/ MeOH; Gradient: 2% MeOH - 100% MeOH in 25 min; Fluss: 6,25 mL/ min, Fraktionssammlung: 15 s). Nach der präparativen HPLC wurden sämtliche $C_{15}H_{14}O_6$ -beinhaltenden Fractionen vereinigt (m = 4,8 mg). Aufgrund der immer noch vorhandenen Verunreinigungen und der geringen Menge der vereinigten Fraction konnte kein aussagekräftiges ¹H-NMR aufgenommen werden.

Mit den oben beschriebenen Ansätzen war es nicht möglich die Struktur von $C_{15}H_{14}O_6$ aufzuklären, da nach diversen Reinigungsschritten eine zu geringe Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ vorlag, die zusätzlich noch verunreinigt war. Daher ist es nötig eine größere Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ zu produzieren, um aussagekräftige 1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren aufnehmen zu können. Nach beiden Reinigungsversuchen (Kieselgel und Sephadex LH20) konnte festgestellt werden, dass es sehr schwierig war, die während der NMR gegen Deuterium getauschten Wasserstoffatome der Verbindung zurückzutauschen. Dies betrifft insgesamt fünf Wasserstoffatome. Weiterhin waren die $C_{15}H_{14}O_6$ -beinhaltenden Proben beider Ansätze unlöslich in Chloroform und hatten eine gelbliche Farbe. Das UV-Spektrum von $C_{15}H_{14}O_6$ zeigt Maxima bei 220 nm und 380 nm (Abb. 3.28, Detektor ESI-UHPLC-QTOF-MS, Waters, positiver Modus, $m/z=291$).

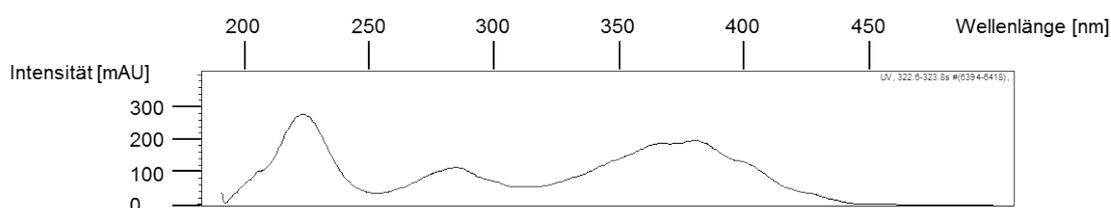
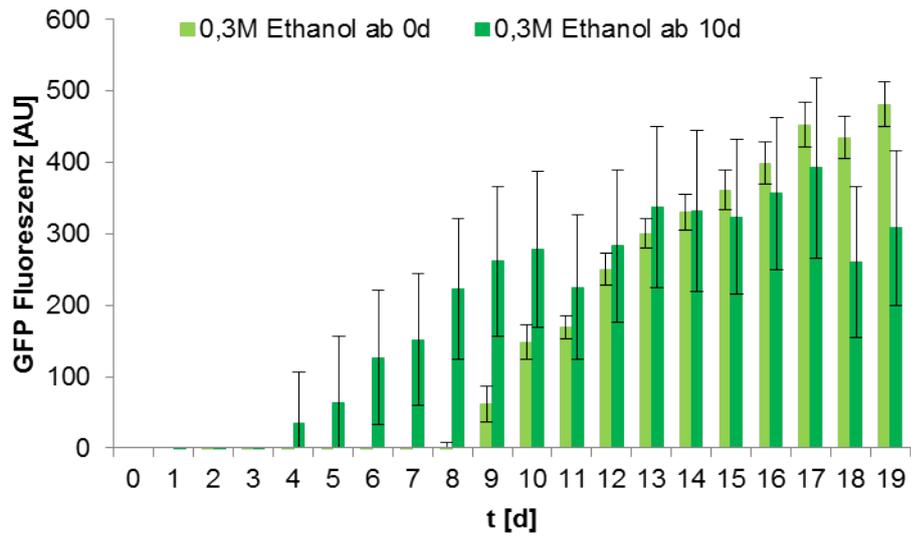


Abbildung 3.28.: UV-Spektrum von $C_{15}H_{14}O_6$.

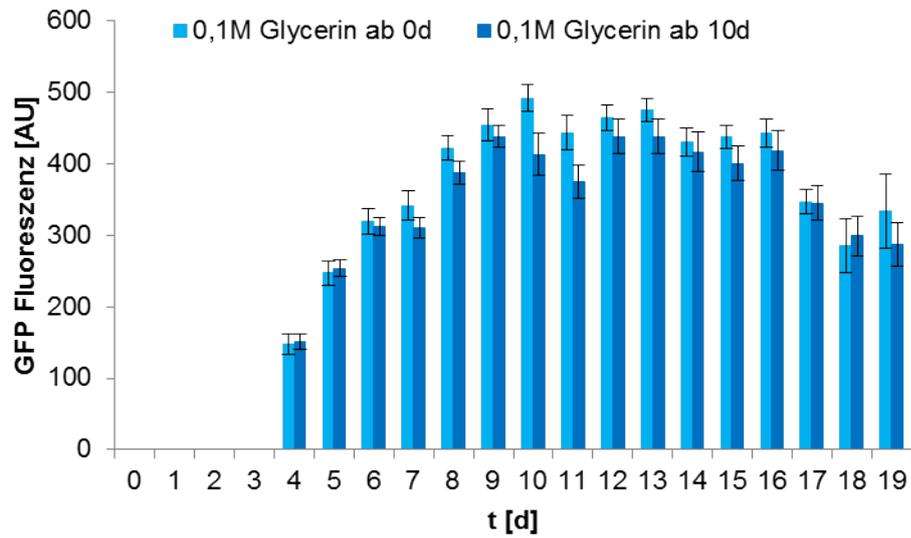
3.5.5.3. Untersuchungen zur Überexpression von *PKS1*

Da die Strukturaufklärung von $C_{15}H_{14}O_6$ aus 10 bzw. 25 L Kulturfiltrat aufgrund der zu geringen Ausbeute der Substanz fehlgeschlagen ist, sollte untersucht werden, ob eine Überexpression von *PKS1* zu einer größeren Ausbeute an $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat führt. Hierfür sollte der endogene Promotor der *PKS1* gegen den konstitutiven ToxA-Promotor aus *Pyrenophora tritici-repentis* (Andrie *et al.*, 2005) bzw. den induzierbaren *alcA*-Promotor aus *Aspergillus* (Waring *et al.*, 1989) getauscht werden. Durch die Nutzung des induzierbaren Promotors soll verhindert werden, dass die Überexpression von *PKS1* sich möglicherweise lethal auswirkt. Der *alcA*-Promotor lässt sich durch EtOH bzw. Glycerin induzieren. Daher wurde in einem Vortest untersucht, ob *R. commune* in der Lage ist, mit EtOH bzw. Glycerin im Medium zu wachsen. Hierzu wurde eine GFP-exprimierende Mutante (grün fluoreszierendes Protein) von *R. commune* verwendet (Kirsten *et al.*, 2011). Die Durchführung des Versuchs erfolgte, wie in Kirsten *et al.* (2011) beschrieben. Als Medium wurde FRIES verwendet, dem 0,3 M EtOH bzw. 0,1 M Glycerin zugesetzt wurde (Ha *et al.*, 2006). Die Zugabe von EtOH bzw. Glycerin erfolgte zu den Zeitpunkten 0 d und 10 d. Es ist zu sehen, dass trotz Zugabe von EtOH bzw. Glycerin das Pilzwachstum möglich ist (Abb. 3.29). Der *alcA*-Promotor wurde von Prof. Dr. P. Tudzinsky (Universität Münster) zur Verfügung gestellt.

Das Konstrukt für den Austausch des endogenen *PKS1*-Promotors besteht aus 1000 bp der 5'-UTR von *PKS1*, einer Phleomycinkassette zur Selektion positiver Transformanten, dem



(a)



(b)

Abbildung 3.29.: Wachstum von *R. commune* in Gegenwart von 0,3 M EtOH bzw. 0,1 M Glycerin. (a) FRIES mit 0,3 M Ethanol, Zugabe zu 0 d bzw. 10 d, (b) FRIES mit 0,1 M Glycerin, Zugabe zu 0 d bzw. 10 d, n=12; Wachstumsmessung erfolgte mittels GFP-Fluoreszenz

ToxA- bzw. alcA-Promotor und den ersten 1000 bp des *PKS1*-Gens (Abb. 3.30). Zunächst erfolgte die Amplifikation der Phleomycinkassette (Abb. 3.30a und Tab. A.1 und A.4). Das PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel gereinigt und nach Angaben des Herstellers in den linearen Vektor pCR2.1 ligiert. Es folgte eine Überprüfung der Sequenz durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden M13_reverse und M13_forward (Tab. A.1). Die 1000 bp der 5'UTR von *PKS1*, die Sequenzen vom ToxA- bzw. alcA-Promotor sowie die ersten 1000 bp des *PKS1*-Gens wurden mit den in Abbildung 3.30a angegebenen Oligonukleotiden amplifiziert (Tab. A.1 und A.4). Durch die verwendeten Oligonukleotide wurden den PCR-Produkten Restriktionsschnittstellen angefügt, um später eine gerichtete Ligation in den zuvor erstellten Vektor „pCR2.1 + Phleomycinkassette“ zu ermöglichen (Restriktionsschnittstellen s. Abb. 3.30). Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel gereinigt und in den Vektor pJet ligiert. Es folgte eine Sequenzierung mit den Oligonukleotiden pJet1.2_forward und -reverse zur Überprüfung der amplifizierten Sequenzen. Anschließend wurde zunächst die 5'-UTR von *PKS1* mit Hilfe der entsprechenden Enzyme vor die Phleomycinkassette ligiert (Sequenzierung mit M13_reverse und Seq_OE_PKS1_as). Danach wurde durch Einbringung eines Linkers der Abstand zwischen den Schnittstellen XbaI und ApaI vergrößert, um die Integration der Startsequenz von *PKS1* zu ermöglichen. Hierfür wurden die Oligonukleotide Lin1_XbaI_BamHI und Lin2_XbaI_BamHI zusammen auf 95°C erhitzt und langsam abgekühlt (zur Hybridisierung) und in den zuvor mit BamHI geschnittenen Vektor „pCR2.1 + 5'-UTR *PKS1* + Phleomycinkassette“ ligiert (Sequenzierung mit M13_forward und Seq_Link_OE_s). Es folgte die Ligation der ersten 1000 bp des *PKS1*-Gens (Sequenzierung mit M13_forward und Seq_Link_OE_s) und des ToxA- bzw. alcA-Promotors (Sequenzierung mit Seq_Link_OE_s und Seq_OE_Prom_as; Abb. 3.30a).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten die Konstrukte zur Überexpression von *PKS1* unter dem konstitutiven ToxA-Promotor bzw. dem induzierbaren alcA-Promotor fertig gestellt werden. In weiterführenden Arbeiten sollen diese Konstrukte in Pilzprotoplasten des Wildtyp UK7 transferiert werden. Sollte die homologe Transformation stattfinden, wird der endogene *PKS1*-Promotor gegen den ToxA- bzw. alcA-Promotor ausgetauscht (Abb. 3.30b), was zu einer Überexpression des *PKS1*-Gens und somit zu einer größeren Ausbeute an $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat führen sollte.

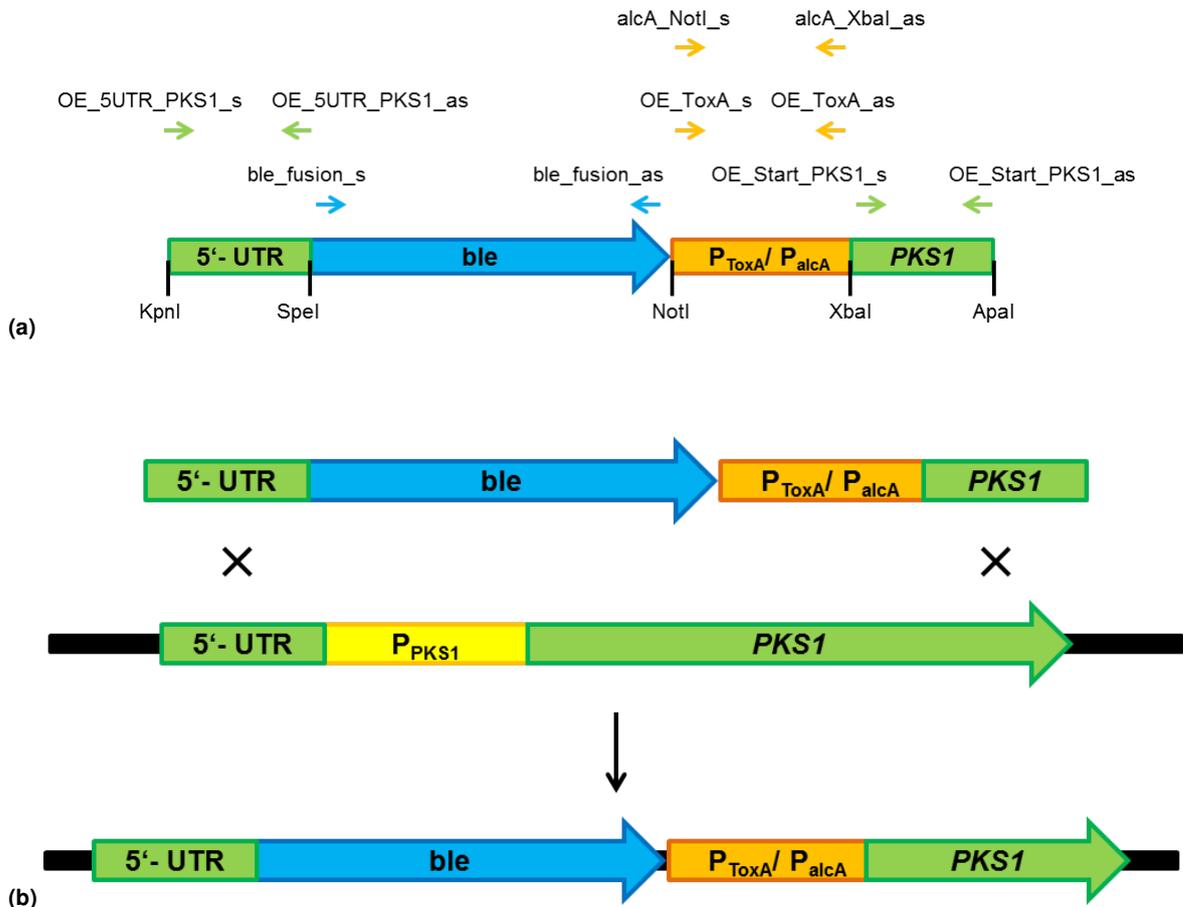


Abbildung 3.30.: Schematische Darstellung zum Aufbau der Konstrukte und der homologen Rekombination zur *PKS1*-Überexpression. (a) Amplifikation der einzelnen Fragmente und Angabe der Restriktionsschnittstellen zur Ligation, (b) homologe Rekombination, (5'-UTR) 5'-untranslatierte Region, (ble) Phleomycinresistenzkassette, (*PKS1*) *PKS1*-Gen, (P_{PKS1}) endogener *PKS1*-Promotor, (P_{ToxA}) konstitutiver Promotor aus *P. tritici-repentis*, (P_{alcA}) induzierbarer Promotor aus *Aspergillus*, (KpnI/ SpeI/ NotI/ XbaI/ ApaI) Restriktionsschnittstellen zur Ligation

3.5.5.4. Untersuchungen zur möglichen Funktion von C₁₅H₁₄O₆

Die Verbindung C₁₅H₁₄O₆ fehlt im Kulturfiltrat von UK7Δ*PKS1*. Weiterhin führt die Deletion von *PKS1* zu einem verstärkten Pilzwachstum *in* und *ex planta*. Daher ergab sich die Hypothese, dass es sich bei C₁₅H₁₄O₆ möglicherweise um einen Keimungs- oder Wachstumsinhibitor handeln könnte, der auf die eigenen Sporen wirkt. Es könnte sein, dass *R. commune* so einer möglichen Nährstoffknappheit entgegenwirkt, die auftreten könnte, wenn zu viele Sporen des Pilzes gleichzeitig auskeimen.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde konditioniertes Medium verwendet. Hierfür wurden Kulturfiltrat (YNB-Medium, 14 d) von UK7Δ*PKS1* bzw. Wildtyp UK7 lyophilisiert. Der Rückstand wurde anschließend in frischem Medium aufgenommen. Somit wird Medium erhalten in dem C₁₅H₁₄O₆ vorliegt (lyophilisiertes Kulturfiltrat von Wildtyp UK7) bzw. nicht vorliegt (ly-

ophilisiertes Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS1).

Das konditionierte Medium wurde für Wachstums- und Keimungsversuche mit *R. commune* eingesetzt. Für die Wachstumsversuche mit *R. commune* wurde eine GFP-exprimierende Mutante verwendet (s. auch Kapitel 3.5.5.3; Kirsten *et al.*, 2011). Die Messung der GFP-Fluoreszenz wurde wie in Kirsten *et al.* (2011) beschrieben durchgeführt und erfolgte täglich über einen Zeitraum von 17 Tagen. Das lyophilisierte Medium von UK7 Δ PKS1 bzw. Wildtyp UK7 wurde in frischem FRIES-Medium aufgenommen und dabei 2x konzentriert. Als Kontrollen für diesen Wachstumsversuch wurde YNB (ohne Pilz) lyophilisiert und in FRIES aufgenommen (2x konzentriert) bzw. FRIES (1x konzentriert) eingesetzt. Das stärkste Pilzwachstum findet in der Kontrolle „FRIES“ statt während das geringste Wachstum der GFP-Mutante in der Kontrolle „FRIES + YNB“ zu verzeichnen ist. Beim Vergleich des Pilzwachstum in „FRIES - C₁₅H₁₄O₆“ und „FRIES + C₁₅H₁₄O₆“ ist zu sehen, dass in „FRIES - C₁₅H₁₄O₆“ mehr Pilzbiomasse gebildet wird (Abb. 3.31). Dieser Unterschied ist ab Tag 7 als signifikant einzustufen. Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass C₁₅H₁₄O₆ im Medium einen Einfluss auf das Pilzwachstum hat. Allerdings ist es möglich, dass die Ergebnisse durch weitere Unterschiede in den lyophilisierten Kulturfiltraten von UK7 Δ PKS1 und Wildtyp UK7 zustande kommen. Beispielsweise konnte durch vergleichende LC/MS-Analysen gezeigt werden, dass neben C₁₅H₁₄O₆ auch C₁₅H₁₆O₆ im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS1 fehlt (Kapitel 3.5.5). Zusätzlich könnten auch andere bisher unbekannte Faktoren das Ergebnis beeinflussen. Der starke Anstieg an Pilzmasse in „FRIES“ wird darauf zurückgeführt, dass es sich hier um 1x konzentriertes Medium handelt, während die anderen Medien 2x konzentriert vorliegen.

Zur weiteren Untersuchung der Hypothese von C₁₅H₁₄O₆ als Keimungs- bzw. Wachstumsinhibitor wurden mit konditioniertem Medium Keimungsversuche durchgeführt. Hierfür wurden Objektträger mit festem YNB-Medium beschichtet. Das lyophilisierte Kulturfiltrat (YNB-Medium, 14 d) von UK7 Δ PKS1 und Wildtyp UK7 wurde zunächst in Wasser aufgenommen und dadurch 4x konzentriert. Die so entstandene Lösung wurde mit 10000 Sporen vom Wildtyp UK7 zu gleichen Teilen vermischt, so dass die entstandene Sporensuspension 5000 Sporen und 2x konzentriertes konditioniertes Medium enthielt. Die Sporensuspension wurde gleichmäßig auf die beschichteten Objektträger verteilt und bei 17°C im Dunkeln mit 100% Luftfeuchte inkubiert. Nach 24 bzw. 48 Stunden wurden mikroskopisch die ausgekeimten Sporen bestimmt. Weiterhin wurden nach 48 Stunden die Anzahl der Keimschläuche pro Spore bestimmt und die Länge der Keimschläuche gemessen (Fluoreszenzmikroskop Apotome I). Die Keimungsraten nach 24 bzw. 48 Stunden zeigen keinen Unterschied beim Vergleich von „Wasser - C₁₅H₁₄O₆“ und „Wasser + C₁₅H₁₄O₆“ (Abb. 3.32a und b). Dies gilt auch für den Einfluss von „Wasser - C₁₅H₁₄O₆“ und „Wasser + C₁₅H₁₄O₆“ in Bezug auf die Anzahl der Keimschläuche pro Spore (Abb. 3.32c) und die Länge der Keimschläuche (Abb. 3.32d). Einzig in der Kontrolle „Wasser“ sind längere Keimschläuche zu verzeichnen, was darauf zurückgeführt wird, dass der Kontrolle „Wasser“ kein lyophilisiertes Medium zugesetzt wurde.

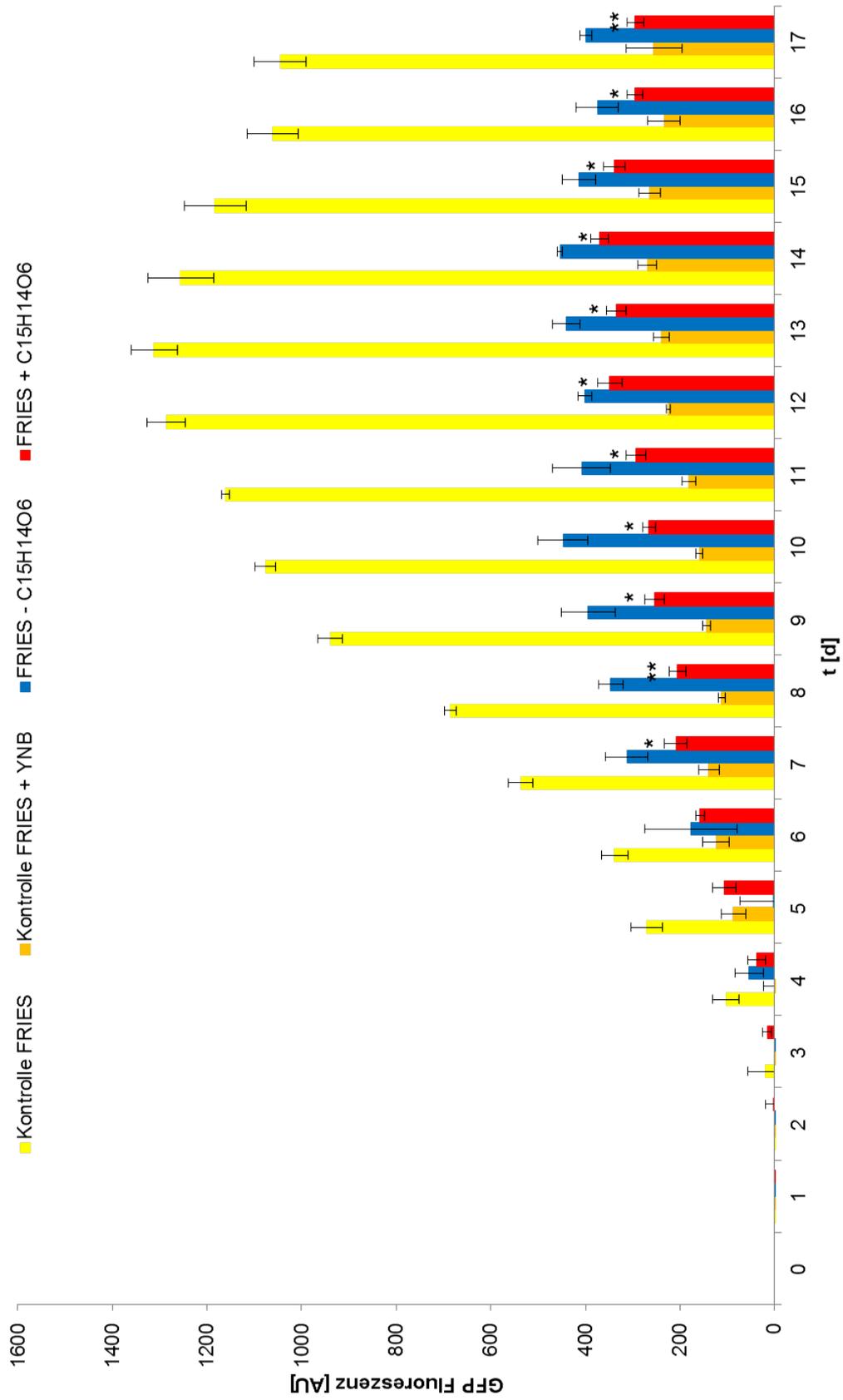


Abbildung 3.31.: Wachstum von *R. commune* in Abwesenheit bzw. Gegenwart von C₁₅H₁₄O₆. Signifikanz der Abweichung von „-“ C₁₅H₁₄O₆“ ermittelt mit t-Test: (*) p<0,05, (**) p<0,005, n=3; Wachstumsbestimmung erfolgte mittels GFP-Fluoreszenz

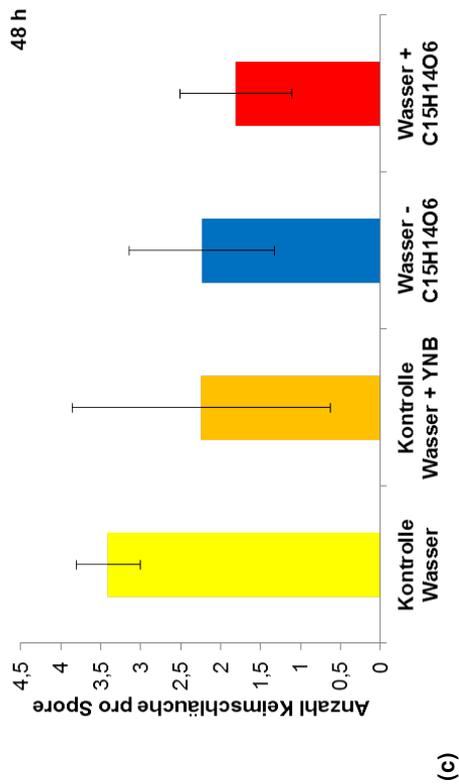
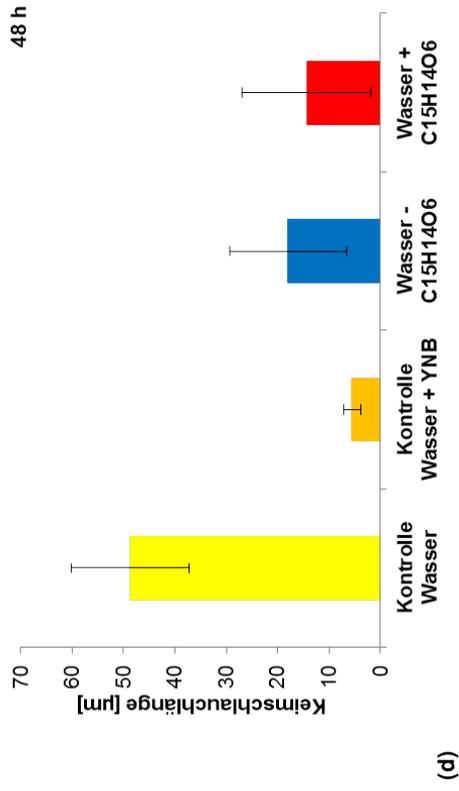
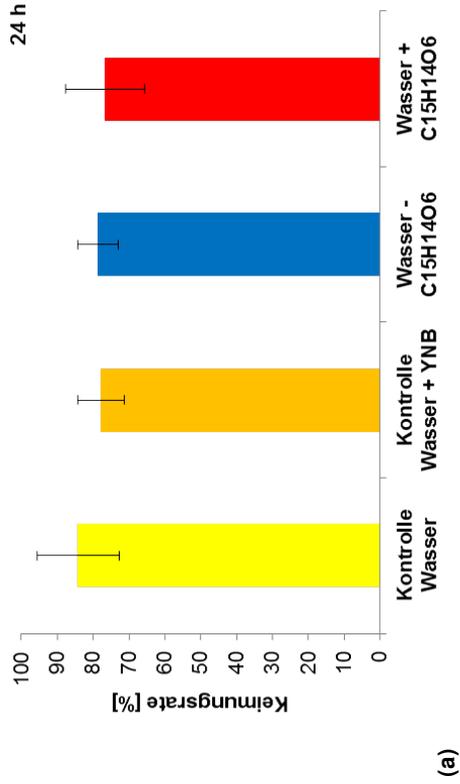
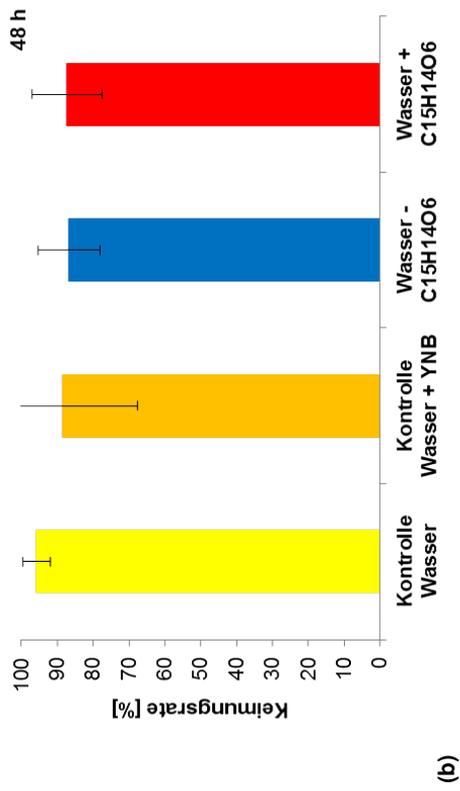


Abbildung 3.32.: Keimung von *R. commune* in Abwesenheit bzw. Gegenwart von C₁₅H₁₄O₆. (a) Keimungsrate nach 24 h, (b) Keimungsrate nach 48 h, (c) Anzahl der Keimschläuche pro Spore nach 48 h, (d) Länge der Keimschläuche nach 48 h, Signifikanz der Abweichung von „- C₁₅H₁₄O₆“ ermittelt mit t-Test: keine Signifikanz, n=8

Um zu untersuchen, ob $C_{15}H_{14}O_6$ möglicherweise einen Einfluss auf andere Organismen hat, wurden Wachstumsanalysen mit *Phytophthora infestans* (Wachstumsbestimmung über GFP-Fluoreszenz, GFP-Isolat 208m2, bereitgestellt durch Prof. Dr. S. Rosahl, IPB Halle/Saale) bzw. *E. coli* (Wachstumsbestimmung über die optische Dichte der Bakterien, OD600) durchgeführt. Sporangien von *P. infestans* wurden auf einen Titer von $1 \cdot 10^5$ gebracht. 100 μL dieser Sporangien wurden auf festes Haferbohnenmedium gegeben und anschließend sofort die GFP-Fluoreszenz bestimmt (als Nullwert). Nach 24 Stunden wurden 20 μL konditioniertes Medium (nach Lyophilisation rückgelöst in Wasser, dadurch 2x konzentriert) auf die Sporangien gegeben und über einen Zeitraum von 5 Tagen die Biomasse des Oomyceten mittels GFP-Fluoreszenz bestimmt. Es ist kein Unterschied zwischen den Kontrollen („Wasser“ und „Wasser + YNB“) und der Ab- bzw. Anwesenheit von $C_{15}H_{14}O_6$ („Wasser - $C_{15}H_{14}O_6$ “ und „Wasser + $C_{15}H_{14}O_6$ “) zu erkennen (Abb. 3.33). Auch Experimente mit einer geringeren Anzahl an Sporangien bzw. anderen Konzentrationen an konditioniertem Medium zeigten keinen Unterschied (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass $C_{15}H_{14}O_6$ keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans* hat.

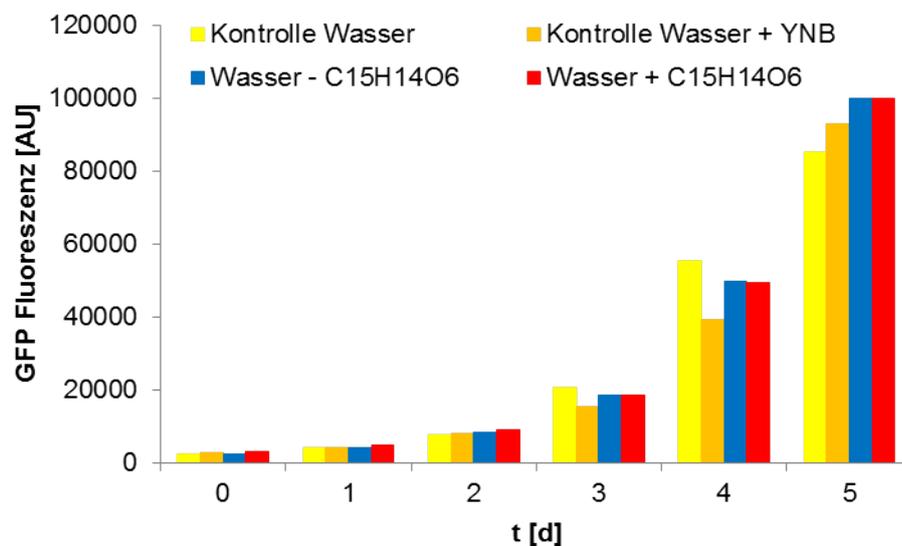


Abbildung 3.33.: Wachstum von *P. infestans* in Abwesenheit bzw. Gegenwart von $C_{15}H_{14}O_6$. n=1; Wachstumsbestimmung erfolgte mittels GFP-Fluoreszenz

Ähnliche Ergebnisse konnten beim Versuch mit *E. coli* gezeigt werden. Hierfür wurde lyophilisiertes Kulturfiltrat (YNB-Medium, 14 d) von UK7 Δ PKS1 bzw. Wildtyp UK7 in LB-Medium rückgelöst und dabei 2x konzentriert. Dieses konditionierte LB-Medium wurde für *E. coli* XL1Blue verwendet (3 mL Medium plus 10 μL einer Übernachtskultur) und bei 37°C inkubiert. Das Zellwachstum wurde über die Messung der Bakteriendichte (OD600) stündlich über einen Zeitraum von 7 Stunden bestimmt. Es ist ersichtlich, dass wie auch beim Versuch mit *P. infestans* keinerlei Unterschiede zwischen den Kontrollen und Medien ohne bzw. mit $C_{15}H_{14}O_6$

festzustellen sind (Abb. 3.34). Nur in „LB + YNB“ ist ein etwas geringerer Wachstumsanstieg von *E. coli* zu verzeichnen. Dieses Ergebnis wird auf osmotische Effekte zurückgeführt, da sich in konditioniertem Medium mit YNB 2x konzentrierte Komponenten des YNB-Mediums plus LB-Medium befinden.

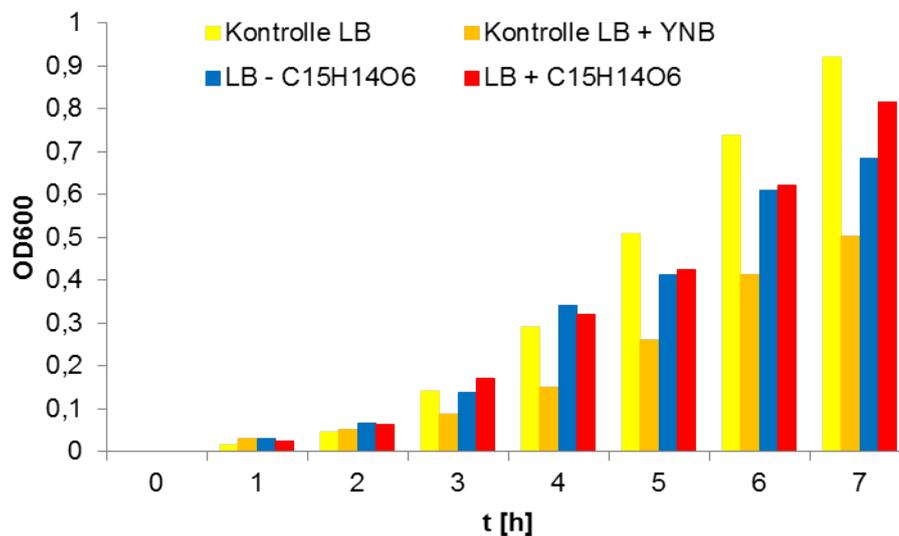


Abbildung 3.34.: Wachstum von *E. coli* in Abwesenheit bzw. Gegenwart von $C_{15}H_{14}O_6$. n=1; Wachstumsbestimmung erfolgte mittels optischer Dichte OD600

3.5.6. Untersuchungen zur möglichen Interaktion zwischen PKS1 und PKS3

$C_{15}H_{14}O_6$ fehlt im Kulturfiltrat von $UK7\Delta PKS1$ und liegt in geringerer Konzentration im Kulturfiltrat von $UK7\Delta PKS3$ vor (Kapitel 3.5.5.1). Dies deutet darauf hin, dass PKS1 und PKS3 möglicherweise miteinander interagieren, was sich eventuell in ihrer Expression zeigt. Daher wurden Expressionsanalysen von *PKS3* bzw. *PKS1 in planta* in $UK7\Delta PKS1$ bzw. $UK7\Delta PKS3$ durchgeführt. Hierfür wurden die Gerstensorten Ingrid (hoch suszeptibel) und Atlas (moderat suszeptibel) mit den entsprechenden Sporen (Titer: $5 \cdot 10^6$) inokuliert und zu den Zeitpunkten 0, 1, 3, 6, 10, 14 und 21 dpi jeweils 5 Blätter als Proben genommen. Anschließend wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die Expression von *PKS3* bzw. *PKS1* durch qRT-PCR bestimmt. Die Ergebnisse der *PKS3*-Expressionsanalysen zeigen, dass die Deletion von *PKS1* kaum Einfluss auf die Expression von *PKS3* nimmt (Abb. 3.35). Lediglich 3 dpi in der Interaktion mit der hoch suszeptiblen Sorte Ingrid ist ein signifikanter Unterschied in der *PKS3*-Expression zwischen $UK7\Delta PKS1$ bzw. Wildtyp UK7 zu verzeichnen (Abb. 3.35a). In der Interaktion mit Atlas ist eine leichte Tendenz zu einer höheren Expression von *PKS3 in planta* in $UK7\Delta PKS1$ im Vergleich zum Wildtyp UK7 zu erkennen (Abb. 3.35b). Die Deletion von *PKS3* hat keinen Einfluss auf die Expression von *PKS1* (Interaktionen mit Ingrid und Atlas, Abbildung 3.36). Trotz der beinahe unveränderten Expressionsprofile von *PKS3* bzw.

PKS1 in *UK7ΔPKS1* bzw. *UK7ΔPKS3* kann eine Interaktion von *PKS1* und *PKS3* weiterhin nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise ist die Interaktion der beiden *PKS* nicht über die Expression von *PKS1* und *PKS3* reguliert.

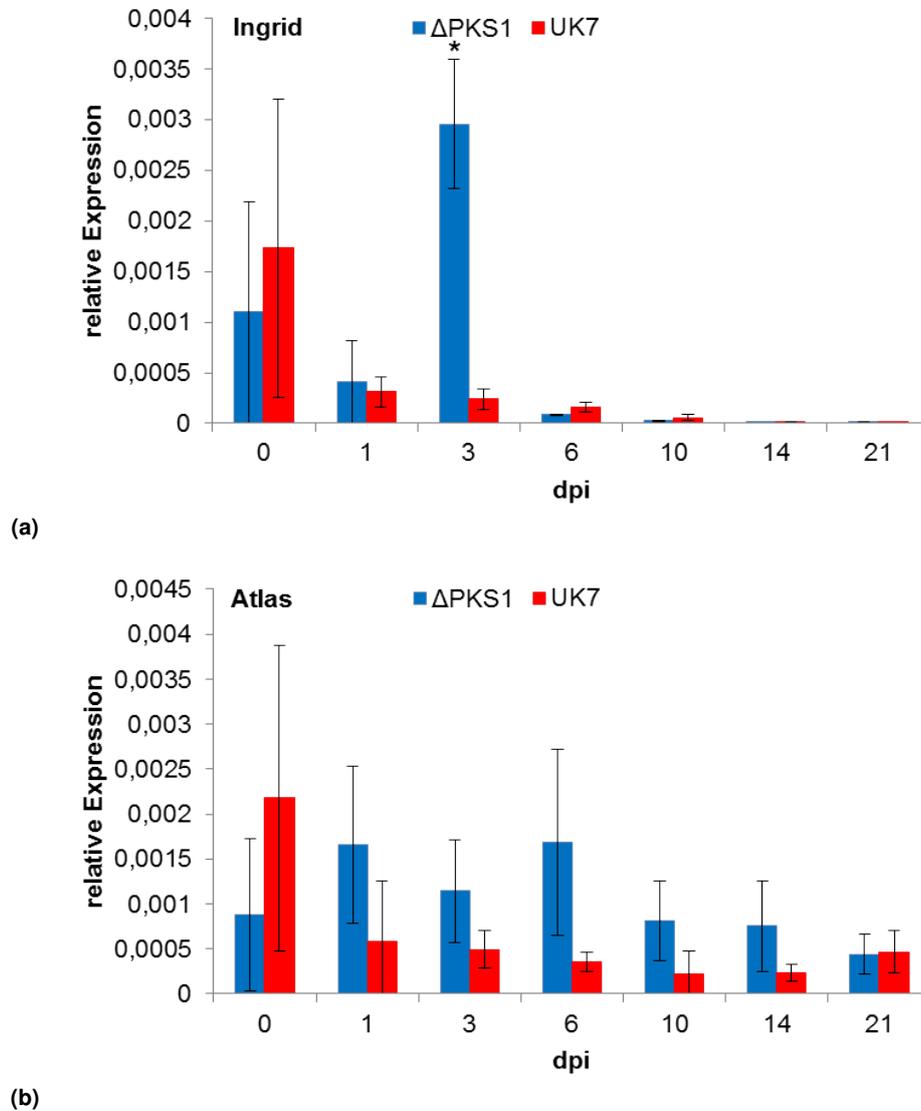
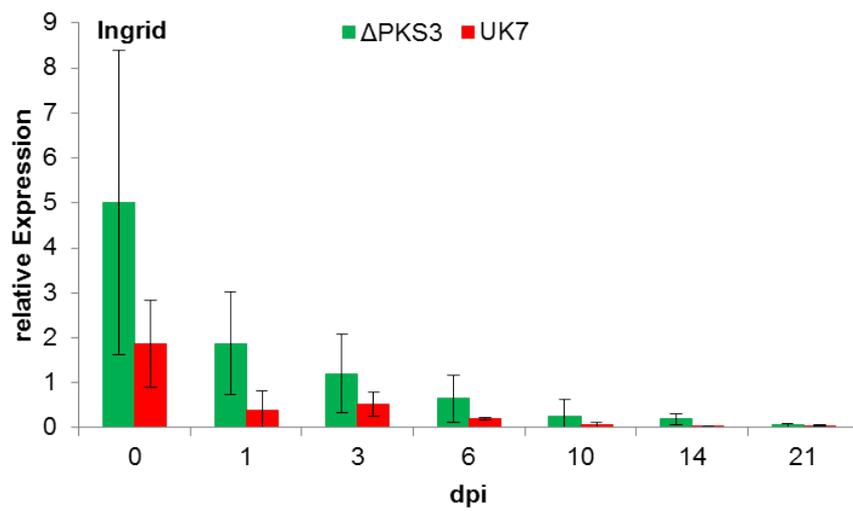
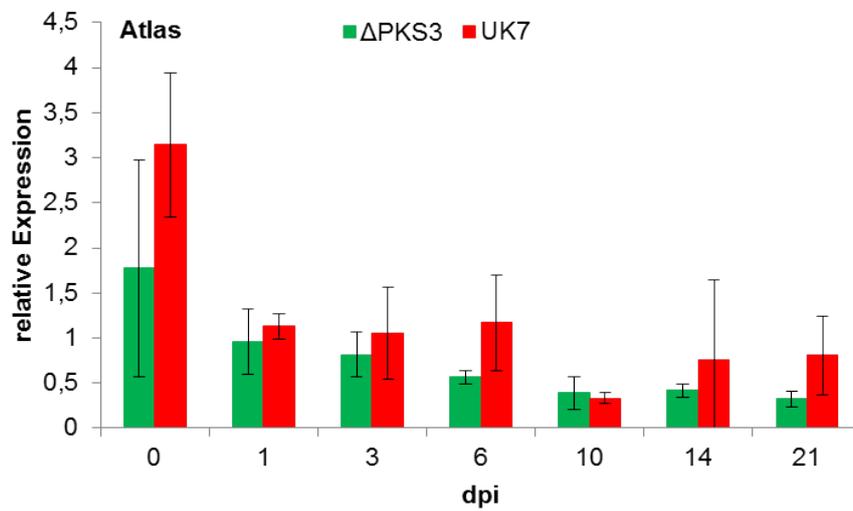


Abbildung 3.35.: *PKS3*-Expression in *UK7ΔPKS1* und Wildtyp *UK7 in planta* während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, (dpi) Tage nach Inokulation, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp *UK7* ermittelt mit t-Test: (*) $p < 0,05$, $n = 4$



(a)



(b)

Abbildung 3.36.: *PKS1*-Expression in UK7 Δ *PKS3* und Wildtyp UK7 *in planta* während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) Interaktion mit der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid, (b) Interaktion mit der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas, (dpi) Tage nach Inokulation, Signifikanz der Abweichung vom Wildtyp UK7 ermittelt mit t-Test: keine Signifikanz, n=4

4. Diskussion

R. commune verursacht die *Rhynchosporium*-Blattfleckenkrankheit der Gerste. Aus *R. commune* bekannte Virulenzfaktoren sind beispielsweise die NIP-Effektoren, die mit dem Kollabieren der Epidermiszellen in Verbindung gebracht werden (Wevelsiep *et al.*, 1991; Kirsten *et al.*, 2012). Die Identifizierung und Charakterisierung weiterer Virulenzfaktoren (zellwandabbauende Enzyme, Effektorproteine und niedermolekulare Substanzen), die möglicherweise eine Rolle in der Interaktion von *R. commune* mit Gerste spielen, war das Ziel der vorliegenden Dissertation. Eine Grundlage zur Auswahl von Genen, die Virulenzfaktoren kodieren, bildete eine EST-Datenbank (A. Navarro-Quezada und W. Knogge, unveröffentlicht). Anhand dieser Datenbank wurden mögliche Effektorgene ausgewählt, die in *R. commune* deletiert werden sollten. Bei den Genprodukten handelt es sich um vier Polyketidsynthasen (PKS), ein zellwandabbauendes Enzym (Pektinmethylesterase, PME), einen Glykosylphosphatidylinositolanker (GPI) und drei Proteine unbekannter Funktion von denen zwei ein N-terminales RxLR-Motiv besitzen und somit möglicherweise mit den RxLR-Effektoren aus Oomyceten vergleichbar sind. Erfolgreich war die Deletion für drei der Polyketidsynthasen (UK7 Δ PKS1, UK7 Δ PKS2, UK7 Δ PKS3), die Pektinmethylesterase (UK7 Δ PME1) und einen der putativen RxLR-Effektoren (UK7 Δ RxP1).

4.1. Das zellwandabbauende Enzym Pektinmethylesterase 1 in der Pflanze-Pathogen-Interaktion

Pektinmethylesterasen (PMEs) sind ubiquitäre Enzyme in Bakterien, Pilzen und Pflanzen, die Pektin degradieren. Die PME's gehören neben den Polygalakturonasen (PGs) und Pektatlyasen (PLs) zu den zellwandabbauenden Enzymen (CWDEs, „cell wall degrading enzymes“), die vor allem von phytopathogenen Organismen sezerniert werden (Valette-Collet *et al.*, 2003; Pelloux *et al.*, 2007). Pektin ist ein Bestandteil der pflanzlichen Zellwand, besonders der Mittellamelle. Es ist ein Polysaccharid, das überwiegend aus Galakturonsäuremolekülen aufgebaut ist. Diese sind α -1,4-glykosidisch verknüpft und bilden das Rückgrat des Pektins. Die Galakturonsäureeinheiten sind teilweise methyliert (Valette-Collet *et al.*, 2003). Der Methylierungsgrad beeinflusst die mechanischen Eigenschaften der Zellwand und wird durch pflanzeigene PME's bestimmt. Beispielsweise nimmt der Grad der Methylierung während der Fruchtreifung ab (Lionetti *et al.*, 2012), damit PGs und PLs die Zellwanddicke der Früchte verringern können (Wakabayashi *et al.*, 2003; Giovannoni, 2004). Phytopathogene Organismen sezernieren CWDEs (PMEs, PGs und PLs), um die pflanzliche Zellwand zu destabilisieren

und abzubauen. Daraus folgend ist es den Pathogenen möglich, die Pflanze leichter zu besiedeln bzw. zu penetrieren (Pelloux *et al.*, 2007). Pektinmethylesterasen demethylieren Pektin. Dabei entsteht unter anderem Polygalakturonsäure, die durch PGs und PLs weiter abgebaut wird (Valette-Collet *et al.*, 2003). Bisherige Untersuchungen bezüglich der pektinabbauenden Enzyme wurden größtenteils an PGs vorgenommen. Verschiedene Beispiele zeigen, dass die Deletion von PGs oder PLs in phytopathogenen Organismen entweder einen Einfluss oder keinen Einfluss auf die Virulenz nimmt. Daraus wird geschlossen, dass CWDEs verschiedene Rollen während der Pathogenese spielen (Isshiki *et al.*, 2001). Die Deletionen von *pnIA* (PL aus *Glomerella cingulata*, Bowen *et al.*, 1995), *enpg-1* (PG aus *Cryphonectria parasitica*, Gao *et al.*, 1996) bzw. *PGX1* (PG aus *Cochliobolus carbonum*, Scott-Craig *et al.*, 1998) führten zu keiner Veränderung der Virulenz der phytopathogenen Pilze. Weiterhin führt die Deletion einer PG in *Alternaria citri* zu reduzierter Virulenz, die Deletion des gleichen Gens in *A. alternata* hat hingegen keinerlei Einfluss auf die Pathogenität (Isshiki *et al.*, 2001). Durch Erstellung von Doppelmutanten der PGs cpPG1 und cpPG2 in *Claviceps purpurea* wurden Mutanten erhalten, die auf dem Wirt Roggen apathogen sind (Oeser *et al.*, 2002). Durch Expression einer PL aus *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* wird eine höhere Virulenz erreicht. Diese Beispiele zeigen, wie unterschiedlich der Einfluss der einzelnen CWDEs auf die Pflanze-Pathogen-Interaktion sein kann (Isshiki *et al.*, 2001).

Der Verlust von *PME1* in *B. cinerea* führt zu einer reduzierten Virulenz auf verschiedenen Wirtspflanzen (Apfel, Weintraube, *Arabidopsis thaliana*, Valette-Collet *et al.*, 2003). Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *PME1* und *PME2* keinerlei Einfluss auf die Virulenz von *B. cinerea* hat (Tomate, Weintraube, Birne, Kars *et al.*, 2005). Der Unterschied in den beiden experimentellen Ansätzen besteht in den Wildtypisolaten von *B. cinerea*, die zur Deletion der *PME*-Gene verwendet wurden (Valette-Collet *et al.*, 2003; Kars *et al.*, 2005). Die Ergebnisse deuten auf eine Vielfalt innerhalb der *PME*-Gene in verschiedenen *B. cinerea*-Isolaten hin (Kars *et al.*, 2005). Beispielsweise könnte die *PME3 in planta* die Funktion von *PME1* und *PME2* übernehmen, wenn diese nicht funktionell sind (Kars *et al.*, 2005).

Durch *in-silico*-Analysen konnten auch in *R. commune* fünf *PME*-kodierende Gene identifiziert werden. *PME1-5* besitzen Signalpeptide, die zwischen 17 und 23 Aminosäuren umfassen (Wang, 2013). Die Aminosäuresequenzen von *PME1-4* umfassen bis zu 360 Aminosäuren während *PME5* mit 1560 Aminosäuren fast fünfmal so groß ist. Weiterhin konnte durch *in-silico*-Analysen gezeigt werden, dass *PME1-4* jeweils eine Esterase-Domäne beinhalten. *PME5* besitzt dagegen vier Esterase-Domänen (Wang, 2013). Pektinmethylesterasen besitzen keine typische katalytische Triade (Ser-His-Asp), sondern zwei Aspartatreste im aktiven Zentrum, die auch in den Aminosäuresequenzen der Esterase-Domänen aus *PME1-5* vorhanden sind (Wang, 2013). Die Aspartatreste sind nukleophil und der Mechanismus ähnelt einer allgemeinen Säure-Base-Katalyse (Jenkins *et al.*, 2001; Fries *et al.*, 2007). Der aufgeklärte *PME*-Mechanismus aus dem Bakterium *Erwinia chrysanthemi* ist auf die pilzlichen *PMEs*

übertragbar, da sich auch in dieser PME zwei Aspartatreste innerhalb der Esterase-Domäne befinden (Jenkins *et al.*, 2001; Fries *et al.*, 2007).

PMEs können auf unterschiedliche Weisen die Demethylierung von Pektin vornehmen. Dabei wird zwischen folgenden Strategien unterschieden: (1) die Entfernung sämtlicher Methylierungen, (2) die Entfernung einer bestimmten Anzahl an Methylierungen und (3) die Demethylierung eines einzigen Galakturonsäuremoleküls (van Alebeek *et al.*, 2003; Fries *et al.*, 2007). PME5 aus Pilzen führen die Demethylierung an nur einem Galakturonsäuremolekül durch, bevor sie dissoziieren und an anderer Stelle eine weitere Demethylierung vornehmen (Strategie 3, Fries *et al.*, 2007). Für PME5, die 4 Esterasedomänen beinhaltet, wäre es daher denkbar, dass vier Galakturonsäurereste mittels einer katalysierten Reaktion demethyliert werden können und so die Destabilisierung der pflanzlichen Zellwand schneller durchgeführt werden kann.

Weitere *in-silico*-Analysen ergaben, dass für PME1-4 Homologe in den Genomen von *R. commune* AU2, *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* vorhanden sind. PME5 fehlt allerdings im Genom von *R. orthosporum*. Eventuell ist dieses im Laufe der Entwicklung der *Rhynchosporium*-Arten verloren gegangen, da es möglicherweise zur Besiedlung der *R.-orthosporum*-Wirtspflanzen nicht benötigt wird.

Zur Untersuchung des Einflusses von PME1-5 aus *R. commune* in der Pflanze-Pathogen-Interaktion wurde die Expression der *PMEs in planta* (zwei verschiedene Gerstensorten) überprüft. Für *PME5* konnte gezeigt werden, dass sie wesentlich niedriger als die anderen vier *PMEs* exprimiert wird. Es wäre denkbar, dass *PME5* für *R. commune* in der Interaktion mit Gerste eine eher untergeordnete Rolle spielt bzw. dass eine höhere Expression erfolgt, wenn *R. commune* auf andere Gerstensorten trifft.

Sämtliche *PMEs* zeigen auf der hoch suszeptiblen Gerstensorte ab 10 dpi keine nennenswerte Expression mehr. Daher wird angenommen, dass sie eher zu Beginn der Infektion eine Rolle spielen, wenn der Pilz die Pflanze penetriert. Die *PMEs* zeigen auf der moderat suszeptiblen Sorte auch 10, 14 und 21 dpi noch Expression. Die *PME*-Transkripte liegen anscheinend schon in den Sporen vor, was darauf hinweist, dass diese Enzyme direkt nach Inokulation sezerniert werden, um ein schnelles Eindringen in die Wirtspflanze zu ermöglichen. Aufgrund der Expressionsprofile von *PME1-4* könnte es sein, dass *PME1+4* zu Beginn der Infektion einen größeren Einfluss haben. Für die spätere Zellwand-Destabilisierung könnten eher *PME2+3* zuständig sein, wobei die vergleichsweise geringe Expression von *PME2* auf einen eher geringen Anteil während der Infektion hinweist. Die Expression der verschiedenen *PMEs* zeigt Unterschiede auf den beiden Gerstensorten. Besonders die *PME4*-Expression ist auf der moderat suszeptiblen Gerstensorte Atlas größer als auf der hoch suszeptiblen Gerstensorte Ingrid. Eventuell wirkt Atlas (moderat suszeptibel) der Destabilisierung der Zellwand mittels Inhibitoren entgegen.

Pektinmethylesteraseinhibitoren (PMEIs) sind aus Pflanzen bekannt (Juge, 2006). Es kann-

te allerdings gezeigt werden, dass pflanzliche PMEIs nur mit pflanzlichen PMEs interagieren. Bisher konnte keine Interaktion von pflanzlichen PMEIs mit PMEs aus Phytopathogenen nachgewiesen werden (D'Avino *et al.*, 2003; Giovane *et al.*, 2004; Juge, 2006; Jolie *et al.*, 2009). Es gibt daher die Annahme, dass bei einem Pathogenbefall die *PMEI*-Expression in der Pflanze angeschaltet wird, um die pflanzlichen PMEs daran zu hindern den Methylierungsgrad der Zellwand zu verringern. Denn die Verringerung des Methylierungsgrades der Zellwand durch pflanzliche PMEs würde dem Pathogen den Befall erleichtern (Juge, 2006). Die Zahl an PMEIs in den in dieser Arbeit verwendeten Gerstensorten ist unbekannt. Es kann daher nur vermutet werden, dass die PMEIs in der moderat suszeptiblen Sorte einen größeren Einfluss, als in der hoch suszeptiblen Sorte haben. Durch die Regulierung der pflanzeigenen PMEs mit Hilfe von PMEIs könnte die Pflanze eine zu schnelle Besiedelung verhindern, was mit einer höheren und über die Zeit längeren Expression der pilzlichen PMEs einhergeht.

Die Deletion von *PME1* in *R. commune* führt im Vergleich zum Wildtyp zu einer verzögerten Symptomausbildung (Wang, 2013). Dies war ein erster Hinweis auf eine reduzierte Virulenz des Pilzes, wie in *B. cinerea* (Valette-Collet *et al.*, 2003). Allerdings zeigt sich *in planta* im Vergleich von UK7 Δ *PME1* mit Wildtyp UK7 eine größere Produktion an Pilzbiomasse (Wang, 2013). Die Deletion von *PME1* führt demnach zu einer verzögerten Symptomausbildung bei gleichzeitig schnellerem Wachstum *in planta*. Es wäre denkbar, dass die biotrophe Phase von *R. commune* länger andauert und daraus folgend die Symptome schwächer bzw. verzögert erscheinen. Denkbar wäre weiterhin, dass *PME1* durch die Pflanze erkannt wird, was zu Abwehrreaktionen auf Pflanzenseite führt und gleichzeitig Prozesse im Pilz in Gang setzt, die den Übergang von biotroph zu nekrotroph unterstützen. Fehlt *PME1* unterbleibt die Erkennung, der Pilz wächst länger und schneller biotroph, ohne einen Zusammenbruch der Epidermis- und Mesophyllzellen hervorzurufen. So könnten verringerte Symptome bei gleichzeitig erhöhter Biomasse *in planta* erklärt werden. Bisher gibt es wenig Informationen darüber, wie der Übergang vom biotrophen in den nekrotrophen Status stattfindet. Dufresne *et al.* (2000) konnten ein Protein identifizieren, dass in den Prozess vom Übergang der biotrophen in die nekrotrophe Phase in *Colletotrichum lindemuthianum* involviert ist. Auch für *Moniliophthora perniciosa* konnte ein Protein identifiziert werden, dass während der biotrophen Entwicklung eine Rolle spielt und gleichzeitig den Übergang in die nekrotrophe Phase reguliert (alternative Oxidase, AOX, Thomazella *et al.*, 2012). Welche Effektoren für den Übergang von der biotrophen Phase in die nekrotrophe Phase in *R. commune* eine Rolle spielen, ist nicht bekannt. Daher kann derzeit über den Einfluss von *PME1* während dieses Übergangs nur spekuliert werden.

PME1 aus *R. commune* hat einen Einfluss während der Pathogenese. Allerdings ist dieser nicht vergleichbar mit dem Effekt, den die Deletion von *PME1* in *B. cinerea* auslöst (Valette-Collet *et al.*, 2003). Ein möglicher Grund ist, dass *R. commune* insgesamt fünf *PME*-Gene besitzt und damit eventuell eine Redundanz in der *PME*-Funktion vorliegt. Es wäre denkbar, dass *PME2-5*, die Deletion von *PME1* komplementieren können. Einen Hinweis sollte die Ex-

pression von *PME2-5* in *UK7ΔPME1 in planta* geben (Wang, 2013). Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass sich die Expression von *PME2-5* signifikant ändert (Wang, 2013), wenn *PME1* deletiert ist. Um die mögliche Redundanz von *PME1-5* zu untersuchen ohne Doppel-, Tripel-, Quadrupel- und Quintupelmutanten zu erstellen, werden derzeit *PME*-RNAi-Linien erstellt in denen die Transkriptmengen aller *PMEs* gleichzeitig reduziert werden sollen (D. Penselin und W. Knogge, unveröffentlicht).

Neben der Komplementation der Deletion von *PME1* durch die anderen *PMEs* wäre es möglich, dass *R. commune* die Expression von PGs und PLs erhöht, um penetrieren zu können. PGs und PLs sind nicht in der Lage, methyliertes Pektin abzubauen. Allerdings ist auch nicht jedes Galakturonsäuremolekül des Pektins methyliert, wodurch auch PGs und PLs zum Zellwandabbau beitragen (Valette-Collet *et al.*, 2003; Juge, 2006). Eine Untersuchung bezüglich der PGs und PLs fand im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht statt. In weiterführenden Arbeiten bezüglich der Charakterisierung der *UK7ΔPME1* sollte die Expression von PGs und PLs *in planta* überprüft werden, um zu klären, ob der Phänotyp von *UK7ΔPME1* möglicherweise durch eine Überexpression dieser Gene hervorgerufen wird.

4.2. Das *Rhynchosporium*-RxLR-Protein 1 und seine Wirkung als Effektorprotein

RxLR-Effektoren sind sezernierte Proteine aus *Phytophthora* spp., die in die Pflanzenzellen transloziert werden (Whisson *et al.*, 2007). Hierfür ist ein N-terminales RxLR-Motiv gefolgt von einem dEER-Motiv notwendig (Bozkurt *et al.*, 2012). In phytopathogenen Pilzen konnten bisher nur RxLR-ähnliche Proteine identifiziert werden, die in die Wirtspflanze transloziert werden (Gu *et al.*, 2011; Tyler *et al.*, 2013). Ein Beispiel ist Ps87 aus *Puccinia striiformis*, für das die Translokation in die Wirtszellen nachgewiesen werden konnte (Gu *et al.*, 2011). In *R. commune* konnten auf Grundlage einer EST-Datenbank (A. Navarro-Quezada und W. Knogge, unveröffentlicht) putative RxLR-ähnliche Proteine abgeleitet werden. Eines dieser Proteine ist RxP1 (*Rhynchosporium*-RxLR-Protein 1). Die relative Expression von *RxP1 in planta* zeigt vergleichsweise niedrige Werte (10^{-2}) auf beiden verwendeten Gerstensorten (hoch bzw. moderat suszeptibel, Matern, 2011). Die Expression auf der moderat suszeptiblen Pflanze ist im Vergleich zur hoch suszeptiblen Sorte höher (Matern, 2011). Weiterhin ist festzustellen, dass die Expression zu frühen Zeitpunkten (0 bzw. 1 dpi) am stärksten ist (beide Sorten, Matern, 2011).

An den Positionen 51 bis 54 der Aminosäuresequenz von RxP1 befindet sich ein RSLR, das dem RxLR-Motiv aus *Phytophthora*-Effektoren entspricht. Weiterhin befindet sich an den Positionen 108 bis 110 ein EER-Motiv (Matern, 2011). Das RxLR-EER-Doppelmotiv ist beispielsweise für die Translokation des Effektors Avr3a aus *P. infestans* in die Wirtszellen verantwortlich (Whisson *et al.*, 2007). Das gefundene RSLR-EER-Doppelmotiv ist ein Hinweis, dass es sich bei RxP1 um einen Effektor handeln könnte, der in die Pflanzenzellen transloziert

wird. Dafür muss RxP1 zunächst sezerniert werden. Allerdings konnte mit Hilfe des SignalP-Algorithmus kein klassisches Signalpeptid identifiziert werden (Petersen *et al.*, 2011). Weitere *in-silico*-Analysen ergaben, dass RxP1 möglicherweise über einen weitgehend unverständlichen Mechanismus der unkonventionellen Sekretion sezerniert wird (Nickel, 2003; Bendtsen *et al.*, 2005; Prudovsky *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 2008; Nickel und Rabouille, 2009; Matern, 2011). Für die unkonventionelle Sekretion wird kein klassisches Signalpeptid benötigt. Allerdings konnte mit Hilfe eines bakteriellen Systems zur Überprüfung der Funktionalität von Signalpeptiden gezeigt werden, dass die ersten 15 Aminosäuren des Proteins im bakteriellen Testsystem als Sekretionssignal fungieren. Zur Untersuchung, ob RxP1 tatsächlich durch *R. commune* sezerniert wird, wurde ein Fusionsprotein bestehend aus RxP1 und dem rot fluoreszierenden Protein mCherry in *R. commune* exprimiert. Die Ergebnisse geben erste Hinweise, dass RxP1 möglicherweise sezerniert wird. Weitere Experimente sollen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei RxP1 tatsächlich um ein sezerniertes Molekül handelt. Eine Translokation in die Pflanzenzelle, wie es bei PWL2 aus *Magnaporthe oryzae* der Fall ist (Khang *et al.*, 2010), kann für RxP1 derzeit weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Weiterhin ist unklar, ob das RSLR-EER-Motiv in RxP1 ein Signal zur Translokation in die Pflanzenzelle darstellt bzw. ob RxP1 überhaupt in die Pflanzenzelle transloziert wird oder ein apoplastisch wirkender Effektor ist. In weiterführenden Arbeiten sollte zunächst ein verkürztes RxP1 mit mCherry fusioniert werden (ohne die kodierende Sequenz für die 15 N-terminalen Aminosäuren), um zu zeigen ob die 15 N-terminalen Aminosäuren des RxP1 *in vivo* als Sekretionssignal wirken, wie es die Ergebnisse aus dem bakteriellen System zeigen. Weiterhin soll das RSLR-EER-Motiv mutiert werden, um einen möglichen Einfluss auf die Translokation zu sehen. Der Austausch der Aminosäuren RxLR-EER im Effektor Avr3a aus *P. infestans* führt zu Mutanten, die virulenter auf Pflanzen sind, die das *R3a*-Gen besitzen. Das pflanzliche R3a erkennt Avr3a des Pathogens. Durch die Erkennung werden Abwehrmechanismen in Gang gesetzt. Ist Avr3a mutiert unterbleibt die Erkennung durch R3a. Daraus folgend sind die Mutanten virulent (Whisson *et al.*, 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unverändertes Avr3a sowie sämtliche RxLR-EER-Mutanten keine Unterschiede in ihrer Virulenz auf Pflanzen zeigen, die kein *R3a* besitzen (Whisson *et al.*, 2007).

Die Deletion von *RxP1* führt zu einer wesentlich schnelleren und stärkeren Ausbildung der Symptome sowie zu einer deutlich gesteigerten Pilzbiomasse *in planta* (Matern, 2011). Das heißt UK7 Δ *RxP1* zeigt eine höhere Virulenz als der Wildtyp UK7. Na *et al.* (2013) konnten in *P. sojae* zeigen, dass durch Deletion von *Avr1d* die Virulenz erhöht wird, wenn die Pflanzen das *Rps1d*-Gen besitzen. Bei *Rps1d* handelt es sich um das korrespondierende *R*-Genprodukt von *Avr1d*. Fehlt eines der beiden Genprodukte unterbleibt die Erkennung von *P. sojae* durch die Pflanze und es kommt zur Infektion. Es ist derzeit nicht bekannt, ob RxP1 von der Pflanze als Avr-Protein erkannt wird und so Abwehrmechanismen in Gang gesetzt werden, die bei Fehlen von RxP1 unterdrückt bleiben.

4.3. Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus und seine mögliche Wirkung in der Pflanze-Pathogen-Interaktion

4.3.1. *In-silico*-Analysen und Expressionsanalysen *in planta*

Durch *in-silico*-Analysen konnten im Genom von *R. commune* (Isolat UK7) 10 *PKS*-, vier *NRPS*- und drei *PKS-NRPS*-Gene identifiziert werden, deren Expression *in planta* in zwei verschiedenen Gerstensorten bestimmt wurde. Weiterhin wurden eine Sesquiterpencyclase (Sesqui-TC) und drei Dimethylallyltryptophansynthasen (DMATS) gefunden. Beim Vergleich der Genome der anderen *Rhynchosporium*-Isolate bzw. -Arten konnten kleinere Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 4.1). Beispielsweise besitzt das *R. commune*-Isolat AU2 jeweils ein *PKS*- und *NRPS*-Gen (*PKS14* und *NRPS5*) mehr als das *R. commune*-Isolat UK7, während in *R. secalis* und *R. agropyri* eine *PKS-NRPS* fehlt (*PKS13*, Tab. 4.1). Im Genom von *R. orthosporum* finden sich die Homologen für sieben *PKS*-, drei *NRPS*-Gene und zwei *DMATS*-Gene. Zusätzlich besitzt *R. orthosporum* das Gen für eine der in *R. commune* identifizierten *PKS-NRPS* (*PKS1*) plus eine weitere, die sich nur im Genom von *R. orthosporum* finden lässt (*PKS15*, Tab. 4.1).

Die Anzahl der in den *Rhynchosporium*-Arten vorhandenen *PKS*-, *NRPS*- und *PKS-NRPS*-Gene ist vergleichbar mit denen in verschiedenen *Fusarium*-Spezies. Die Anzahl beträgt in *F. graminearum* 13, 12, 2 (*PKS*, *NRPS*, *PKS-NRPS*), in *F. oxysporum* 11, 8, 3 und in *F. verticillioides* 12, 10, 4 (Collemare *et al.*, 2008a). *Magnaporthe grisea* besitzt eine höhere Anzahl an *PKS*, *NRPS* und *PKS-NRPS* (22, 8, 10, Collemare *et al.*, 2008a). Der obligat biotrophe Pilz *Ustilago maydis* besitzt im Vergleich dazu nur drei *PKS*-Gene und drei *NRPS*-Gene (Collemare *et al.*, 2008a). *PKS-NRPS*-Hybride konnten bisher nur in Ascomyceten identifiziert werden. Weiterhin besitzen hemibiotrophe und nekrotrophe Pathogene eine größere Anzahl an *PKS*- und *NRPS*-Genen als biotrophe Pilze. Dies ist ein Hinweis darauf, dass hemibiotrophe und nekrotrophe Pilze im Vergleich zu biotrophen Pilzen ein wesentlich größeres Repertoire an Sekundärmetaboliten stellen können (Collemare *et al.*, 2008a).

In-silico-Analysen bezüglich der in den *PKS* und *PKS-NRPS* befindlichen Domänen ergaben, dass sich in den Genomen der *Rhynchosporium*-Arten nur eine *PKS* befindet, die keinerlei reduzierende Domänen besitzt (*PKS3*, Abb. 4.1a). Solche *PKS* werden als nicht-reduzierende *PKS* bezeichnet (Khosla und Harbury, 2001).

Es sind Kooperationen von *PKS* bekannt, in denen zwei *PKS* gemeinsam ein Molekül synthetisieren. Asperfuranon wird in *Aspergillus nidulans* durch zwei verschiedene *PKS* synthetisiert, von denen eine nicht-reduzierend ist (Chiang *et al.*, 2009). Die Synthese von Zearalenon in *Gibberella zeae* wird beispielsweise von zwei *PKS* durchgeführt, und auch in diesem Beispiel handelt es sich um eine nicht-reduzierende und eine reduzierende *PKS* (Kim *et al.*, 2005). Die Synthese von Botzinsäure in *B. cinerea* benötigt beispielsweise zwei reduzierende *PKS* (Dalmats *et al.*, 2011). Das gleiche gilt für die Synthese von T-Toxin in *Cochliobolus heterostrophus*

Tabelle 4.1.: Übersicht über die in *R. commune*, *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* vorhandenen Gene für PKS (PKS-NRPS-Hybride sind in Klammern angegeben), NRPS, Sesqui-TC und DMATS. Vorhandene Gene sind grau hinterlegt, (Rc UK7 und AU2) *R. commune* (Isolate UK7 und AU2, Lehnackers und Knogge, 1990), (Rs) *R. secalis* (Isolat RS02CH-6a.1, Zaffarano *et al.*, 2008), (Ra) *R. agropyri* (Isolat RS04CH-RacA.6.1, bereitgestellt durch Prof. B. McDonald, ETH Zürich), (Ro) *R. orthosporum* (Isolat RS04CH-BärA.1.1.3, bereitgestellt durch Prof. B. McDonald, ETH Zürich), (NR-PKS) nicht reduzierende PKS

Gen	Rc UK7	Rc AU2	Rs	Ra	Ro
PKS1 (PKS-NRPS)					
PKS2					
PKS3 (NR-PKS)					
PKS4					
PKS5					
PKS6					
PKS7					
PKS8					
PKS9					
PKS10					
PKS11 (PKS-NRPS)					
PKS12					
PKS13 (PKS-NRPS)					
PKS14					
PKS15 (PKS-NRPS)					
PKS (PKS-NRPS) gesamt	10 (3)	11 (3)	10 (2)	10 (2)	7 (2)
NRPS1					
NRPS2					
NRPS3					
NRPS4					
NRPS5					
NRPS gesamt	4	5	4	4	3
Sesqui-TC					
Sesqui-TC gesamt	1	1	1	1	1
DMATS1					
DMATS2					
DMATS3					
DMATS gesamt	3	3	3	3	2

(Baker *et al.*, 2006). Hypothemycin in *Hypomyces subiculosus* und Radicol in *Pochonia chlamydosporia* werden wiederum von jeweils einer nicht-reduzierenden und einer reduzierenden PKS synthetisiert (Zhou *et al.*, 2010a,b). Die Kooperation zwischen PKS kann also gleichermaßen zwischen nicht-reduzierenden und reduzierenden PKS wie auch zwischen reduzierenden PKS untereinander vorkommen (Kim *et al.*, 2005; Baker *et al.*, 2006; Chiang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010b,a; Dalmais *et al.*, 2011).

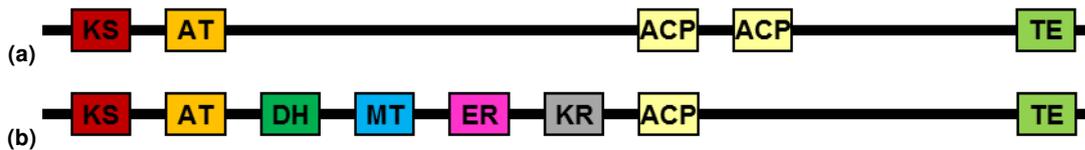


Abbildung 4.1.: Schematische Darstellung der Domänenstruktur einer nicht-reduzierenden (PKS3) und reduzierenden PKS (PKS6) aus *Rhynchosporium* spp. (a) PKS3, nicht-reduzierende PKS, (b) PKS6, reduzierende PKS, (KS) β -Ketoacylsynthase, (AT) Acyltransferase, (DH) Dehydratase, (MT) Methyltransferase, (ER) Enoylreduktase, (KR) β -Ketoreduktase, (ACP) Acyl Carrier Protein, (TE) Termination, TE-Domänen im Einzelnen: PKS3: Thioesterase, PKS6: O-Acyl-Transferase

Die Kooperation zweier PKS kann konvergent oder sequentiell stattfinden. Sequentiell bedeutet, dass eine PKS das Substrat für eine zweite PKS synthetisiert (Crawford *et al.*, 2006; Chooi und Tang, 2012). Bei einer konvergenten Zusammenarbeit werden die Produkte zweier PKS zu einem Molekül kondensiert (Xie *et al.*, 2009; Chooi und Tang, 2012). Fehlende Terminationsdomänen wie in PKS2, PKS5, PKS7, PKS9, PKS10 und PKS13 von *R. commune* (Abb. 4.2) geben Hinweise auf eine konvergente oder sequentielle Kooperation zweier PKS, da hier das entstehende Molekül für eine nachfolgende PKS bzw. zur Kondensation zur Verfügung stehen soll (Chooi und Tang, 2012).

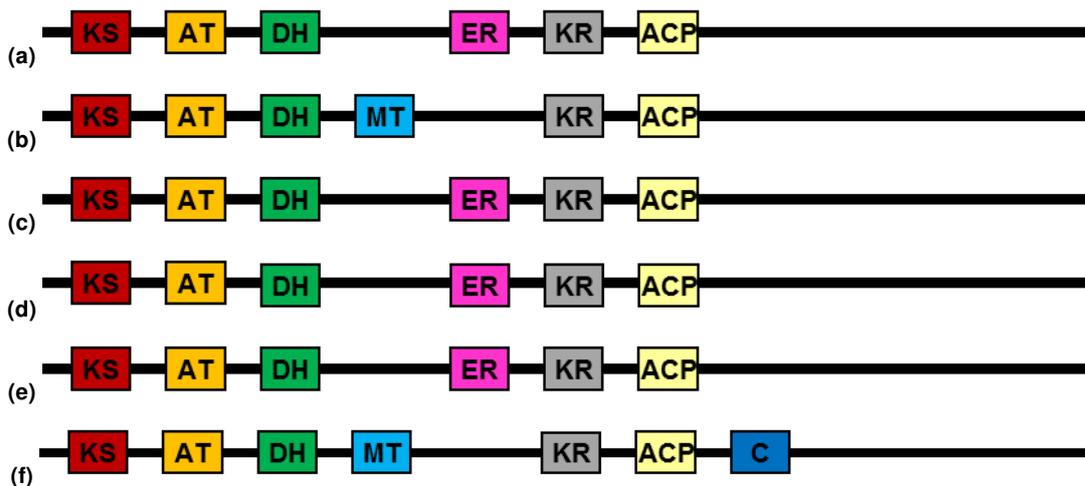


Abbildung 4.2.: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der PKS ohne Terminationsdomäne aus *Rhynchosporium* spp. (a) PKS2, (b) PKS5, (c) PKS7, (d) PKS9, (e) PKS10, (f) PKS13, (KS) β -Ketoacylsynthase, (AT) Acyltransferase, (DH) Dehydratase, (MT) Methyltransferase, (ER) Enoylreduktase, (KR) β -Ketoreduktase, (ACP) Acyl Carrier Protein, (C) Kondensation

Der Transfer des von einer PKS gebildeten Moleküls erfolgt typischerweise durch eine Acyltransferase. Diese kann sich als Terminationsdomäne innerhalb der PKS befinden oder als zusätzliches Enzym im Biosyntheseweg liegen (Chooi und Tang, 2012; Xie *et al.*, 2009). PKS6 aus *R. commune* (Abb. 4.1b) besitzt beispielsweise eine O-Acyl-Transferase als Terminationsdomäne. Dies könnte bedeuten, dass das PKS6-Produkt auf eine andere PKS übertragen wird. Die Expression von *PKS6* *in planta* findet zu frühen Zeitpunkten während der Pathoge-

nese statt, wobei die Expression in der moderat suszeptiblen Gerstensorte höher ist als in der hoch suszeptiblen Sorte. Da einige weitere *PKS* aus *R. commune in planta* ein ähnliches Expressionsprofil zeigen, liefern die Expressionsprofile keinen Hinweis auf die „Ziel“-*PKS*. Eine weitere Möglichkeit zum Transfer bietet die Interaktion zwischen ACP und KS-Domäne (Chooi und Tang, 2012). *PKS3* besitzt als einzige *PKS* in *R. commune* zwei ACP (Abb. 4.1a). Es wäre denkbar, dass das zweite ACP ein weiteres Molekül aufnimmt und mit dem *PKS3*-Produkt kondensiert. Da es sich bei *PKS3* um die einzige nicht-reduzierende *PKS* in *R. commune* handelt, wäre es denkbar, dass sie in verschiedenen Biosynthesewegen involviert ist. Die *PKS3*-Expression ist vergleichsweise gering und findet besonders zu frühen Zeitpunkten in der Pathogenese statt (hoch und moderat suszeptible Gerstensorte).

PKS12 besitzt als einzige *PKS* in *R. commune* vor seiner KS-Domäne noch eine zusätzliche Domäne plus ein zusätzliches ACP (Abb. 4.3). Bei dieser Domäne handelt es sich um die Adenylatbildende Domäne („Adenylate Forming Domain“, AFD, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Diese Domäne aktiviert unter ATP-Verbrauch ein Carboxylat, dass auf das ACP übertragen wird. Es ist anzunehmen, dass dieses Carboxylat das Startermolekül für *PKS12* ist. Bei keiner anderen *PKS* aus *R. commune* konnte eine solche Domäne vor der KS-Domäne gefunden werden, so dass davon ausgegangen wird, dass die Startermoleküle von anderen Enzymen auf das ACP in der *PKS* übertragen werden. Weiterhin wäre es auch für *PKS12* denkbar, dass das durch die AFD eingebrachte Carboxylat mit dem durch *PKS12* synthetisierten Molekül kondensiert wird und durch die Thioesterase (TE der *PKS12*) vom ACP abgespalten wird. Sequenzvergleiche (blastp, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009) ergaben auch in anderen phytopathogenen Pilzen *PKS*, die vor der KS-Domäne eine AFD und ein ACP besitzen. Diese konnten bspw. in *C. cochliobolus* (AAR90278, Kroken *et al.*, 2003), *Bipolaris sorokiniana* (EMD60240, Ohm *et al.*, 2012) und *A. niger* (CAK42046, Pel *et al.*, 2007) identifiziert werden.



Abbildung 4.3.: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von *PKS12* aus *Rhynchosporium* spp.
 (AFD) Adenylatbildende Domäne, (ACP) Acyl Carrier Protein, (KS) β -Ketoacylsynthase, (AT) Acyltransferase, (DH) Dehydratase, (KR) β -Ketoreduktase, (TE) Termination, Terminationsdomäne *PKS12*: Thioesterase

Die Terminationsdomänen der *PKS* in *R. commune* umfassen Oxidoreduktasen („short chain dehydrogenase/reductase“, SDR, Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009, *PKS1*, *PKS8*, *PKS11* und *RoPKS15*) sowie eine Esterase (*PKS4*), zwei Thioesterasen (*PKS3* und *PKS12*) und eine O-Acyltransferase (*PKS6*). Zu den Reaktionen, die von Oxidoreduktasen der SDR-Familie katalysiert werden, gehören unter anderem die Isomerisierung, Epimerisierung, Decarboxylierung und die Reduktion von C=N-Bindungen (Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009). In den oben erwähnten Beispielen von Radicalol und Hypothemycin besitzt jeweils die beteiligte nicht-reduzierende *PKS* eine Termini-

onsdomäne (in beiden Fällen: Thioesterase; Zhou *et al.*, 2010a,b).

PKS13 gehört zu den in *R. commune* identifizierten PKS-NRPS-Hybriden. Allerdings konnte weder eine Adenylierungsdomäne (A), noch ein PCP gefunden werden (Abb. 4.2f). Daher wird derzeit davon ausgegangen, dass nur der PKS-Teil des PKS-NRPS-Hybrids aktiv ist. Auch in anderen Pilzen konnten PKS-NRPS mit einem verkürzten NRPS-Teil identifiziert werden, zum Beispiel in *A. clavatus* (XP_001274946, Fedorova *et al.*, 2008) und *M. oryzae* (XP_003715689, ELQ41993, Dean *et al.*, 2005; Xue *et al.*, 2012; Marchler-Bauer und Bryant, 2004; Marchler-Bauer *et al.*, 2009). Da verkürzte PKS-NRPS-Versionen auch in anderen Organismen identifiziert wurden und nicht davon ausgegangen wird, dass sämtliche verkürzte PKS-NRPS unfunktionell sind, kann für *PKS13* postuliert werden, dass auch dieses Gen ein funktionelles Produkt exprimiert. Die Expression von *PKS13* kann *in planta* nachgewiesen werden. Allerdings gibt es Unterschiede in der Expression beim Vergleich von hoch und moderat suszeptibler Gerstensorte. Die *PKS13*-Expression ist auf der moderat suszeptiblen Sorte wesentlich höher und mehr oder weniger gleichbleibend über die gesamte gemessene Zeit (0 bis 21 dpi). Während die *PKS13*-Expression in der hoch suszeptiblen Sorte zu 0 dpi ihr Maximum hat und sich danach immer weiter verringert. Da unbekannt ist, welches Molekül durch die *PKS13* synthetisiert wird, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob dieses Molekül eventuell in der Interaktion von *R. commune* mit seinem Wirt Gerste eine besondere Rolle spielt, besonders mit Gerstensorten, die weniger anfällig sind. Ein Hinweis auf eine besondere Rolle des *PKS13*-Produkts ist die Tatsache, dass das *PKS13*-Gen in keiner der anderen untersuchten *Rhynchosporium*-Arten (*R. secalis*, *R. agropyri* bzw. *R. orthosporum*) identifiziert werden konnte (Tab. 4.1).

In Sekundärmetabolit-Genclustern (im folgenden als Cluster bezeichnet) liegen Gene, deren Produkte zum gleichen Biosyntheseweg gehören. Das bedeutet, dass die Gene, die beispielsweise modifizierende Enzyme (zum Beispiel: Glykosylierungen, Reduktionen) und Transporter kodieren, in Nähe zu PKS- bzw. PKS-NRPS-kodierenden Genen liegen (Keller und Hohn, 1997). So liegen bspw. die PKS, die an der Synthese von Asperfuranon beteiligt sind in einem Cluster (Chiang *et al.*, 2009). Durch *in-silico*-Analysen konnten mögliche Cluster in *R. commune* ermittelt werden. Dafür wurden zwei verschiedene Algorithmen verwendet (SMURF und HKI). SMURF (Secondary Metabolite Unique Regions Finder, Khaldi *et al.*, 2010) liegt die Genannotation zugrunde. Der SMURF-Algorithmus sagt aufgrund der Genprodukte, die üblicherweise in Clustern vorkommen die möglichen Cluster voraus. Der zweite in dieser Arbeit verwendete Algorithmus wurde am Hans-Knöll-Institut in Jena (HKI Jena) entwickelt (Wolf *et al.*, 2013). Der HKI-Algorithmus beruht auf möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen, die in den Promotorregionen in Genen in Nähe zu PKS (+/- 20 Gene) vermehrt auftauchen.

Die Anwendung der beiden Algorithmen führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Demnach liegen möglicherweise *PKS3* und *PKS13* (HKI, Abb. 4.4a) sowie *PKS12* und *NRPS2* (SMURF und HKI, Abb. 4.4c) in einem Cluster. Weiterhin ergab diese Analyse, dass *PKS4* mit einem

weiteren Schlüsselenzym des Sekundärmetabolismus (DMATS1) in einem putativen Cluster liegt (SMURF und HKI, Abb. 4.5b).

PKS3 ist die einzige nicht-reduzierende PKS in *R. commune*, während PKS13 ein PKS-NRPS-Hybrid ist, in dem der NRPS-Teil verkürzt ist. Die Expressionsprofile der beiden *PKS* sind auf der hoch suszeptiblen Pflanze ähnlich, während sie sich auf der moderat suszeptiblen Sorte unterscheiden. Daher ist unklar, inwieweit das Vorhandensein beider Gene in einem putativen Cluster tatsächlich ein Hinweis auf eine konvergente oder sequentielle Kooperation ist (Abb. 4.4a). Da das PKS13-kodierende Gen nur in *R. commune* vorhanden ist, sollen weitere Untersuchungen der Genome von *R. secalis*, *R. agropyri* und *R. orthosporum* ergeben, ob auch die Gene des möglichen Clusters fehlen. Dies wäre ein Hinweis, dass tatsächlich ein Cluster vorliegt, welches komplett in den anderen *Rhynchosporium*-Arten fehlt. Ein Beispiel hierfür liegt für das putative Cluster von PKS19 in *Fusarium fujikuroi* vor (Wiemann *et al.*, 2013). In diesem befinden sich inklusive PKS19 insgesamt sechs Gene, zu denen es keine Homologe in anderen *Fusarium*-Genomen gibt (Wiemann *et al.*, 2013).

PKS12 und NRPS2 liegen in einem Cluster (Abb. 4.4c). PKS12 besitzt als einzige PKS in *R. commune* eine AFD („adenylate forming domain“, Abb. 4.3). Möglicherweise wird das durch die NRPS2 synthetisierte Molekül durch die AFD der PKS12 aktiviert und steht dann der PKS12 als Startermolekül zur Verfügung. Innerhalb des putativen PKS12/NRPS2-Clusters befindet sich eine nicht näher charakterisierte Transferase, die möglicherweise für den Transfer des NRPS2-Produkts zur AFD der PKS12 sorgt. Allerdings unterscheiden sich auch hier wie bei PKS3 und PKS13 die Expressionsprofile von *PKS12* und *NRPS2*. Während *NRPS2* über die gesamte Zeit gleichbleibend exprimiert wird, zeigt *PKS12* das Expressionsmaximum bereits zu Beginn der Pathogenese. Möglicherweise wird das Produkt der NRPS2 aber nicht nur als Startermolekül für die PKS12 benötigt, sondern geht noch in weitere Biosynthesewege ein bzw. wirkt als Einzelmolekül ohne weitere Modifikation.

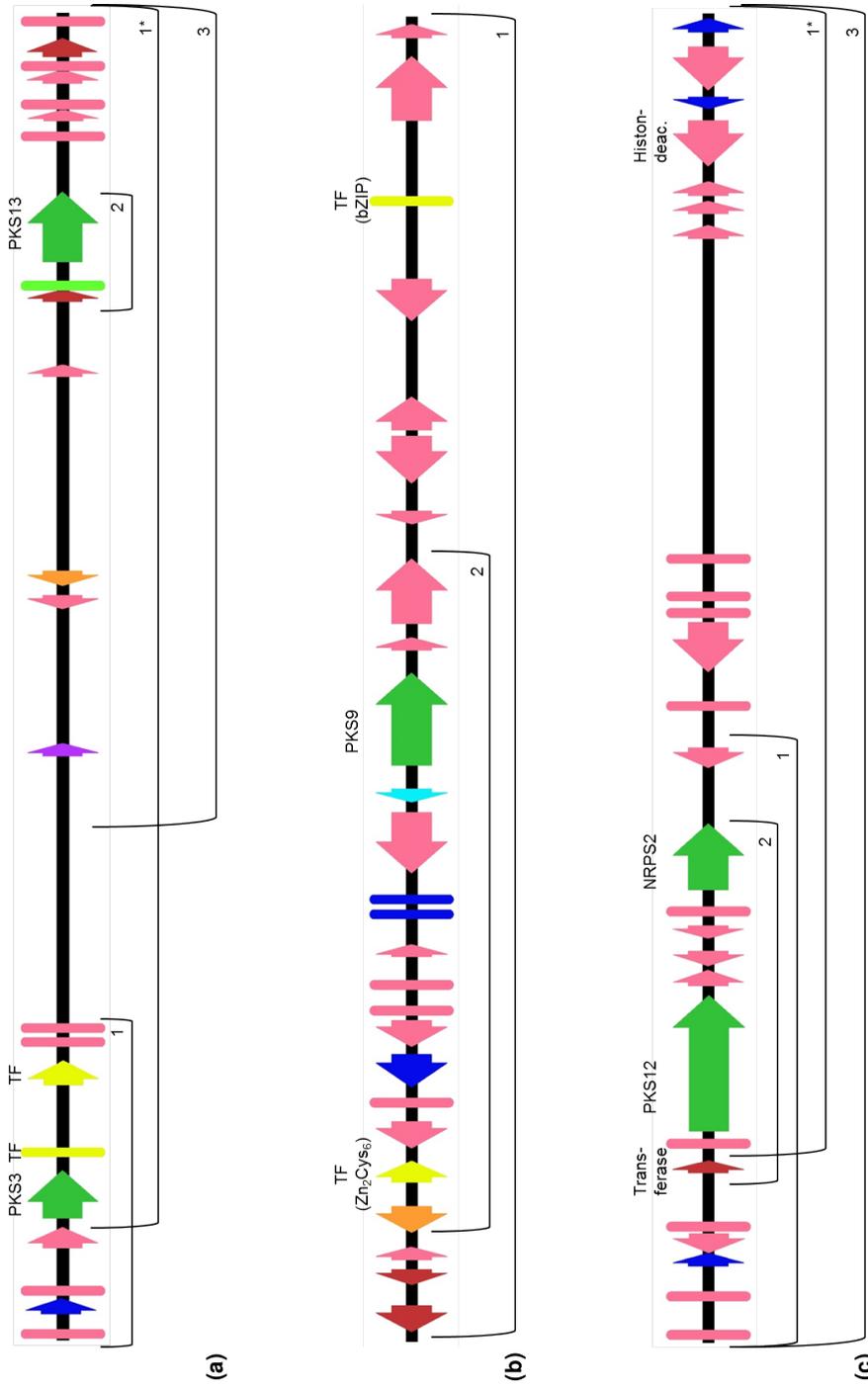


Abbildung 4.4.: Schematische Darstellung der Sekundärstoffwechsel-Genclustern von PKS3 + PKS13, PKS9 und PKS12 + NRPS2. (a) Sekundärstoffwechsel-Genclustern PKS3 + PKS13, (b) Sekundärstoffwechsel-Genclustern PKS9, (c) Sekundärstoffwechsel-Genclustern PKS12 + NRPS2, (grün) PKS bzw. NRPS, (gelb) Transkriptionsfaktoren, (blau) Oxidoreduktase, (dunkelrot) Transiferasen, (orange) Transporter der MFS („major facilitator superfamily“), (violett) Lyase, (hellblau) Hydrolase, (hellgrün) Hydratase, (rosa) sonstige Gene, (Histondeac.) Histondeacetylase, (TF) Transkriptionsfaktor, (Klammer 1 bzw. 1*) verschiedene Vorhersagen HKI für PKS3 bzw. NRPS2, (Klammer 3) Vorhersage HKI für PKS13 bzw. NRPS2, (Klammer 2) Vorhersage SMURF, s. auch Tab. C.3, C.6 und C.7 im Anhang

Innerhalb von Clustern in Pilzen befinden sich neben Oxidoreduktasen, Hydrolasen, Transferasen usw. auch regulatorische Elemente (Transkriptionsfaktoren) und Transporter (Keller und Hohn, 1997). Diese Beobachtungen konnten auch für die putativen Cluster in *R. commune* gemacht werden. Beispielsweise befinden sich im möglichen Cluster der PKS4 eine PKS, eine DMATS, acht Oxidoreduktasen, ein Transkriptionsfaktor, eine bzw. zwei Transferasen (SMURF bzw. HKI), ein Transporter sowie eine Hydrolase (Abb. 4.5b und Tab. C.1). Der Transkriptionsfaktor in diesem Cluster gehört zur Familie der Myb-Transkriptionsfaktoren. Weitere Transkriptionsfaktoren in den vorhergesagten Clustern sind: Zn_2Cys_6 (C6 Zink, PKS9), bZIP (PKS9, Abb. 4.4b) und Pig1p (PKS3/PKS13, Abb. 4.4a). In einigen der Cluster befinden sich nicht charakterisierte Genprodukte, die möglicherweise Transkriptionsfaktoren sein könnten (PKS1, PKS3/PKS13, Abb. 4.5a und 4.4a).

Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktoren werden als pilzspezifisch beschrieben (Keller *et al.*, 2005). Sie sind positive Regulatoren der Cluster und auch aus Clustern in anderen Pilzen bekannt (Keller *et al.*, 2005). Beispielsweise befinden sich Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktoren im Asperfuranon-Cluster von *A. nidulans* (Chiang *et al.*, 2009) bzw. in einem der Cluster, die für die Synthese der Botzinsäure in *B. cinerea* zuständig sind (Dalmais *et al.*, 2011). Auch im Fumonisin-Cluster von *F. verticillioides* konnte ein Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktor identifiziert werden (Brown *et al.*, 2007). Transkriptionsfaktoren, die sich innerhalb der vorhergesagten Cluster befinden, sind möglicherweise für die Regulation des gesamten Clusters verantwortlich. Die Deletion des Transkriptionsfaktors innerhalb des Fumonisin-Clusters führte zu verringerter bzw. keiner Produktion von Fumonisin in *F. verticillioides* (Brown *et al.*, 2007). Durch Überexpression bzw. Deletion des Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktor im PKS9-Cluster in *F. graminearum* kommt es zur Bildung neuer Aurofusarine (Überexpression) bzw. zu keiner Bildung von Aurofusarin (Deletion; Sørensen *et al.*, 2012). Innerhalb des PKS9-Cluster in *F. graminearum* wurde in den Promotorregionen der im Cluster befindlichen Gene ein konserviertes Motiv gefunden, was darauf hinweist, dass sämtliche Gene dieses Clusters von einem einzigen Transkriptionsfaktor reguliert werden. Die Cluster-Vorhersage des HKI bezieht sich auf solche Motive.

Weiterführende Arbeiten bezüglich der Identifizierung der von *R. commune* synthetisierten Polyketide könnten daher durch Deletion bzw. Überexpression des Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktor im Cluster von PKS9 erfolgen. Möglicherweise könnten auf diese Weise das Produkt der PKS9 bzw. weitere durch *R. commune* synthetisierte Substanzen identifiziert werden. In den beiden Clustern, die für die Synthese von Botzinsäure (PKS6 und PKS9) in *B. cinerea* zuständig sind, befindet sich der Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktor innerhalb des Clusters B (BcPKS9, Dalmais *et al.*, 2011). Im Cluster A (BcPKS6) befindet sich kein Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktor, sondern ein putativer negativer Transkriptionsregulator (NmrA-ähnliches Protein, „nitrogen metabolite repression in *Aspergillus*“, Dalmais *et al.*, 2011). Ein NmrA-ähnliches Protein ist in die Regulation der Bikaverin-Biosynthese in *F. fujikuroi* involviert (Wiemann *et al.*, 2009). Auch im PKS4-Cluster in *R. commune* konnte ein NmrA-ähnliches Protein identifiziert werden (Abb.

4.5b). Anders als die meisten anderen PKS von *R. commune* zeigt *PKS4* zu einem späten Zeitpunkt der Pathogenese das Expressionsmaximum (10 dpi). Da keine Expressionsdaten für *NmrA* vorliegen, kann derzeit nur angenommen werden, dass die Expression dieses negativen Regulators umgekehrt zur Expression von *PKS4* verläuft. Eine weitere PKS, deren Expression zu späten Zeitpunkten in der Pathogenese stattfindet, ist *PKS10*. Allerdings findet sich im putativen *PKS10*-Cluster weder ein Transkriptionsfaktor, noch ein negativer Transkriptionsregulator wie *NmrA*. Weitere putative Regulatoren in den Clustern in *R. commune* sind die *LaeA*-ähnliche Methyltransferase im *PKS6*-Cluster (Abb. 4.5c) sowie die Histondeacetylase im Cluster von *PKS12/NRPS2* (Abb. 4.4c). *LaeA* bedeutet „loss of aflR expression“ und spielt sehr wahrscheinlich eine Rolle in der Methylierung von Histonen und somit in der Regulation der Genexpression. Auch Histondeacetylasen verändern Histone und können so Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen. Ob ein solcher Einfluss auch in den Clustern der *PKS6* bzw. *PKS12/NRPS2* vorliegt, muss durch weiterführende Arbeiten geklärt werden.

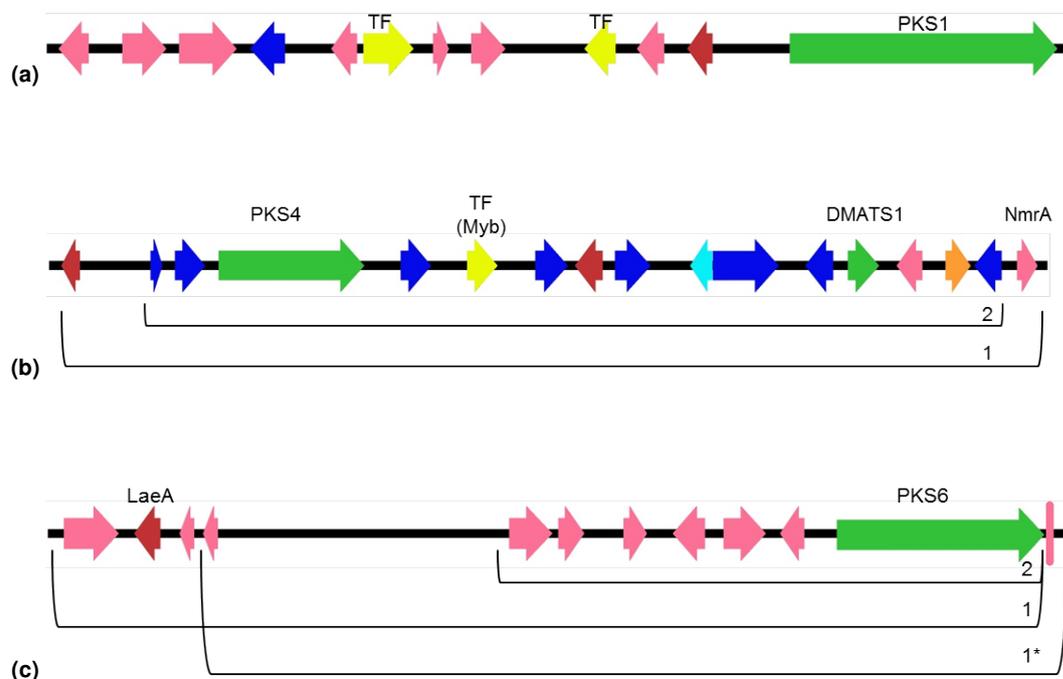


Abbildung 4.5.: Schematische Darstellung der Sekundärstoffwechsel-Gencluster von PKS1, PKS4 und PKS6. (a) Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS1 (nur Vorhersage HKI), (b) Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS4, (c) Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS6, (grün) PKS bzw. DMATS, (gelb) Transkriptionsfaktoren, (blau) Oxidoreduktase, (dunkelrot) Transferasen, (orange) Transporter der MFS („major facilitator superfamily“), (hellblau) Hydrolase, (rosa) sonstige Gene, (TF) Transkriptionsfaktor, (Klammer 1 bzw. 1*) verschiedene Vorhersagen HKI für PKS6, (Klammer 2) Vorhersage SMURF, s. auch Tab. C.9, C.1 und C.4 im Anhang

Eine Interaktion mehrerer PKS verschiedener Cluster in *R. commune* ist nicht auszuschließen, da auch im Falle von *B. cinerea* BcPKS6 und BcPKS9 in verschiedenen Clustern liegen (Dalmais *et al.*, 2011). Weiterhin wäre auch denkbar, dass die Transkriptionsregulation nicht

nur von einem Transkriptionsfaktor innerhalb der Cluster ausgeführt wird, sondern durch einen Transkriptionsfaktor stattfindet, der nicht in der Nähe vom Cluster kodiert ist.

4.3.2. Funktionelle Charakterisierung der *PKS1*-, *PKS2*- bzw. *PKS3*-Einzeldelation

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten Einzeldelationsmutanten für *PKS1*, *PKS2* und *PKS3* erstellt werden. Das Genprodukt von *PKS1* ist ein PKS-NRPS-Hybrid und *PKS3* ist die einzige nicht-reduzierende PKS in den *Rhynchosporium* spp. Die Expression der drei *PKS*-Gene findet in den beiden untersuchten Gerstensorten (moderat und hoch suszeptibel) zu frühen Zeitpunkten der Pathogenese statt. Weiterhin konnte für *PKS3* mit einer hohen Zuverlässigkeit ein mögliches Cluster ermittelt werden, in welchem sich gleichzeitig eine weitere PKS (*PKS13*) befindet. Die Vorhersagen für die möglichen Cluster von *PKS1* und *PKS2* sind weniger verlässlich und ergaben auch nur für einen der beiden genutzten Algorithmen Ergebnisse (HKI, Wolf *et al.*, 2013).

Durch die Deletion von *PKS2* ist kaum ein Unterschied in der Produktion der Pilzbiomasse *in planta* zu sehen. Lediglich 10 dpi ist ein signifikanter Unterschied zwischen UK7 Δ *PKS2* und Wildtyp UK7 festzustellen. Es konnte beobachtet werden, dass UK7 Δ *PKS2* scheinbar nicht in der Lage ist sich effektiv in Richtung Blattgrund auszubreiten, sondern nur dort Symptome entstehen, wo inokuliert wurde. Eine Überprüfung der Pilzbiomasse in verschiedenen Blattsegmenten konnte diese makroskopischen Beobachtungen nicht bestätigen, da gezeigt werden konnte, dass sich die UK7 Δ *PKS2*-Pilzbiomasse auch im Blattgrund befindet. Das bedeutet, dass die Deletion von *PKS2* keinen Einfluss auf das Pilzwachstum hat, aber langsamer Symptome ausgebildet werden. Durch vergleichende LC/MS-Untersuchungen *in vitro* konnten keine Unterschiede in den Sekundärmetaboliten festgestellt werden, so dass derzeit unklar ist, welches Molekül für den beschriebenen Phänotyp *in planta* in Frage kommt.

In planta führt die Deletion von *PKS1* und *PKS3* zu einer stark erhöhten Pilzbiomasse auf der hoch suszeptiblen Gerstensorte während sich die Pilzbiomasse auf der moderat suszeptiblen Gerstensorte nicht vom Wildtyp UK7 unterscheidet. Auch die Ausbildung der Symptome durch UK7 Δ *PKS1* und UK7 Δ *PKS3* ist im Vergleich zum Wildtyp UK7 stärker (hoch suszeptible Gerstensorte). Ein Unterschied in der Symptombildung zwischen den *PKS*-Deletionsmutanten und Wildtyp UK7 auf der moderat suszeptiblen Sorte ist hingegen nicht zu sehen. *In-vitro*-Untersuchungen ergaben, dass UK7 Δ *PKS1* und UK7 Δ *PKS3* mehr Myzel als der Wildtyp UK7 produzieren. Gleichzeitig konnte durch vergleichende LC/MS-Untersuchungen gezeigt werden, dass C₁₅H₁₄O₆ im Kulturfiltrat von UK7 Δ *PKS1* fehlt und in reduzierter Menge im Kulturfiltrat von UK7 Δ *PKS3* vorliegt. Da beide Mutanten ein verstärktes Wachstum *in* und *ex planta* zeigen, ist es möglich, dass es sich bei C₁₅H₁₄O₆ um einen Faktor handelt, der auf die Sporenkeimung bzw. das Pilzwachstum wirkt.

Die nachgewiesene reduzierte Menge an C₁₅H₁₄O₆ im Kulturfiltrat von UK7 Δ *PKS3* lässt darauf schließen, dass entweder weniger von der Substanz gebildet wird oder der Transport ins

Medium verschlechtert ist.

4.3.3. Mögliche Funktion von $C_{15}H_{14}O_6$

Im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS1 kann kein $C_{15}H_{14}O_6$ nachgewiesen werden. Da es sich bei PKS1 um ein PKS-NRPS-Hybrid handelt, das Aminosäuren an gebildete Polyketide kondensieren kann, ist unklar, warum $C_{15}H_{14}O_6$ kein Stickstoffatom enthält. Möglicherweise handelt es sich bei $C_{15}H_{14}O_6$ um ein Zwischenprodukt, das entsteht, wenn PKS1 ihr eigentliches Produkt (inklusive Aminosäure) synthetisiert. Es wäre denkbar, dass das eigentliche Produkt unter den verwendeten Bedingungen nicht gebildet wird. Möglicherweise haben unterschiedliche Bedingungen (*in vitro* bzw. *in planta*) nicht nur einen Einfluss auf die Expression der PKS, sondern auch auf die Aktivität der jeweiligen PKS. Beispielsweise konnte für verschiedene PKS-Gene aus *B. cinerea* gezeigt werden, dass sie *in vitro* und *in planta* unterschiedlich exprimiert sind (Dalmais *et al.*, 2011). Daraus könnte gefolgert werden, dass *B. cinerea* je nach Wachstumsbedingung unterschiedliche Sekundärmetabolite synthetisiert. In *F. graminearum* konnten Gaffoor *et al.* (2005) zeigen, dass verschiedene *in-vitro*-Bedingungen unterschiedliche PKS-Expressionen hervorrufen. Durch Nutzung verschiedener *in-vitro*-Bedingungen konnten Wiemann *et al.* (2013) zeigen, dass verschiedene *Fusarium*-Arten je nach Mediumzusammensetzung unterschiedliche Metabolitenprofile zeigen.

Weiterhin ist möglich, dass PKS1 das eigentliche PKS1-Produkt (Polyketid mit kondensierter Aminosäure) bildet, aber der Aminosäureteil innerhalb der Zelle als eine Art Schutzgruppe fungiert, um den Abbau bzw. eine mögliche toxische Wirkung zu verhindern. Auf ähnliche Weise speichern Pflanzen toxische Substanzen als Glucosinolate. Die Freisetzung erfolgt nur, wenn bspw. ein Frassfeind die Zellen zersört und das hydrolytische Enzym Myrosinase und die Glucosinolate aufeinander treffen, die zuvor in verschiedenen Kompartimenten getrennt voneinander vorlagen (Mithöfer und Boland, 2012). Möglicherweise ist die Wirkung von $C_{15}H_{14}O_6$ nur außerhalb von *R. commune* erwünscht und durch die Kondensation mit einer Aminosäure wird das Molekül in seiner Reaktivität gehemmt. Zur Sekretion von $C_{15}H_{14}O_6$ wird dann der stickstoffhaltige Teil des Moleküls abgespalten, so dass dann $C_{15}H_{14}O_6$ nicht aber das stickstoffhaltige Produkt der PKS1 *in vitro* nachweisbar ist.

$C_{15}H_{14}O_6$ kann nur in reduzierter Menge im Kulturfiltrat von UK7 Δ PKS3 im Vergleich zum Kulturfiltrat von Wildtyp UK7 nachgewiesen werden. Daher wird angenommen, dass PKS1 und PKS3 in die Biosynthese von $C_{15}H_{14}O_6$ involviert sind. Möglicherweise liegt hier eine Interaktion von zwei PKS vor, die nicht innerhalb des gleichen Clusters liegen. Eventuell hat das Produkt der PKS3 einen regulatorischen Einfluss auf die Synthese von $C_{15}H_{14}O_6$, ist am Transport des Moleküls in die Umgebung beteiligt oder hat einen Einfluss auf die Abspaltung der Aminosäurekomponente, wenn $C_{15}H_{14}O_6$ sezerniert wird. Abbildung 4.6 zeigt ein Modell, wie PKS1 und PKS3 interagieren könnten. PKS1 synthetisiert aus dem Startermolekül „A“ die Substanz „Z“, die eine Aminosäurekomponente enthält. Durch die Sekretion wird der Amino-

säureteil von „Z“ abgespalten und $C_{15}H_{14}O_6$ wird freigesetzt. Gleichzeitig wird „Y“ durch PKS3 aus dem Startermolekül „B“ synthetisiert. „Y“ könnte einen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität von PKS1 besitzen bzw. die Sekretion von $C_{15}H_{14}O_6$ steigern. Dadurch würde es zu einer geringeren Menge an $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat kommen, wenn *PKS3* deletiert wird. Es wäre denkbar, dass auch das Produkt der PKS1 („Z“) einen regulatorischen Einfluss auf PKS3 hat. Durch das Fehlen von PKS1 und „Z“ wird die Produktion von „Y“ erhöht, die dann die Synthese von „Z“ anschalten soll. Ein regulatorischer Einfluss auf die Expression von *PKS1* bzw. *PKS3* wird eher nicht angenommen, da kaum Unterschiede in der *in-planta*-Expression von *PKS1* bzw. *PKS3* beim Vergleich von $UK7\Delta PKS3$ bzw. $UK7\Delta PKS1$ mit dem Wildtyp zu sehen sind.

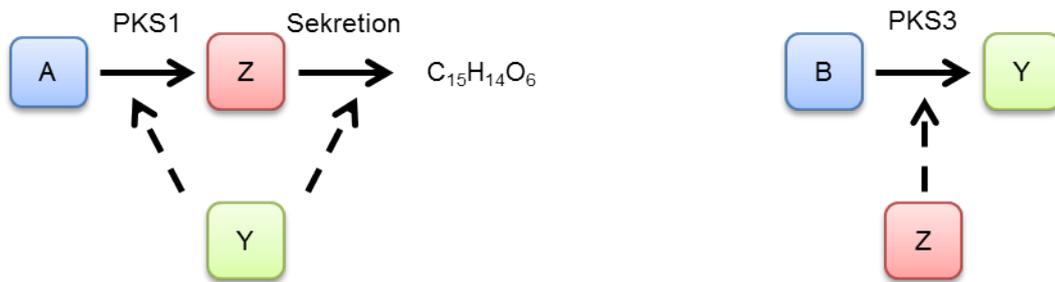


Abbildung 4.6.: Mögliche Interaktion von PKS1 und PKS3 in der Biosynthese von $C_{15}H_{14}O_6$. (A bzw. B) Startermoleküle für PKS1 bzw. PKS3, (Y) Produkt der PKS3, (Z) putatives stickstoffhaltiges Endprodukt der PKS1

Im putativen Cluster von PKS3 befinden sich neben PKS13 auch ein Transporter sowie eine Aminopeptidase (Tab. C.3 und Abb. C.3). Es wäre möglich, dass die Aminopeptidase aus dem PKS3/PKS13-Cluster verantwortlich für das Abspalten des Aminosäurerestes von „Z“ ist und anschließend die Sekretion von $C_{15}H_{14}O_6$ durch den Transporter, der sich auch in diesem Cluster befindet, erfolgt. Anhand des Modells in Abbildung 4.6 kann auch erklärt werden, warum im Kulturfiltrat von $UK7\Delta PKS3$ (LC/MS-Analysen) keine fehlende Komponente im Vergleich mit Wildtyp UK7 auftaucht, da laut dem derzeit vorliegenden Modell das Produkt der PKS3 intrazellulär wirkt.

Da *in planta* ein besseres Pilzwachstum von $UK7\Delta PKS1$ festgestellt wurde, handelt es sich bei $C_{15}H_{14}O_6$ möglicherweise um einen Keimungs- und/ oder Wachstumshemmer, der auf den eigenen Organismus wirkt, um das gleichzeitige Auskeimen zu vieler Sporen zu verhindern. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation war es nicht möglich die Struktur von $C_{15}H_{14}O_6$ aufzuklären, um die Substanz zu synthetisieren und Untersuchungen hinsichtlich ihrer Wirkungsweise durchzuführen. Um dennoch Hinweise auf die Funktion von $C_{15}H_{14}O_6$ zu erhalten, wurden Experimente mit konditionierten Medien von $UK7\Delta PKS1$ (kein $C_{15}H_{14}O_6$) und Wildtyp UK7 ($C_{15}H_{14}O_6$) durchgeführt. In konditioniertem Medium, dass kein $C_{15}H_{14}O_6$ enthält, zeigt sich besseres Wachstum im Vergleich zu konditioniertem Medium, dass von Anfang an $C_{15}H_{14}O_6$ beinhaltet. Der GFP-exprimierende Pilz, der für den Wachstumstest ver-

wendet wurde, ist selbst in der Lage, $C_{15}H_{14}O_6$ zu produzieren, da er ein funktionelles *PKS1*-Gen besitzt. Das bedeutet, dass über die Zeit des Experiments neues $C_{15}H_{14}O_6$ zu den konditionierten Medien (mit bzw. ohne $C_{15}H_{14}O_6$) hinzu kommt. Dennoch hat das neu gebildete $C_{15}H_{14}O_6$ offenbar keinen Einfluss auf das Ergebnis, da trotz später gebildetem $C_{15}H_{14}O_6$ im UK7 Δ *PKS1*-Medium (ohne $C_{15}H_{14}O_6$) das Wachstum in diesem Medium stärker ist. Ein weiteres Experiment sollte den möglichen Einfluss von $C_{15}H_{14}O_6$ auf die Sporenkeimung, Anzahl der Keimschläuche und die Keimschlauchlänge zeigen. Die Ergebnisse zeigten aber keinen Unterschied zwischen den verwendeten Medien mit bzw. ohne $C_{15}H_{14}O_6$. Daher wird derzeit davon ausgegangen, dass es sich bei $C_{15}H_{14}O_6$ möglicherweise um einen Wachstumsinhibitor handelt.

Zusätzlich zum Einfluss von $C_{15}H_{14}O_6$ als Autoinhibitor von *R. commune*, wurden Versuche durchgeführt, ob die Wachstumsinhibierung eventuell auch auf andere Organismen ausgeweitet werden kann. Dafür wurden Versuche mit *E. coli* und *P. infestans* durchgeführt. Für beide Organismen konnten keine Wachstumsunterschiede in den konditionierten Medien von UK7 Δ *PKS1* (ohne $C_{15}H_{14}O_6$) bzw. Wildtyp UK7 ($C_{15}H_{14}O_6$) festgestellt werden. Diese Versuche müssen wiederholt werden, wenn die Struktur von $C_{15}H_{14}O_6$ aufgeklärt ist und die Reinsubstanz synthetisiert werden kann. Derzeit werden Überexpressionsmutanten von *PKS1* unter einem konstitutiven bzw. induzierbaren Promotor erstellt, um eine größere Ausbeute an $C_{15}H_{14}O_6$ für NMR-Analysen zu erzielen.

Neben der Hypothese von $C_{15}H_{14}O_6$ als Wachstumsinhibitor wäre es denkbar, dass es sich bei der Substanz um einen Avirulenzfaktor handelt. Es wäre vorstellbar, dass $C_{15}H_{14}O_6$ durch die Pflanze erkannt wird und somit Abwehrreaktionen hervorgerufen werden. Fehlt $C_{15}H_{14}O_6$, unterbleibt die Erkennung und die Mutante kann ungehindert wachsen und mehr Pilzbiomasse *in planta* als der Wildtyp UK7 produzieren. Es ist von ACE1 aus *M. grisea* bekannt, dass es sich bei dem *PKS*-*NRPS*-Hybrid um ein *Avr*-Genprodukt handelt. Das durch ACE1 synthetisierte Produkt wird durch das *R*-Genprodukt Pi33 in Reis erkannt, daraus folgend kann *M. grisea* Pflanzen, die ein funktionelles *Pi33*-Gen besitzen, nicht infizieren. Liegen ACE1 (*M. grisea*) bzw. Pi33 (Reis) nicht oder nicht funktionell vor, kommt es zu keiner Erkennung des Pathogens durch die Pflanze und *M. grisea* kann die Pflanze infizieren (Böhnert *et al.*, 2004; Collemare *et al.*, 2008a). Auch für ein *PKS*-*NRPS*-Hybrid aus *Trichoderma virens* konnte gezeigt werden, dass das synthetisierte Produkt in der Lage ist, Abwehrreaktionen auszulösen (Mukherjee *et al.*, 2012). *Trichoderma* spp. sind symbiontische Pilze, die mit anderen phytopathogenen Organismen um ihre Wirtspflanze konkurrieren. *T. virens* besiedelt die Wurzeln von Maispflanzen und induziert Abwehrreaktionen, wodurch ein Befall weiterer Phytopathogene unterbunden wird. Mukherjee *et al.* (2012) konnten zeigen, dass durch Mutation in einem *PKS*-*NRPS*-Gen die Induktion von *pal* (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, ein Abwehrgen) unterbleibt, woraus die Autoren schließen, dass das *PKS*-*NRPS*-Produkt von der Pflanze erkannt wird und damit Abwehrgene induziert werden.

Ob es sich bei $C_{15}H_{14}O_6$ um einen Avirulenzfaktor oder um einen Wachstumsinhibitor handelt, der als Autoinhibitor wirkt, kann derzeit nicht gesagt werden. Allerdings ergaben *in-vitro*-Untersuchungen, dass UK7 Δ *PKS1* mehr Myzelmasse als der Wildtyp UK7 produziert, wie es auch *in planta* der Fall ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Verwendung verschiedener Flüssigmedien zu unterschiedlichen Mengen an $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat führt. Dabei wurde festgestellt, dass je mehr Myzel produziert wurde, um so weniger $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat nachgewiesen werden konnte. Aus dieser negativen Korrelation lässt sich schließen, dass $C_{15}H_{14}O_6$ einen Einfluss auf das Myzelwachstum *in* und *ex planta* haben könnte und möglicherweise tatsächlich als Wachstumsinhibitor wirkt.

4.4. Verstärktes Wachstum der erstellten Deletionsmutanten *in planta*

Biotrophe und hemibiotrophe Pilze benötigen lebendes Pflanzengewebe, um zu überleben und ihren Lebenszyklus komplett durchlaufen zu können (Koeck *et al.*, 2011). Während der Infektion der Wirtspflanzen produzieren und sezernieren Pathogene Virulenzfaktoren, die die Wirtsphysiologie zu ihren Gunsten modulieren (Dodds *et al.*, 2009). Es wäre daher zu erwarten, dass sich die Deletion von Virulenzfaktoren negativ auf die Pathogenentwicklung auswirkt (verminderte Virulenz bzw. apathogenes Verhalten der Mutanten). Umso erstaunlicher ist es, dass die meisten in dieser Dissertation beschriebenen Deletionsmutanten ein im Vergleich zum Wildtyp verstärktes Wachstum *in planta* zeigen. Dies betrifft die Deletion von *PME1*, *RxP1*, *PKS1* und *PKS3*, wobei deutlich wird, dass Pilzbiomasse und Symptomentwicklung nicht streng korrelieren.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Prozess der Protoplastentransformation bzw. das zur Transformantenselektion verwendete Phleomycin-Resistenzgen das Wachstum der Deletionsmutanten beeinflussen. Gegen diese These sprechen allerdings weitere Deletionsmutanten, die ebenfalls durch homologe Rekombination erstellt wurden und deren Wachstum *in planta* im Vergleich zum Wildtyp entweder unverändert oder verzögert war (Kirsten *et al.*, 2012; W. Knogge, unveröffentlicht). Zwei dieser Mutanten wurden ebenfalls mit Hilfe des Phleomycin-Resistenzgens selektioniert. Dabei führte die Deletion von *PFP1* zu einer apathogenen Mutante (Siersleben, 2011), während die *NIP2*-Deletionsmutante auf der moderat suszeptiblen Sorte Atlas weniger Pilzbiomasse als der Wildtyp produzierte (Kirsten *et al.*, 2012).

Eine Erklärungsmöglichkeit für das im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Wachstum der Deletionsmutanten wäre, dass die in dieser Arbeit deletierten Faktoren nicht in erster Linie für die direkte Interaktion von *R. commune* mit Gerste oder die parasitische Phase des pilzlichen Lebenszyklus nötig sind. Eventuell sichern sie das Überleben des Pilzes unter weniger günstigen Umweltbedingungen, bspw. in einer Nichtwirts-Umgebung, oder sie haben eine Bedeutung während der saprophytischen Phase des Lebenszyklus (Zhan *et al.*, 2008; Morris *et al.*, 2009). Freilanduntersuchungen zur Veränderung der genetischen Struktur von

R.-commune-Populationen zeigten, dass sich die Selektionsbedingungen, die während der beiden Phasen herrschen, offenbar deutlich unterschieden (Abang *et al.*, 2006). Vermutlich ist der Pilz mit einem spezifischen Gen-Repertoire für die nicht-parasitische Phase ausgestattet um zum Beispiel in der Konkurrenz mit schneller wachsenden Saprophyten bestehen zu können. Aber auch während der parasitischen Phase werden spezifische Faktoren für die Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen, die die gleiche Pflanze besiedeln wollen, benötigt (Morris *et al.*, 2009). Hierzu zählen LysM-Proteine, für die über ihre Funktion als Virulenzfaktor hinaus eine Bedeutung im Schutz vor konkurrierenden phytopathogenen Organismen diskutiert wird. LysM-Proteine wie Ecp6 aus *C. fulvum* wirken als Suppressoren der pflanzlichen Abwehr, indem sie Chitin-Oligosaccharide binden, die während des Pilzwachstums *in planta* durch die Aktivität pflanzlicher Chitinasen, aus der pilzlichen Zellwand freigesetzt werden (Bolton *et al.*, 2008). Dadurch wird verhindert, dass pflanzliche Rezeptoren das Chitin und damit die Anwesenheit des Pilzes erkennen und Abwehrreaktionen in Gang gesetzt werden (Bolton *et al.*, 2008). Gleichzeitig wird angenommen, dass diese LysM-Proteine die Pilzhyphen gegen Chitinasen konkurrierender Organismen schützen (de Jonge und Thomma, 2009). Die Konkurrenz um eine Wirtspflanze besteht nicht nur mit anderen Mikroorganismen, sondern kann auch zwischen den Isolaten einer Art auftreten (Zhan und McDonald, 2013). Das muss aber nicht bedeuten, dass Isolate, die eine hohe Virulenz zeigen, wenn sie eine Wirtspflanze allein besiedeln, zwangsläufig einen Vorteil bei gleichzeitigem Befall eines weiteren Isolats zeigen (Schürch und Roy, 2004; Zhan und McDonald, 2013). Beim Vergleich von Einzel- bzw. Multiinfektionen verschiedener Isolate des Weizenpathogens *Mycosphaerella graminicola* konnten Schürch und Roy (2004) zeigen, dass einige der Isolate im Vergleich zur Einzelinfektion eine reduzierte Virulenz aufwiesen, wenn sie gleichzeitig mit anderen Isolaten inokuliert wurden. Möglicherweise liegt die Bedeutung der in dieser Arbeit beschriebenen Effektoren in der Abwehr anderer phytopathogener Organismen bzw. anderer *R. commune*-Isolate, die gleichzeitig die Gerstenpflanzen besiedeln. Die Produktion bzw. Sekretion von Faktoren, die nicht oder nicht nur für die Erschließung der Wirtspflanze von unmittelbarer Bedeutung sind, könnte für den Pilz „Kosten“ verursachen, die erst durch die Deletion im Vergleich mit dem Wildtyp sichtbar werden.

Der Erfolg eines Pathogens zeigt sich nicht nur innerhalb der Wirtspflanze, sondern er beruht auch auf der Fähigkeit, Sporen innerhalb der Wirtspopulation zu verbreiten. Dieser Transmissionserfolg bietet einen weiteren Ansatzpunkt, um den „positiven“ Einfluss von Deletionen auf das Pilzwachstum zu erklären. Häufig wird angenommen, dass die Fähigkeit zur Übertragung von Sporen (Pathogen-Fitness) eine positive Korrelation mit der Entwicklung des Pathogens *in planta* und seiner Virulenz aufweist (Sacristan und Garcia-Arenal, 2008). Virulenz ist dabei als Beeinträchtigung der Wirtsfitness definiert. Für *R. commune* stellt sich in diesem Zusammenhang daher die Frage, ob die in Form von Läsionen beobachtete Virulenz mit der Sporenproduktion korreliert. Eine Quantifizierung der Sporulation *in planta* war bisher nicht möglich.

Es ist jedoch denkbar, dass das verstärkte Wachstum der Deletionsmutanten nicht mit einer gesteigerten Sporenbildung einhergeht, sondern eine negative Korrelation vorliegt. Dies würde bedeuten, dass eine Wachstumsgeschwindigkeit existiert, bei der sowohl die Entwicklung des Pilzes in einer einzelnen Wirtspflanze, wie auch die Ausbreitung der produzierten Sporen innerhalb der Wirtspflanzenpopulation optimal verläuft. Möglicherweise sind eines oder mehrere der in dieser Arbeit betrachteten Genprodukte an der Aufrechterhaltung dieses Optimums beteiligt. Zukünftige Arbeiten sollten daher die Quantifizierung der von *R. commune in planta* produzierten Sporen zum Ziel haben.

5. Zusammenfassung und Ausblick

R. commune besitzt Gene, die zellwandabbauende Enzyme kodieren. Neben Polygalakturonasen (PGs) und Pektatlyasen (PLs) finden sich im Genom fünf Pektinmethylesterasen (PMEs). Die Deletion von *PME1* führte nicht zu einem Verlust der Pathogenität, sondern zu einem verzögerten Ausbilden der Symptome und einer größeren Pilzbiomasse *in planta*. Daraus kann geschlossen werden, dass *PME1* die Pflanze-Pathogen-Interaktion beeinflusst. Die verzögerte Symptomentwicklung könnte darauf hindeuten, dass die Regulation des Übergangs von biotropher zu nekrotropher Phase betroffen ist. Die Deletion von *PME1* hat keinen Einfluss auf die Expression der anderen *PME*-Gene in *UK7ΔPME1*. In weiterführenden Arbeiten sollen die Transkriptmengen aller *PME*-Gene gleichzeitig mit Hilfe von *PME*-RNAi-Konstrukten reduziert werden (D. Penselin und W. Knogge, unveröffentlicht). Möglicherweise wird durch die Deletion der *PME1* die Expression von PGs und PLs verändert, wodurch der vorliegende Phänotyp hervorgerufen wird. In weiterführenden Arbeiten bezüglich der Charakterisierung der *UK7ΔPME1* sollte die Expression von PGs und PLs *in planta* überprüft werden, um zu klären, ob der veränderte Wachstumsphänotyp eventuell durch eine erhöhte Expression der *PG*- und *PL*-Gene hervorgerufen wird.

Die Deletion des *RxP1*-Gens (*Rhynchosporium*-RxLR-Protein 1) führt zu einem stark erhöhten Pilzwachstum *in planta* und zu einer schnelleren Symptombildung. Dies ist ein Hinweis, dass das Protein möglicherweise von der Pflanze als *Avirulenz*-Genprodukt erkannt wird. Mittels der Fusion von *RxP1* mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry konnte die Lokalisation von *RxP1* an der Peripherie der Pilzhyphen gezeigt werden. Ob es sich bei *RxP1* tatsächlich um einen sezernierten Effektor handelt oder ob das Protein innerhalb der Hyphen lokalisiert ist, sollen weiterführende Arbeiten zeigen. Weiterhin soll geklärt werden, ob das N-terminale RxLR-Motiv als Translokationssignal in die Pflanzenzelle wirkt oder ob es sich bei *RxP1* möglicherweise um einen apoplastisch wirkenden Effektor handelt.

R. commune Wildtyp *UK7* besitzt zehn Gene für Polyketidsynthasen (PKS), vier Gene für nicht-ribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) und drei Gene für PKS-NRPS-Hybride. Nach Deletion von *PKS1* (PKS-NRPS-Hybrid) bzw. *PKS3* (nicht-reduzierende PKS) wird ein verstärktes Pilzwachstum *in planta* sowie *in vitro* fest gestellt. Vergleichende LC/MS-Untersuchungen der Kulturfiltrate zeigten, dass eine Verbindung der Summenformel $C_{15}H_{14}O_6$ im Kulturfiltrat der *PKS1*-Deletionsmutante fehlt und im Kulturfiltrat von *UK7ΔPKS3* in reduzierter Menge vorliegt. Erste Untersuchungen zur biologischen Funktion von $C_{15}H_{14}O_6$ lassen darauf schließen, dass es sich bei der Substanz um einen Autoinhibitor handelt, der das Wachstum von *R. commune* negativ beeinflusst. Eine Strukturaufklärung von $C_{15}H_{14}O_6$ war bisher nicht er-

folgreich, soll aber in Zukunft durch die Überexpression von *PKS1* erfolgen. Anschließend könnte die Substanz für umfassende Untersuchungen zur biologischen Funktion synthetisiert werden.

Durch die Deletion von *PKS2* wird das Pilzwachstum *in planta* kaum beeinflusst. Allerdings zeigt diese Mutante eine verzögerte Symptombildung. Vergleichende LC/MS-Analysen konnten keine Rückschlüsse auf das durch *PKS2* synthetisierte Produkt geben. Es wird allerdings angenommen, dass das *PKS2*-Produkt in die Symptombildung involviert ist, da die durch die Mutante verursachten Symptome im Vergleich zum Wildtyp verzögert und weniger nekrotisch auftreten.

Weiterführende Arbeiten zum Sekundärmetabolismus von *R. commune*, sollten zunächst das Spektrum der Sekundärmetabolite aufnehmen, die *R. commune* unter verschiedenen *ex-planta*-Bedingungen synthetisieren kann. Anschließend sollten Überexpressionsmutanten, zum Beispiel durch Austausch der endogenen *PKS*-Promotoren gegen konstitutive oder induzierbare Promotoren bzw. Deletion oder Überexpression von regulatorischen Elementen (*NmrA*, *LaeA*, Zn_2Cys_6 -Transkriptionsfaktoren) in den vorhergesagten Clustern erstellt werden, um so im Kulturfiltrat von Wildtyp UK7 identifizierte Metabolite den verschiedenen *PKS* bzw. Clustern zuordnen zu können.

Nach den im Rahmen dieser Dissertation erlangten Erkenntnissen kann für *PME1*, *RxP1*, das *PKS2*-Produkt sowie $C_{15}H_{14}O_6$ eine Rolle in der Pflanze-Pathogen-Interaktion postuliert werden. Zusätzlich wäre möglich, dass einer oder mehrere der mutmaßlichen Virulenzfaktoren das Überleben unter ungünstigen Umweltbedingungen sichert oder eine Rolle während der Konkurrenz mit anderen Mikroorganismen, die die gleiche Pflanze befallen, spielt.

Literaturverzeichnis

- Abang, M. M., Baum, M., Ceccarelli, S., Grando, S., Linde, C. C., Yahyaoui, A., Zhan, J. und McDonald, B. A. (2006). Differential selection on *Rhynchosporium secalis* during parasitic and saprophytic phases in the barley scald disease cycle. *Phytopathology* **96**: 1214–1222.
- van Alebeek, G.-J. W. M., van Scherpenzeel, K., Beldman, G., Schols, H. A. und Voragen, A. G. J. (2003). Partially esterified oligogalacturonides are the preferred substrates for pectin methylesterase of *Aspergillus niger*. *The Biochemical Journal* **372**: 211–218.
- Andrie, R. M., Martinez, J. P. und Ciuffetti, L. M. (2005). Development of ToxA and ToxB promoter-driven fluorescent protein expression vectors for use in filamentous ascomycetes. *Mycologia* **97**: 1152–1161.
- Auriol, P., Strobel, G., Beltran, J. P. und Gray, G. (1978). Rhynchosporoside, a host-selective toxin produced by *Rhynchosporium secalis*, the causal agent of scald disease of barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **75**: 4339–4343.
- Ayesu-Offei, E. N. und Clare, B. G. (1970). Process in the infection of barley leaves by *Rhynchosporium secalis*. *Australian Journal of Biological Sciences* **23**: 299–307.
- Ayesu-Offei, E. N. und Clare, B. G. (1971). Symptoms of scald disease induced by toxic metabolites of *Rhynchosporium secalis*. *Australian Journal of Biological Sciences* **24**: 169–174.
- Backes, G., Madsen, L., Jaiser, H., Stougaard, J., Herz, M., Mohler, V. und Jahoor, A. (2003). Localisation of genes for resistance against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* and *Puccinia graminis* in a cross between a barley cultivar and a wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) line. *Theoretical and Applied Genetics* **106**: 353–362.
- Baker, S. E., Kroken, S., Inderbitzin, P., Asvarak, T., Li, B.-Y., Shi, L., Yoder, O. C. und Turgeon, B. G. (2006). Two polyketide synthase-encoding genes are required for biosynthesis of the polyketide virulence factor, T-toxin, by *Cochliobolus heterostrophus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 139–149.
- Bazzigher, G. (1953). Beitrag zur Kenntnis der *Endothia parasitica* (Murr.) And. dem Erreger des Kastaniensterbens. *Phytopathologische Zeitschrift* **21**: 105–132.

- Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G. und Brunak, S. (2004). Feature based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. *Protein Engineering Design and Selection* **17**: 349–356.
- Bendtsen, J. D., Kiemer, L., Fausbøll, A. und Brunak, S. (2005). Non-classical protein secretion in bacteria. *BMC Microbiology* **5**.
- Böhnert, H. U., Fudal, I., Diah, W., Tharreau, D., Notteghem, J.-L. und Lebrun, M.-H. (2004). A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. *The Plant Cell Online* **16**: 2499–2513.
- Bok, J. W. und Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell* **3**: 527–535.
- Boller, A., Gaumann, E., Hardegger, E., Kugler, F., Naef-Roth, S. und Rosner, M. (1957). Diaporthin, ein Welketoxin aus Kulturen von *Endothia parasitica* (Murr.) And. *Helvetica Chimica Acta* **40**: 875–880.
- Bolton, M. D., van Esse, H. P., Vossen, J. H., de Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I. J. E., van den Berg, G. C. M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H. L., de Koster, C. G., de Wit, P. J. G. M., Joosten, M. H. A. J. und Thomma, B. P. H. J. (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* **69**: 119–136.
- Bos, J. I. B., Armstrong, M. R., Gilroy, E. M., Boevink, P. C., Hein, I., Taylor, R. M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R. R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S. C., Kamoun, S. und Birch, P. R. J. (2010). *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **107**: 9909–9914.
- Bos, J. I. B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M. R., Birch, P. R. J. und Kamoun, S. (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* **48**: 165–176.
- Bowen, J. K., Templeton, M. D., Sharrock, K. R., Crowhurst, R. N. und Rikkerink, E. H. (1995). Gene inactivation in the plant pathogen *Glomerella cingulata*: three strategies for the disruption of the pectin lyase gene *pnIA*. *Molecular and General Genetics* **246**: 196–205.
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Banfield, M. J. und Kamoun, S. (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 483–492.

- Brown, D. W., Butchko, R. A. E., Busman, M. und Proctor, R. H. (2007). The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)₂Cys₆ protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryotic Cell* **6**: 1210–1218.
- Brunings, A. M. und Gabriel, D. W. (2003). *Xanthomonas citri*: breaking the surface. *Molecular Plant Pathology* **4**: 141–157.
- van den Burg, H. A., Harrison, S. J., Joosten, M. H. A. J., Vervoort, J. und de Wit, P. J. G. M. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 1420–1430.
- Büttner, D. und Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 193–200.
- Caldwell, R. M. (1937). *Rhynchosporium* scald of barley, rye and other grasses. *Journal of Agricultural Research* **55**: 175–198.
- Cane, D. E., Walsh, C. T. und Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**: 63–68.
- Chiang, Y.-M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R. und Wang, C. C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway for a polyketide, Asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 2965–2970.
- Chooi, Y. H. und Tang, Y. (2012). Navigating the fungal polyketide chemical space: from genes to molecules. *Journal of Organic Chemistry* **17**: 9933–9953.
- Collemare, J., Billard, A., Böhnert, H. U. und Lebrun, M.-H. (2008a). Biosynthesis of secondary metabolites in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*: the role of hybrid PKS-NRPS in pathogenicity. *Mycological Research* **102**: 207–215.
- Collemare, J., Pianfetti, M., Houille, A.-E., Morin, D., Camborde, L., Gagey, M.-J., Barbisan, C., Fudal, I., Lebrun, M.-H. und Böhnert, H. U. (2008b). *Magnaporthe grisea* avirulence gene ACE1 belongs to an infection-specific gene cluster involved in secondary metabolism. *New Phytologist* **179**: 196–208.
- Couch, B. C. und Kohn, L. M. (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* **94**: 683–693.
- Crawford, J. M., Dancy, B. C. R., Hill, E. A., Udway, D. W. und Townsend, C. A. (2006). Identification of a starter unit acyl-carrier protein transacylase domain in an iterative type I

- polyketide synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **103**: 16728–16733.
- Cunnac, S., Chakravarthy, S., Kvitko, B. H., Russell, A. B., Martin, G. B. und Collmer, A. (2011). Genetic disassembly and combinatorial reassembly identify a minimal functional repertoire of type III effectors in *Pseudomonas syringae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **108**: 2975–2980.
- Dalmais, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pecheur, P., Tudzynski, B., Collado, I. G. und Viaud, M. (2011). The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. Molecular Plant Pathology **12**: 564–579.
- Dangl, J. L. und Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature **411**: 826–833.
- D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T. M., Giovane, A. und Servillo, L. (2003). Tomato pectin methylesterase: Modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies - comparison with the bacterial *Erwinia chrysanthemi* enzyme. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **53**: 830–839.
- Davis, J. (1919). Notes on parasitic fungi in Wisconsin. Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters **19**: 705–727.
- Davis, J. (1921). Notes on parasitic fungi in Wisconsin. Transactions of the Wisconsin Academy of Sciences, Arts, and Letters **20**: 413–431.
- Dean, R. A., Talbot, N. J., Ebbole, D. J., Farman, M. L., Mitchell, T. K., Orbach, M. J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.-R., Pan, H., Read, N. D., Lee, Y.-H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y. Y., Donofrio, N., Jeong, J. S., Soanes, D. M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.-H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.-J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J. E. und Birren, B. W. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. Nature **434**: 980–986.
- Divon, H. H. und Fluhr, R. (2007). Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. FEMS Microbiology Letters **266**: 65–74.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A. R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y.-D., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M. und Kahmann, R. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. Nature **478**: 395–398.

- Dodds, P. N., Rafiqi, M., Gan, P. H. P., Hardham, A. R., Jones, D. A. und Ellis, J. G. (2009). Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *The New Phytologist* **183**: 993–1000.
- Dufresne, M., Perfect, S., Pellier, A.-L., Bailey, J. A. und Langin, T. (2000). A GAL4-like protein is involved in the switch between biotrophic and necrotrophic phases of the infection process of *Colletotrichum lindemuthianum* on common bean. *The Plant Cell Online* **12**: 1579–1589.
- Fedorova, N. D., Khaldi, N., Joardar, V. S., Maiti, R., Amedeo, P., Anderson, M. J., Crabtree, J., Silva, J. C., Badger, J. H., Albarraq, A., Angiuoli, S., Bussey, H., Bowyer, P., Cotty, P. J., Dyer, P. S., Egan, A., Galens, K., Fraser-Liggett, C. M., Haas, B. J., Inman, J. M., Kent, R., Lemieux, S., Malavazi, I., Orvis, J., Roemer, T., Ronning, C. M., Sundaram, J. P., Sutton, G., Turner, G., Venter, J. C., White, O. R., Whitty, B. R., Youngman, P., Wolfe, K. H., Goldman, G. H., Wortman, J. R., Jiang, B., Denning, D. W. und Nierman, W. C. (2008). Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Genetics* **4**: e1000046.
- Fernandes, M., Keller, N. P. und Adams, T. H. (1998). Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular Microbiology* **28**: 1355–1365.
- Frank, A. (1897). Über die Zerstörung durch einen neuen Gerste-Pilz. *Wochenschrift Brauerei* **14**: 518–520.
- Fries, M., Ihrig, J., Brocklehurst, K., Shevchik, V. E. und Pickersgill, R. W. (2007). Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *The EMBO Journal* **26**: 3879–3887.
- Friesen, T. L., Faris, J. D., Solomon, P. S. und Oliver, R. P. (2008). Host-specific toxins: effectors of necrotrophic pathogenicity. *Cellular Microbiology* **10**: 1421–1428.
- Gaffoor, I., Brown, D. W., Plattner, R., Proctor, R. H., Qi, W. und Trail, F. (2005). Functional analysis of the polyketide synthase genes in the filamentous fungus *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryotic Cell* **4**: 1926–1933.
- Gao, S., Choi, G. H., Shain, L. und Nuss, D. L. (1996). Cloning and targeted disruption of *enpg-1*, encoding the major in vitro extracellular endopolygalacturonase of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1984–1990.
- Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M. und Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1696**: 245–252.

- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell Online* **16**: S170–S180.
- Graap, J. (2013). Quantifizierung der Expression von Effektorgen des Pilzes *Rhynchosporium secalis*. Bachelorarbeit, Hochschule Anhalt.
- Greenberg, J. T. (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 525–545.
- Greenberg, J. T., Guo, A., Klessig, D. F. und Ausubel, F. M. (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**: 551–563.
- Gu, B., Kale, S. D., Wang, Q., Wang, D., Pan, Q., Cao, H., Meng, Y., Kang, Z., Tyler, B. M. und Shan, W. (2011). Rust secreted protein Ps87 is conserved in diverse fungal pathogens and contains a RXLR-like motif sufficient for translocation into plant cells. *PLoS ONE* **6**: e27217.
- Ha, Y.-s., Covert, S. F. und Momany, M. (2006). FsFKS1, the 1,3- β -Glucan synthase from the Caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryotic Cell* **5**: 1036–1042.
- Haese, A., Schubert, M., Herrmann, M. und Zocher, R. (1993). Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalysing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Molecular Microbiology* **7**: 905–914.
- Hahn, M., Jüngling, S. und Knogge, W. (1993). Cultivar-specific elicitation of barley defense reactions by the phytotoxic peptide NIP1 from *Rhynchosporium secalis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 745–754.
- Hallock, Y. F., Clardy, J., Kenfield, D. S. und Strobel, G. (1988). De-O-methyldiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*. *Phytochemistry* **27**: 3123–3125.
- Harris, J. P. und Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* **57**: 165–169.
- Herrmann, M., Zocher, R. und Haese, A. (1996). Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 393–398.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J. C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J. und Deising, H. B. (2009). Sfp-Type 4'-Phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity. *The Plant Cell Online* **21**: 3379–3396.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J. und Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research* **35**: W585–W587.

- Ichihara, A., Hashimoto, M., Hirai, T., Takeda, I., Sasamura, Y., Sakamura, S., Sato, R. und Tajimi, A. (1989). Structure, synthesis, and stereochemistry of (+)-Orthosporin, a phytotoxic metabolite of *Rhynchosporium orthosporum*. *Chemistry Letters* **18**: 1495–1498.
- Isshiki, A., Akimitsu, K., Yamamoto, M. und Yamamoto, H. (2001). Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *Alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**: 749–757.
- Izumi, Y., Ohtani, K., Miyamoto, Y., Masunaka, A., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., Peever, T. L. und Akimitsu, K. (2012). A polyketide synthase gene, *ACRTS2*, is responsible for biosynthesis of host-selective ACR-Toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 1419–1429.
- Jain, P., Podila, G. K. und Davis, M. R. (2008). Comparative analysis of non-classically secreted proteins in *Botrytis cinerea* and symbiotic fungus *Laccaria bicolor*. *BMC Bioinformatics* **9**: O3.
- Jenkins, J., Mayans, O., Smith, D., Worboys, K. und Pickersgill, R. W. (2001). Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Journal of Molecular Biology* **305**: 951–960.
- Johnson, R. D., Johnson, L., Itoh, Y., Kodama, M., Otani, H. und 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**: 742–753.
- Jolie, R. P., Duvetter, T., Houben, K., Clynen, E., Sila, D. N., Van Loey, A. M. und Hendrickx, M. E. (2009). Carrot pectin methylesterase and its inhibitor from kiwi fruit: Study of activity, stability and inhibition. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **10**: 601–609.
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. und Jones, J. D. (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**: 789–793.
- Jones, J. D. G. und Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- de Jonge, R. und Thomma, B. P. H. J. (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in Microbiology* **17**: 151–157.
- Juge, N. (2006). Plant protein inhibitors of cell wall degrading enzymes. *Trends in Plant Science* **11**: 359–367.
- Kamoun, S. und Smart, C. D. (2005). Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Disease* **89**: 692–699.

- Kars, I., McCalman, M., Wagemakers, L. und Van Kan, J. a. L. (2005). Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: *Bcpme1* and *Bcpme2* are dispensable for virulence of strain B05.10. *Molecular Plant Pathology* **6**: 641–652.
- Keller, N. P. und Hohn, T. M. (1997). Metabolic Pathway Gene Clusters in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology* **21**: 17–29.
- Keller, N. P., Turner, G. und Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 937–947.
- Kemen, E., Kemen, A. C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M. und Voegelé, R. T. (2005). Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**: 1130–1139.
- Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. und Fedorova, N. D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal Genetics and Biology* **47**: 736–741.
- Khang, C. H., Berruyer, R., Giraldo, M. C., Kankanala, P., Park, S.-Y., Czymmek, K., Kang, S. und Valent, B. (2010). Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *The Plant Cell Online* **22**: 1388–1403.
- Khosla, C. und Harbury, P. B. (2001). Modular enzymes. *Nature* **409**: 247–252.
- Kikot, G. E., Hours, R. A. und Alconada, T. M. (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *Journal of Basic Microbiology* **49**: 231–241.
- Kim, J.-G., Stork, W. und Mudgett, M. (2013). *Xanthomonas* type III effector XopD desumoylates tomato transcription factor SlERF4 to suppress ethylene responses and promote pathogen growth. *Cell Host & Microbe* **13**: 143–154.
- Kim, Y.-T., Lee, Y.-R., Jin, J., Han, K.-H., Kim, H., Kim, J.-C., Lee, T., Yun, S.-H. und Lee, Y.-W. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology* **58**: 1102–1113.
- King, K., West, J., Brunner, P., Dyer, P. und Fitt, B. (2013). Evolutionary relationships between *Rhynchosporium lolii* sp. nov. and other *Rhynchosporium* species on grasses. *PLoS ONE* in press.
- Kirsten, S., Navarro-Quezada, A., Penselin, D., Wenzel, C., Matern, A., Leitner, A., Baum, T., Seiffert, U. und Knogge, W. (2012). Necrosis-inducing proteins of *Rhynchosporium commune*, effectors in quantitative disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 1314–1325.

- Kirsten, S., Siersleben, S. und Knogge, W. (2011). A GFP-based assay to quantify the impact of effectors on the ex planta development of the slowly growing barley pathogen *Rhynchosporium commune*. *Mycologia* **103**: 1019–1027.
- Knogge, W. (1996a). Fungal infection of plants. *The Plant Cell* **8**: 1711–1722.
- Knogge, W. (1996b). Molecular basis of specificity in host/ fungus interactions. *European Journal of Plant Pathology* **102**: 807–816.
- Knogge, W. (1998). Fungal pathogenicity. *Current Opinion in Plant Biology* **1**: 324–328.
- Koeck, M., Hardham, A. R. und Dodds, P. N. (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology* **13**: 1849–1857.
- Kroken, S., Glass, N. L., Taylor, J. W., Yoder, O. C. und Turgeon, B. G. (2003). Phylogenomic analysis of type I polyketide synthase genes in pathogenic and saprobic ascomycetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**: 15670–15675.
- Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Kato, M., Urushihara, H. und Tanaka, Y. (2002). PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Research* **30**: E2.
- Kvitko, B. H., Park, D. H., Velásquez, A., Wei, C.-F., Russell, A. B., Martin, G. B., Schneider, D. J. und Collmer, A. (2009). Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PLoS Pathogens* **5**: e1000388.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C. und Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & Biology* **3**: 923–936.
- Lehnackers, H. und Knogge, W. (1990). Cytological studies on the infection of barley cultivars with known resistance genotypes by *Rhynchosporium secalis*. *Canadian Journal of Botany* **68**: 1953–1961.
- Lionetti, V., Cervone, F. und Bellincampi, D. (2012). Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1623–1630.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S. V., Machado, M. A., Toth, I., Salmond, G. und Foster, G. D. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **13**: 614–629.

- Marchler-Bauer, A., Anderson, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M., DeWeese-Scott, C., Fong, J., Geer, L., Geer, R., Gonzales, N., Gwadz, M., He, S., Hurwitz, D., Jackson, J., Ke, Z., Lanczycki, C., Liebert, C., Liu, C., Lu, F., Lu, S., Marchler, G., Mullokandov, M., Song, J., Tasneem, A., Thanki, N., Yamashita, R., Zhang, D., Zhang, N. und Bryant, S. (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research* **37**: D205–10.
- Marchler-Bauer, A. und Bryant, S. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Research* **32**: W327–31.
- Marrè, E. (1979). Fusicoccin: a tool in plant physiology. *Annual Reviews Plant Physiology* **30**: 273–288.
- Matern, A. (2011). Untersuchungen des putativen Effektorproteins RxP1 des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mazars, C., Hapner, K. D. und Strobel, G. A. (1984). Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycoprotein from culture filtrates of *Rhynchosporium secalis*. *Experientia* **40**: 1244–1247.
- Mentlak, T. A., Kombrink, A., Shinya, T., Ryder, L. S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B. P. und Talbot, N. J. (2012). Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell Online* **24**: 322–335.
- Mithöfer, A. und Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 431–450.
- Morris, C. E., Bardin, M., Kinkel, L. L., Moury, B., Nicot, P. C. und Sands, D. C. (2009). Expanding the paradigms of plant pathogen life history and evolution of parasitic fitness beyond agricultural boundaries. *PLoS Pathogens* **5**: e1000693.
- Mukherjee, P. K., Buensanteai, N., Moran-Diez, M. E., Druzhinina, I. S. und Kenerley, C. M. (2012). Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology* **158**: 155–165.
- Na, R., Yu, D., Qutob, D., Zhao, J. und Gijzen, M. (2013). Deletion of the *Phytophthora sojae* avirulence gene Avr1d causes gain of virulence on Rps1d. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 969–976.
- Nickel, W. (2003). The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *European Journal of Biochemistry* **270**: 2109–2119.

- Nickel, W. und Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**: 148–155.
- Oeser, B., Heidrich, P. M., Müller, U., Tudzynski, P. und Tenberge, K. B. (2002). Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction. *Fungal Genetics and Biology* **36**: 176–186.
- Ohm, R. A., Feu, N., Henrissat, B., Schoch, C. L., Horwitz, B. A., Barry, K. W., Condon, B. J., Copeland, A. C., Dhillon, B., Glaser, F., Hesse, C. N., Kosti, I., LaButti, K., Lindquist, E. A., Lucas, S., Salamov, A. A., Bradshaw, R. E., Ciuffetti, L., Hamelin, R. C., Kema, G. H. J., Lawrence, C., Scott, J. A., Spatafora, J. W., Turgeon, B. G., de Wit, P. J. G. M., Zhong, S., Goodwin, S. B. und Grigoriev, I. V. (2012). Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen *Dothideomycetes* fungi. *PLoS Pathogens* **8**: e1003037.
- Oudemans, C. A. J. A. (1897). Observations mycologiques. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Amsterdam **6**: 86–92.
- Panaccione, D. G. (1993). The fungal genus *Cochliobolus* and toxin-mediated plant disease. *Trends in Microbiology* **1**: 14–19.
- Panaccione, D. G., Scott-Craig, J. S., Pocard, J. A. und Walton, J. D. (1992). A cyclic peptide synthetase gene required for pathogenicity of the fungus *Cochliobolus carbonum* on maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 6590–6594.
- Parry, D. W., Jenkinson, P. und McLeod, L. (1995). *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* **44**: 207–238.
- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., Turner, G., de Vries, R. P., Albang, R., Albermann, K., Andersen, M. R., Bendtsen, J. D., Benen, J. A. E., van den Berg, M., Breestraat, S., Caddick, M. X., Contreras, R., Cornell, M., Coutinho, P. M., Danchin, E. G. J., Debets, A. J. M., Dekker, P., van Dijck, P. W. M., van Dijk, A., Dijkhuizen, L., Driessen, A. J. M., d'Enfert, C., Geysens, S., Goosen, C., Groot, G. S. P., de Groot, P. W. J., Guillemette, T., Henrissat, B., Herweijer, M., van den Hombergh, J. P. T. W., van den Hondel, C. A. M. J. J., van der Heijden, R. T. J. M., van der Kaaij, R. M., Klis, F. M., Kools, H. J., Kubicek, C. P., van Kuyk, P. A., Lauber, J., Lu, X., van der Maarel, M. J. E. C., Meulenbergh, R., Menke, H., Mortimer, M. A., Nielsen, J., Oliver, S. G., Olsthoorn, M., Pal, K., van Peij, N. N. M. E., Ram, A. F. J., Rinas, U., Roubos, J. A., Sagt, C. M. J., Schmoll, M., Sun, J., Ussery, D., Varga, J., Vervecken, W., van de Vondervoort, P. J. J., Wedler, H., Wösten, H. A. B., Zeng, A.-P., van Ooyen, A. J. J., Visser, J. und Stam, H. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nature Biotechnology* **25**: 221–231.

- Pelloux, J., Rustèrcci, C. und Mellerowicz, E. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science* **12**: 267–77.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. und Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* **8**: 785–786.
- Peterson, C. (2011). The ins and outs of heterochromatic DNA repair. *Developmental Cell* **20**: 285–287.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45.
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. und Desjardins, A. E. (1995). Tri6 encodes an unusual zinc finger protein involved in regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichioides*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1923–30.
- Prudovsky, I., Tarantini, F., Landriscina, M., Neivandt, D., Soldi, R., Kirov, A., Small, D., Kathir, K. M., Rajalingam, D. und Kumar, T. K. S. (2008). Secretion without Golgi. *Journal of Cellular Biochemistry* **103**: 1327–1343.
- Punta, M., Coghill, P. C., Eberhardt, R. Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E. L. L., Eddy, S. R., Bateman, A. und Finn, R. D. (2011). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research* **40**: D290–D301.
- Qutob, D., Kamoun, S. und Gijzen, M. (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal* **32**: 361–373.
- Reino, J. L., Hernandez-Galan, R., Duran-Patron, R. und Collado, I. G. (2004). Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Journal of Phytopathology* **152**: 563–566.
- Rohe, M., Gierlich, A., Hermann, H., Hahn, M., Schmidt, B., Rosahl, S. und Knogge, W. (1995). The race specific elicitor, NIP1, from the barley pathogen, *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the Rrs1 resistance genotype. *The EMBO Journal* **14**: 4168–4177.
- Sacristan, S. und Garcia-Arenal, F. (2008). The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular plant pathology* **9**: 369–384.
- Schürch, S. und Roy, B. A. (2004). Comparing single- vs. mixed-genotype infections of *Mycosphaerella graminicola* on wheat: effects on pathogen virulence and host tolerance. *Evolutionary Ecology* **18**: 1–14.

- Scott-Craig, J. S., Cheng, Y. Q., Cervone, F., De Lorenzo, G., Pitkin, J. W. und Walton, J. D. (1998). Targeted mutants of *Cochliobolus carbonum* lacking the two major extracellular polygalacturonases. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1497–1503.
- Shipton, W. A. (1974). Scald of barley. *Review of Plant Pathology* **53**: 839–861.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. und F, M. (2003). Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Molecular Plant Pathology* **4**: 237–248.
- Siersleben, S. (2011). Funktionelle Charakterisierung von *PFP1*, einem mutmaßlichen Pathogenitätsgen des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Song, W. Y., Wang, G. L., Chen, L. L., Kim, H. S., Pi, L. Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W. X., Zhu, L. H., Fauquet, C. und Ronald, P. (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**: 1804–1806.
- Sørensen, J. L., Hansen, F. T., Sondergaard, T. E., Staerk, D., Lee, T. V., Wimmer, R., Klitgaard, L. G., Purup, S., Giese, H. und Frandsen, R. J. N. (2012). Production of novel fusarielins by ectopic activation of the polyketide synthase 9 cluster in *Fusarium graminearum*. *Environmental Microbiology* **14**: 1159–1170.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**: 503–17.
- Stall, R. E., Jones, J. B. und Minsavage, G. V. (2009). Durability of resistance in tomato and pepper to Xanthomonads causing bacterial spot. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 265–284.
- Staunton, J. und Weisman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millenium review. *Natural Product Reports* **18**: 380–416.
- Steiner-Lange, S., Fischer, A., Boettcher, A., Rouhara, I., Liedgens, H., Schmelzer, E. und Knogge, W. (2003). Differential defense reactions in leaf tissues of barley in response to infection by *Rhynchosporium secalis* and to treatment with a fungal avirulence gene product. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 893–902.
- Stergiopoulos, I. und de Wit, P. J. G. M. (2009). Fungal effector proteins. *Annual Review of Phytopathology* **47**: 233–263.
- Syme, R. A., Hane, J. K., Friesen, T. L. und Oliver, R. P. (2013). Resequencing and comparative genomics of *Stagonospora nodorum*: Sectional gene absence and effector discovery. *G3: Genes|Genomes|Genetics* **3**: 959–969.

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. und Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 2731–2739.
- Tan, R., Jiang, X., Jackson, A., Jin, P., Yang, J., Lee, E., Duggan, B., Stuve, L. L. und Fu, G. K. (2003). *E. coli* selection of human genes encoding secreted and membrane proteins based on cDNA fusions to a leaderless β -lactamase reporter. *Genome Research* **13**: 1938–1943.
- Thomazella, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Oliveira, H. C., Saviani, E. E., Rincones, J., Toni, I. M., Reis, O., Garcia, O., Meinhardt, L. W., Salgado, I. und Pereira, G. A. G. (2012). The hemibiotrophic cacao pathogen *Moniliophthora perniciosa* depends on a mitochondrial alternative oxidase for biotrophic development. *New Phytologist* **194**: 1025–1034.
- Tsai, Y.-H., Liu, X. und Seeberger, P. H. (2012). Chemical biology of glycosylphosphatidylinositol anchors. *Angewandte Chemie* **51**: 11438–11456.
- Tyler, B. M., Kale, S. D., Wang, Q., Tao, K., Clark, H. R., Drews, K., Antignani, V., Rumore, A., Hayes, T., Plett, J. M., Fudal, I., Gu, B., Chen, Q., Affeldt, K. J., Berthier, E., Fischer, G. J., Dou, D., Shan, W., Keller, N. P., Martin, F., Rouxel, T. und Lawrence, C. B. (2013). Microbe-independent entry of oomycete RxLR effectors and fungal RxLR-like effectors into plant and animal cells is specific and reproducible. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**: 611–616.
- Valette-Collet, O., Cimerman, A., Reignault, P., Levis, C. und Boccara, M. (2003). Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 360–367.
- Wakabayashi, K., Hoson, T. und Huber, D. J. (2003). Methyl de-esterification as a major factor regulating the extent of pectin depolymerization during fruit ripening: a comparison of the action of avocado (*Persea americana*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) polygalacturonases. *Journal of Plant Physiology* **160**: 667–673.
- Walsh, C. T. (2004). Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science* **303**: 1805–1810.
- Walton, J. D. (1996). Host-selective toxins: Agents of compatibility. *The Plant Cell* **8**: 1723–1733.
- Wang, X. (2013). Funktionale Charakterisierung von Pektinmethylesterase-Genen des Gerstenpathogens *Rhynchosporium commune*. Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

- Wang, Y.-N., Wang, M. und Field, M. C. (2010). *Trypanosoma brucei*: Trypanosome-specific endoplasmic reticulum proteins involved in variant surface glycoprotein expression. *Experimental Parasitology* **125**: 208–221.
- Waring, R. B., May, G. S. und Morris, N. R. (1989). Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**: 119–130.
- Wevelsiep, L., Kogel, K.-H. und Knogge, W. (1991). Purification and characterization of peptides from *Rhynchosporium secalis* inducing necrosis in barley. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39**: 471–482.
- Wevelsiep, L., Rüpping, E. und Knogge, W. (1993). Stimulation of barley plasmalemma H⁺-ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiology* **101**: 297–301.
- Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., Armstrong, M. R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I. K., Pritchard, L. und Birch, P. R. J. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450**: 115–118.
- White, F. F. und Yang, B. (2009). Host and pathogen factors controlling the rice-*Xanthomonas oryzae* interaction. *Plant Physiology* **150**: 1677–1686.
- Wiemann, P., Sieber, C. M. K., von Bargen, K. W., Studt, L., Niehaus, E.-M., Espino, J. J., Huß, K., Michielse, C. B., Albermann, S., Wagner, D., Bergner, S. V., Connolly, L. R., Fischer, A., Reuter, G., Kleigrewe, K., Bald, T., Wingfield, B. D., Ophir, R., Freeman, S., Hippler, M., Smith, K. M., Brown, D. W., Proctor, R. H., Münsterkötter, M., Freitag, M., Humpf, H.-U., Güldener, U. und Tudzynski, B. (2013). Deciphering the cryptic genome: Genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. *PLoS Pathogens* **9**: e1003475.
- Wiemann, P., Willmann, A., Straeten, M., Kleigrewe, K., Beyer, M., Humpf, H.-U. und Tudzynski, B. (2009). Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: genes, their function and regulation. *Molecular Microbiology* **72**: 931–946.
- Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K. V., Cano, L. M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B. J. und Kamoun, S. (2007). Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *The Plant Cell Online* **19**: 2349–2369.
- de Wit, P. J. G. M., Mehrabi, R., Van Den Burg, H. A. und Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Molecular Plant Pathology* **10**: 735–747.

- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681–692.
- Wolf, T., Shelest, V. und Shelest, E. (2013). Motif-based method for the genome-wide prediction of eukaryotic gene clusters. In *New Trends in Image Analysis and Processing - ICIAP 2013*, 389–398. Springer.
- Woloshuk, C. P., Foutz, K. R., Brewer, J. F., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. und Payne, G. A. (1994). Molecular characterization of aflR, a regulatory locus for aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2408–2414.
- Xie, X., Meehan, M. J., Xu, W., Dorrestein, P. C. und Tang, Y. (2009). Acyltransferase mediated polyketide release from a fungal megasynthase. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 8388–8389.
- Xue, M., Yang, J., Li, Z., Hu, S., Yao, N., Dean, R. A., Zhao, W., Shen, M., Zhang, H., Li, C., Liu, L., Cao, L., Xu, X., Xing, Y., Hsiang, T., Zhang, Z., Xu, J.-R. und Peng, Y.-L. (2012). Comparative analysis of the genomes of two field isolates of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genetics* **8**: e1002869.
- Yang, G., Rose, M. S., Turgeon, B. G. und Yoder, O. C. (1996). A polyketide synthase is required for fungal virulence and production of the polyketide T-toxin. *The Plant Cell Online* **8**: 2139–2150.
- Zaffarano, P. L., McDonald, B. A. und Linde, C. C. (2008). Rapid speciation following recent host shifts in the plant pathogenic fungus *Rhynchosporium*. *Evolution* **62**: 1418–1436.
- Zaffarano, P. L., McDonald, B. A. und Linde, C. C. (2011). Two new species of *Rhynchosporium*. *Mycologia* **103**: 195–202.
- Zhan, J., Fitt, B. D. L., Pinnschmidt, H. O., Oxley, S. J. P. und Newton, A. C. (2008). Resistance, epidemiology and sustainable management of *Rhynchosporium secalis* populations on barley. *Plant Pathology* **57**: 1–14.
- Zhan, J. und McDonald, B. A. (2013). Experimental measures of pathogen competition and relative fitness. *Annual Review of Phytopathology* **51**: 131–153.
- Zhou, H., Qiao, K., Gao, Z., Meehan, M. J., Li, J. W.-H., Zhao, X., Dorrestein, P. C., Vederas, J. C. und Tang, Y. (2010a). Enzymatic synthesis of resorcylic acid lactones by cooperation of fungal iterative polyketide synthases involved in Hypothemycin biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **132**: 4530–4531.
- Zhou, H., Qiao, K., Gao, Z., Vederas, J. C. und Tang, Y. (2010b). Insights into Radicicol biosynthesis via heterologous synthesis of intermediates and analogs. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 41412–41421.

A. Anhang Oligonukleotide

Tabelle A.1.: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
qRT-Oligonukleotide	
PKS1_RT_s	GGT GAA GGC TTT GCA GCT GTC ATT A
PKS1_RT_as	CGA GTT GAC GCC TGT CTC TCT GAT TAT
PKS2_RT_s	AGA CGA TTC TAT CCG CGC AAT T
PKS2_RT_as	GGT GTT CTT TGG ATC GAG CCC ATA T
PKS3_RT_s	GCT TAC CAA GGC CCC AAG TGT CTA GTA AT
PKS3_RT_as	TGC TGG GGC TCG TCT GAG AAT AAT AT
PKS4_RT_s	GAA GGC GCT GGC ATG CTT ATA TTA A
PKS4_RT_as	TGG AGC TGC AGT TAG AAC CTT GAT TAA
PKS5_RT_s	GGA GTC ATA CCT CCA AAT CTC CAC TTT
PKS5_RT_as	GGC CAT TTT TGA GCT ATT GTG GG
PKS6_RT_s	TCG GAG AAG TGC GGT CCT ACA AAT
PKS6_RT_as	GCC GAC TTG AGC TTT CAG TCA CAT TT
PKS7_RT_s	GCT TCA CAG CAG ATT TCC AGC AAA T
PKS7_RT_as	CAT GGC TGA TAC GGT TGC TGA TAA TA
PKS8_RT_s	TCT GAG CGA GGC ATT GAA GGT AAT
PKS8_RT_as	GCT GAA GGC GCA GTG TCA ATA ATT
PKS9_RT_s	CTA GCT TCC TGC ATG GCA ATC TCA T
PKS9_RT_as	TCA GTA CCC CCA ACA GCC ATC AT
PKS10_RT_s	ACA TAT CCC CAC GAC AAA TGG AGA AGT
PKS10_RT_as	CAT TCT CGT CCT GAT CCT TGA TCT CTT
PKS11_RT_s	GCT CTC CTC GCT CAA CTC CAG AAC TA
PKS11_RT_as	GAA AAG AAG GCC CGG AAA GGT AGA
PKS12_RT_s	CGC AGC GAT GTC CAT GGC TAT TAT
PKS12_RT_as	GGT ATC CTG ATG CGA CGA ACA GAA TA
PKS13_RT_s	CCG CAT GAC AAG AGC ACC TCT CTA
PKS13_RT_as	AAG CCA CTG GAG CAG ATG GTC AA
NRPS1_RT_s	CCT TCC CAC GTC TTT CTG GCA ATA
NRPS1_RT_as	ATC TCA TCT TTC CCC TCC TCT CTC ACT A

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
NRPS2_RT_s	TAC ACG TCT CCG GGA CAA AGA ACA A
NRPS2_RT_as	GGA GCT CTC GTT TCG ATG AAT CGT
NRPS3_RT_s	CTG ATC CGA TGG GAA CAG CAT AGT AAA
NRPS3_RT_as	CGA TTG CAG AGA TTC CAC GCA TAT
NRPS4_RT_s	AAA CCT CGC AGC TCC ATT CGG TAT A
NRPS4_RT_as	CGA ATT TGA CAC TGC CCT CTC GT
PME1_RT_s	CGG TCG ATT TTG TGT TTG GGA TTT
PME1_RT_as	GCT TTA TCC AAA ACA ATG TAT CCT GTC GA
PME2_RT_s	GAC TTC AGC TCC AGC TGG TGC ACT A
PME2_RT_as	CTC TGG GAG CCT GTG GAT GTT GT
PME3_RT_s	CAG GCG GGT GCA AAT GCT CTT
PME3_RT_as	GCA GAT TTG AGT GGC CGC AAG T
PME4_RT_s	AAG ACC GTC CAG GAG GGT TCA AAT
PME4_RT_as	CGT TGA GCG GTG GAA AGT AAA CTT GT
PME5_RT_s	CAC AGC ATT GCA GCT ATC AGC TCA A
PME5_RT_as	CTA GTT GTG GAT GAG CTG CCA ATG A
GPD_RT_s	TCT GCT AAG GAT TGG CGC GG
GPD_RT_as	GCT TGC CGT TGA GCT CTG GG
HO05J24_RT_s	GTG CGC TGT GGT CAA GAT GTT
HO05J24_RT_as	TAG TGA TAT CGC TCA TGC CGG
Oligonukleotide zur Erstellung der Deletionsmutanten	
07338_PKS1_s	AGC ATA GGC GGC GCC AAT CT
07338_PKS1_as	ATG CCG CGC TTG CTG AGC TT
07338_PKS1_fusion1	GCT CTG TAC AAC ATT CGG AG
07338_PKS1_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCG AGC TGA GTA TTC TGG ACC A
07338_PKS1_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAT GAC GGC GGA ATG GCA AGT C
07338_PKS1_fusion4	GCC GGT CCA GTT CTG CAA GT
07338_PKS1_fusionA	GAT CCG ACA AAG TCA TGG TC
07338_PKS1_fusionB	GAT TCT GCC CAA CGG TAG TG
07338_PKS1_test5'	CAA AAA TCG CAA AGA TAC AA
07338_PKS1_test3'	TAA GTT CTG AGA AGT TTG GA
03915_PKS2_s	CCG ATG GGC TTG CAC ATG CT
03915_PKS2_as	AAT TGG AGC CGC CTA TGC CG
03915_PKS2_fusion1	TTC CAG CGC CAC ATC CGT CT

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
03915_PKS2_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCC CGG CGT CCA TTG CTC AAA A
03915_PKS2_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAT TCC ATC GAT CTC ACC GCC G
03915_PKS2_fusion4	TGT GCG AAA GAC CCG TCC GA
03915_PKS2_fusionA	CGA TAT CGC CGA GTT GTG AT
03915_PKS2_fusionB	GTC CAT ACA CCA CAA TCG CT
03915_PKS2_test5'	GCA TAT TCA AGC AAA GAT GG
03915_PKS2_test3'	AGC CAA AAG CTA CTG GTA AG
05345_PKS3_s	GGC TCC GAG GTA CAA TGG CT
05345_PKS3_as	TCA CGC ATC CCC ATG GTG GT
05345_PKS3_fusion1	CTG GAG CGT ACA GCA TAA TG
05345_PKS3_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCT CCA GTG CGG TTG TAA CAC A
05345_PKS3_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAG AGA AGA TGC GAT TGC GGC G
05345_PKS3_fusion4	TTT TTC GGG ACC GGC CAA TC
05345_PKS3_fusionA	TAA CGC AGC TCG GAA CTA AG
05345_PKS3_fusionB	GAC CAG TCA CTG GGA GTC CA
05345_PKS3_test5'	ACC CTT ACA TCC ATG ATT CT
05345_PKS3_test3'	TTC CAT ACT AAT GTA TGC CA
06040_PKS4_s	AAA CGG TCC ACT CGC GGG AA
06040_PKS4_as	CCG CAA CAC CGC CCA AAA TA
06040_PKS4_fusion1	CTC GGG CCG TGA GGC AAA AT
06040_PKS4_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCT GCC GCT GAG CGA TCC ATT G
06040_PKS4_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAT CCT TCC CAT TAG TGT CGA C
06040_PKS4_fusion4	CAA ATC GAA CGC TGG CAT AC
06040_PKS4_fusionA	TGT TCC ATG GCC TTG GCT GG
06040_PKS4_fusionB	TGC GGC ACC TGC TCG ACA AT
06040_PKS4_test5'	TTC CCA CTG GAC GTT TTG AC
06040_PKS4_test3'	ATT GGA AAG ATC GGA GCA CA
11029_PME1_s	ATG TAT CCT GTC GAA TCG GC
11029_PME1_as	GGC TCT CAG AAC GCT TTC TA
11029_PME1_fusion1	TGA CAT TCG TAT TGT GAT CA

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
11029_PME1_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCT CGC CTG GTC AGA ATA CGC G
11029_PME1_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAG ACT TGA CTT ACA GTA GCA T
11029_PME1_fusion4	ATT CCC TGC CTC TAG TAG GT
11029_PME1_fusionA	GTA TCA TCA CTG CGA ATC CG
11029_PME1_fusionB	CTG TAG ATC AGG CCT TCG CA
11029_PME1_test5'	CGG AGC CGC CTA CTG TCA GT
11029_PME1_test3'	TCA TAG TTC TGC TGG ACA AA
01266_RxP1_s	TCG CGA GGT TTG GTG CTG GT
01266_RxP1_as	CGG GCC ATT TCT GTG CTG CA
01266_RxP1_fusion1	CTT CCT TTT CAG TAG CTC CG
01266_RxP1_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCC CCG AAA AGC TCC GTT GTT T
01266_RxP1_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAT CGC CAT CAA CGT TCC GCA T
01266_RxP1_fusion4	TGG CGT CAA ACG GAC TCT GA
01266_RxP1_fusionA	GCG ATG CTC GTG GCC ACT GT
01266_RxP1_fusionB	TCG CAA AGC CAG CAC GGA GA
01266_RxP1_test5'	AGT ATC AAT GTC TTC CAA CC
01266_RxP1_test3'	CGC AAC GCA TTT CTC GAC AA
04424s	GCA TGA TTG CAG GCT CCC CA
04424as	TGA ACC GTC TCC CGA AGC GA
04424_fusion1	TTT TCC GCC AAT GGC TTC CG
04424_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCC TTG AAG GGT ATT CCC GGC C
04424_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAC TCA ATC GAA GGA ACT GTG G
04424_fusion4	CTA TCT CAC CAA TCC CGA CG
04424_fusionA	TCG GCC GGA GAT GTA ACA GA
04424_fusionB	CTG AAC GCA CGC ATG CAC GT
11236s	AAC CCC CCA AGC CCA ACG TT
11236as	CGG CAT TCT AAC ATT CGC GA
11236_fusion1	TGC GAG ACG CTT GCC TGA CA
11236_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCT TTC GCG AGA CGG TGC TGG T

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
11236_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAT TCC CCG TGC CCT TTG CTT T
11236_fusion4	GCA TCG TGC CCT TCT TGC GA
11236_fusionA	GGT TGG TTG GGC CAT TGC GT
11236_fusionB	ACA GCG ATG GCA AGA TTT GG
11236_test5'	GGT TCA GGA CCC ATT CCA GA
11236_test3'	GCA GAA GAA GGG CAA GAA GT
19382s	CTT TCC CGC CCT CAT CCG AA
19382as	ACG GCA AAC CGG TCA CAT GG
19382_fusion1	CAA CAC TGC TGC GGC ATC GA
19382_fusion2	CAG CCC TTC TCT CTG CGT CCG CAA ACG CAT CTC CAT TCG G
19382_fusion3	TTC ATT TTC GGG AGA CGA GAC GAT CAG ATT TCC AAC CTG G
19382_fusion4	CGG ATC CTA CTC TTG GCA AC
19382_fusionA	GTC CAG AGA TTT CGT CGA GA
19382_fusionB	TGA GCT CTC AGC TAT ACG GT
19382_test5'	ATA AAA GAC AGG GTT TCG AG
19382_test3'	CAA TTG CTT AAG TAA GTG TT
ble_fusion_s	GGA CGC AGA GAG AAG GGC TG
ble_fusion_as	TCT CGT CTC CCG AAA ATG AA
test_3'Int(s)	CAT TGG ACC TCG CAA CCC TAG
test_5'Int(as)	CCG GTC CCG GAT TAA TAA TC
Oligonukleotide für das SST	
leader_bla_1	AAT TCA TGA GTA TTC AAC ATT TCC GTG TCG CCC TTA TTC CCT TTT TTG CGG CAT TTT GCC TTC CTG TTT TTG CTG C
leader_bla_2	GGC CGC AGC AAA AAC AGG AAG GCA AAA TGC CGC AAA AAA GGG AAT AAG GGC GAC ACG GAA ATG TTG AAT ACT CAT G
SP_NIP1_1	AAT TCA TGA AAT TCC TCG TAC TGC CTC TCT CCC TTG CCT TTC TTC AGA TTG GCC TCG TCT TCT CTA CGC CGG C
SP_NIP1_2	GGC CGC CGG CGT AGA GAA GAC GAG GCC AAT CTG AAG AAA GGC AAG GGA GAG AGG CAG TAC GAG GAA TTT CAT G

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
SP_NIP2_Eco	ATC GAA GAA TTC ATG AAG TAT CTC
SP_NIP2_Not	ACG ACA GCG GCC GCG GCA TGG GTG
SP+aa_NIP2_Not	ATT GCC GCG GCC GCA TCT CCA ATC
SP_NIP3_1	AAT TCA TGC TGC CCA AGA CGT TAA TCA TTT GCC TGC TCG CAA CTA CAG CCC AAG CCG C
SP_NIP3_2	GGC CGC GGC TTG GGC TGT AGT TGC GAG CAG GCA AAT GAT TAA CGT CTT GGG CAG CAT G
GPD_Eco	CCT TCT GAA TTC GAA TCA TGG CTC
GPD_Not	AGA TGC GCG GCC GCG GCG TAG TGG
SP_PME1_1	GGC CGC ACA CCA TAC CGT ATT AAC ACA CAC CAA GCC GTT GAC CAA AAT AGA AGC CCG CAT G
SP_PME1_2	AAT TCA TGC GGG CTT CTA TTT TGG TCA ACG GCT TGG TGT GTG TTA ATA CGG TAT GGT GTG C
SP_PME2_1	GGC CGC GGC GAA AAC GGC TGT AAC CAG CGA ACT TAG AGC AAG AAG GAA ACG CAT G
SP_PME2_2	AAT TCA TGC GTT TCC TTC TTG CTC TAA GTT CGC TGG TTA CAG CCG TTT TCG CCG C
SP_PME3_1	GGC CGC GGC AGT TAC TAG GCT GCA GAG CAG CGC TAG AGA AAG AAA GGA ACG CAT G
SP_PME3_2	AAT TCA TGC GTT CCT TTC TTT CTC TAG CGC TGC TCT GCA GCC TAG TAA CTG CCG C
SP_PME4_1	GGC CGC TGC GGT TAC AAG GCT GAA GAG CAG CGC TAC GGA CAG GAA GGA ACG CAT G
SP_PME4_2	AAT TCA TGC GTT CCT TCC TGT CCG TAG CGC TGC TCT TCA GCC TTG TAA CCG CAG C
SP_PME5_1	GGC CGC TGC CAC CAC TTG AGC TGA TAG CTG CAA TGC TGT GAG CAG TCC AAA GAC GAC CCG CTT GAG GCT TGA CAT G
SP_PME5_2	AAT TCA TGT CAA GCC TCA AGC GGG TCG TCT TTG GAC TGC TCA CAG CAT TGC AGC TAT CAG CTC AAG TGG TGG CAG C
RxP1_15aa_1	GGC CGC TAA GCG GTC GAG AAG GTG TTG GTC ATA GCT AGG GGG ATC ACT CAT G
RxP1_15aa_2	AAT TCA TGA GTG ATC CCC CTA GCT ATG ACC AAC ACC TTC TCG ACC GCT TAG C
RxP1_20aa_1	GGC CGC TTT TCT GAG TGC GTT TAA GCG GTC GAG AAG GTG TTG GTC ATA GCT AGG GGG ATC ACT CAT G

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
RxP1_20aa_2	AAT TCA TGA GTG ATC CCC CTA GCT ATG ACC AAC ACC TTC TCG ACC GCT TAA ACG CAC TCA GAA AAG C
RxP1_25aa_1	GGC CGC GAG CTC GAC GCT TGA TTT TCT GAG TGC GTT TAA GCG GTC GAG AAG GTG TTG GTC ATA GCT AGG GGG ATC ACT CAT G
RxP1_25aa_2	AAT TCA TGA GTG ATC CCC CTA GCT ATG ACC AAC ACC TTC TCG ACC GCT TAA ACG CAC TCA GAA AAT CAA GCG TCG AGC TCG C
Lokalisierungsstudien RcRxP1	
mCherry_NotI_s	TAC GAG CGG CCG CAA TGG TGA GCA AGG GCG AGG A
mCherry_EcoRI_as	GAC TCT GAA TTC TTA CAG CTT CGA TCT CTT GT
RxP1_AscI_s	TCA GGC GCG CCA TCA TGA GTG ATC CCC CTA G
RxP1_NotI_as	ACT GGC GGC CGC ATT CGG CTT CCG GTA C
RxP1_mCh_s	GTC TTC GGA ACG GAA CTC CAT CAT
RxP1_mCh_as	GCG CAG CTT CAC CTT GTA GAT GA
Sequenzüberprüfung PKS13	
PKS13_seq1s	GAC GGG ACC AAT CGG CCT TT
PKS13_seq2as	GGT GAC GAG GAG GAA TTA
PKS13_seq3as	GCG CTC TAA TTT ATC TTT AT
PKS13_seq4as	GCT ATG CAG GTG ATC AGA
Sequenzieroligonukleotide	
SST_seq_s	CTC TTG CCC GGC GTC AAT AC
SST_seq_as	CAA AAT CAA CGG GAC TTT CC
ToxA2s_sequ	CAG CGA TAG CTG ACA ATG AAT G
TrpC2as_sequ	CCA ACG ATC TTA TAT CCA G
pJET1.2_forward	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC
pJET1.2_reverse	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
M13_forward	GTA AAA CGA CGG CCA G
M13_reverse	CAG GAA ACA GCT ATG AC
Seq_OE_PKS1_s	TAT TCT CCG ATG ATG CAA TA
Seq_OE_PKS1_as	TGT CAA CAA GAA TAA AAC GC
Seq_Link_OE_s	CAC ACC AGC CTT TCC ACT TC
Seq_OE_Prom_as	CAT TGG AGT GGT GAA ATC CA
Konstrukt zur Überexpression von <i>PKS1</i>	
OE_Start_PKS1_s	TCT AGA ATG GTT TCC ACT AAG CCA GTC A
OE_Start_PKS1_as	GGG CCC TAG ACT TGT TGA ATG AGA TT

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
OE_5UTR_PKS1_s	GGT ACC GTT CTT TCA TTG CTC CGT TAT
OE_5UTR_PKS1_as	ACT AGT GCC AAA GTT GGA AAG TAC AGG AGA
OE_ToxA_s	GCG GCC GCC TCG ACG GTA TCG ATT GGA ATG CA
OE_ToxA_as	TCT AGA CCT ATA TTC ATT CAT TGT CA
alcA_NotI_s	GCG GCC GCC CGG ATA GTT CCG ACC TA
alcA_XbaI_as	TCT AGA TTT GAG GCG AGG TGA TAG GA
Lin1_XbaI_BamHI	CTA GTT CTA GAG GAT CCA
Lin2_XbaI_BamHI	CTA GTG GAT CCT CTA GAA

Tabelle A.2.: Übersicht Oligonukleotide für die Erstellung der Deletionsmutanten.

Gen-ID	Oligonukleotidpaar 5'- Fragment	Resistenzkassette (Phleomycin)	3'- Fragment	Deletionskonstrukt
zellwandabbauendes Enzym				
11029 (PME1)	11029_PME1_fusion1/ 11029_PME1_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	11029_PME1_fusion3/ 11029_PME1_fusion4	11029_PME1_fusion1/ 11029_PME1_fusion4
Gene für putative Effektorproteine				
04424	04424_fusion1/ 04424_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	04424_fusion3/ 04424_fusion4	04424_fusion1/ 04424_fusion4
11236	11236_fusion1/ 11236_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	11236_fusion3/ 11236_fusion4	11236_fusion1/ 11236_fusion4
01266 (RxP1)	01266_RxP1_fusion1/ 01266_RxP1_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	01266_RxP1_fusion3/ 01266_RxP1_fusion4	01266_RxP1_fusion1/ 01266_RxP1_fusion4
19382	19382_fusion1/ 19382_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	19382_fusion3/ 19382_fusion4	19382_fusion1/ 19382_fusion4
Polyketidsynthasen				
07338 (PKS1)	07338_PKS1_fusion1/ 07338_PKS1_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	07338_PKS1_fusion3/ 07338_PKS1_fusion4	07338_PKS1_fusion1/ 07338_PKS1_fusion4
03915 (PKS2)	03915_PKS2_fusion1/ 03915_PKS2_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	03915_PKS2_fusion3/ 03915_PKS2_fusion4	03915_PKS2_fusion1/ 03915_PKS2_fusion4
05345 (PKS3)	05345_PKS3_fusion1 05345_PKS3_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	05345_PKS3_fusion3/ 05345_PKS3_fusion4	05345_PKS3_fusion1/ 05345_PKS3_fusion4
06040 (PKS4)	06040_PKS4_fusion1/ 06040_PKS4_fusion2	ble_fusion_s/ ble_fusion_as	06040_PKS4_fusion3/ 06040_PKS4_fusion4	06040_PKS4_fusion1/ 06040_PKS4_fusion4

Tabelle A.3.: Übersicht Oligonukleotide für die Überprüfung der Deletionsmutanten. (WT) Wildtyp

Gen-ID	Oligonukleotidpaar WT-Gen vorhanden	Unterschied größe	Amplikon-	5'- Integrationsstelle	3'- Integrationsstelle
zellwandabbauendes Enzym					
11029 (PME1)	11029_PME1_s/ 11029_PME1_as	11029_PME1_fusionA/ 11029_PME1_fusionB		11029_PME1_test5/ test_5'Int(as)	11029_PME1_test3/ test_3'Int(s)
Gene für putative Effektorproteine					
04424	04424s/04424as	04424_fusionA/ 04424_fusionB		-	-
11236	11236s/11236as	11236_fusionA/ 11236_fusionB		11236_test5/ test_5'Int(as)	11236_test3/ test_3'Int(s)
01266 (RxP1)	01266_RxP1_s/ 01266_RxP1_as	01266_RxP1_fusionA/ 01266_RxP1_fusionB		01266_RxP1_test5' test_5'Int(as)	01266_RxP1_test3' test_3'Int(s)
19382	19382s/19382as	19382_fusionA/ 19382_fusionB		19382_test5/ test_5'Int(as)	19382_test3/ test_3'Int(s)
Polyketidsynthasen					
07338 (PKS1)	07338_PKS1_s/ 07338_PKS1_as	07338_PKS1_fusionA/ 07338_PKS1_fusionB		07338_PKS1_test5/ test_5'Int(as)	07338_PKS1_test3/ test_3'Int(s)
03915 (PKS2)	03915_PKS2_s/ 03915_PKS2_as	03915_PKS2_fusionA/ 03915_PKS2_fusionB		03915_PKS2_test5/ test_5'Int(as)	03915_PKS2_test3/ test_3'Int(s)
05345 (PKS3)	05345_PKS3_s/ 05345_PKS3_as	05345_PKS3_fusionA/ 05345_PKS3_fusionB		05345_PKS3_test5/ test_5'Int(as)	05345_PKS3_test3/ test_3'Int(s)
06040 (PKS4)	06040_PKS4_s/ 06040_PKS4_as	06040_PKS4_fusionA/ 06040_PKS4_fusionB		06040_PKS4_test5/ test_5'Int(as)	06040_PKS4_test3/ test_3'Int(s)

Tabelle A.4.: Anlagerungstemperaturen und Elongationszeiten für die PCR und Amplikongröße der PCR-Produkte. (TDW) Touchdown-PCR, (KO) Deletionsmutante (Knockout), (WT) Wildtyp

Oligonukleotidpaar	Anlagerungs- temperatur [°C]	Elongations- zeit [min]	Amplikon [bp]
Erstellung Deletionskonstrukte			
07338_PKS1_fusion1/ 07338_PKS1_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
07338_PKS1_fusion3/ 07338_PKS1_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
07338_PKS1_fusion1/ 07338_PKS1_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
03915_PKS2_fusion1/ 03915_PKS2_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
03915_PKS2_fusion3/ 03915_PKS2_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
03915_PKS2_fusion1/ 03915_PKS2_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
05345_PKS3_fusion1/ 05345_PKS3_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
05345_PKS3_fusion3/ 05345_PKS3_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
05345_PKS3_fusion1/ 05345_PKS3_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
06040_PKS4_fusion1/ 06040_PKS4_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
06040_PKS4_fusion3/ 06040_PKS4_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
06040_PKS4_fusion1/ 06040_PKS4_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
11029_PME1_fusion1/ 11029_PME1_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
11029_PME1_fusion3/ 11029_PME1_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
11029_PME1_fusion1/ 11029_PME1_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
04424_fusion1/ 04424_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000

Oligonukleotidpaar	Anlagerungs- temperatur [°C]	Elongations- zeit [min]	Amplikon [bp]
04424_fusion3/ 04424_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
04424_fusion1/ 04424_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
11236_fusion1/ 11236_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
11236_fusion3/ 11236_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
11236_fusion1/ 11236_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
01266_RxP1_fusion1/ 01266_RxP1_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
01266_RxP1_fusion3/ 01266_RxP1_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
01266_RxP1_fusion1/ 01266_RxP1_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
19382_fusion1/ 19382_fusion2	66 → 45 (TDW)	2	1000
19382_fusion3/ 19382_fusion4	66 → 45 (TDW)	2	1000
19382_fusion1/ 19382_fusion4	66 → 45 (TDW)	5	3600
ble_fusion_s/ ble_fusion_as	55	2	1600
Überprüfung der Rekombinanten			
07338_PKS1_s/ 07338_PKS1_as	60	0,5	215
07338_PKS1_fusionA/ 07338_PKS1_fusionB	60	6	3000 (KO) 5335 (WT)
07338_PKS1_test5'/ test_5'Int(as)	63 → 50 (TDW)	2	1139
07338_PKS1_test3'/ test_3'Int(s)	60	2	1107
03915_PKS2_s/ 03915_PKS2_as	52	0,5	526
03915_PKS2_fusionA/ 03915_PKS2_fusionB	60	8	3004 (KO) 7661 (WT)
03915_PKS2_test5'/ test_5'Int(as)	60	2	1229

Oligonukleotidpaar	Anlagerungs- temperatur [°C]	Elongations- zeit [min]	Amplikon [bp]
03915_PKS2_test3'/ test_3'Int(s)	60	2	1217
05345_PKS3_s/ 05345_PKS3_as	65	0,5	206
05345_PKS3_fusionA/ 05345_PKS3_fusionB		8	2900 (KO) 7994 (WT)
05345_PKS3_test5'/ test_5'Int(as)	63 → 50 (TDW)	2	1174
05345_PKS3_test3'/ test_3'Int(s)	63 → 50 (TDW)	2	1202
06040_PKS4_s/ 06040_PKS4_as	60	0,5	531
06040_PKS4_fusionA/ 06040_PKS4_fusionB	60	7	3071 (KO) 6010 (WT)
06040_PKS4_test5'/ test_5'Int(as)	60	2	1300
06040_PKS4_test3'/ test_3'Int(s)	60	2	1216
11029_PME1_s/ 11029_PME1_as	60	0,5	223
11029_PME1_fusionA/ 11029_PME1_fusionB	60	3	3000 (KO) 2400 (WT)
11029_PME1_test5'/ test_5'Int(as)	60	2	1194
11029_PME1_test3'/ test_3'Int(s)	60	2	1212
04424s/ 04424as	60	0,5	500
04424_fusionA/ 04424_fusionB	50	4	3057 (KO) 4069 (WT)
11236s/ 11236as	60	0,5	309
11236_fusionA/ 11236_fusionB	60	5	3020 (KO) 4819 (WT)
11236_test5'/ test_5'Int(as)	63 → 50 (TDW)	2	1152
11236_test3'/ test_3'Int(s)	63 → 50 (TDW)	2	1214
01266_RxP1_s/ 01266_RxP1_as	52	0,5	558
01266_RxP1_fusionA/ 01266_RxP1_fusionB	63 → 50 (TDW)	3	3142 (KO) 3231 (WT)
01266_RxP1_test5'/ test_5'Int(as)	63 → 50 (TDW)	2	1208

Oligonukleotidpaar	Anlagerungs- temperatur [°C]	Elongations- zeit [min]	Amplikon [bp]
01266_RxP1_test3'/ test_3'Int(s)	63 → 50 (TDW)	2	1218
19382s/ 19382as	60	0,5	545
19382_fusionA/ 19382_fusionB	60	5	3054 (KO) 4095 (WT)
19382_test5'/ test_5'Int(as)	60	2	1113
19382_test3'/ test_3'Int(s)	60	2	1173
SST			
SP_NIP2_Eco/ SP_NIP2_Not	57	0,5	55
SP_NIP2_Eco/ SP+aa_NIP2_Not	57	0,5	103
GPD_Eco/ GPD_Not	60	0,5	160
Lokalisierung RcRxP1			
mCherry_NotI_s/ mCherry_EcoRI_as	60	1	720
RxP1_AscI_s/ RxP1_NotI_as	63 → 50 (TDW)	2	1130
RxP1_mCh_s/ RxP1_mCh_as	55	1	791
Sequenzüberprüfung PKS13			
PKS13_seq1s/ PKS13_seq2as	63 → 50 (TDW)	1	282
PKS13_seq1s/ PKS13_seq3as	63 → 50 (TDW)	2	950
PKS13_seq1s/ PKS13_seq4as	63 → 50 (TDW)	4	1808
Konstrukt zur Überexpression von <i>PKS1</i>			
OE_Start_PKS1_s/ OE_Start_PKS1_as	55	1,5	932
OE_5UTR_PKS1_s/ OE_5UTR_PKS1_as	55	1,5	960
OE_ToxA_s/ OE_ToxA_as	55	1,5	434
alcA_NotI_s/ alcA_XbaI_as	55	1,5	474

Tabelle A.5.: Ermittelte Effizienzwerte für die qRT der verwendeten Oligonukleotidpaare.

Oligonukleotidpaar	Effizienzwert (E)
PKS1_RT_s/ PKS1_RT_as	1,62
PKS2_RT_s/ PKS2_RT_as	1,68
PKS3_RT_s/ PKS3_RT_as	2,00
PKS4_RT_s/ PKS4_RT_as	1,91
PKS5_RT_s/ PKS5_RT_as	1,80
PKS6_RT_s/ PKS6_RT_as	1,92
PKS7_RT_s/ PKS7_RT_as	1,77
PKS8_RT_s/ PKS8_RT_as	1,68
PKS9_RT_s/ PKS9_RT_as	1,40
PKS10_RT_s/ PKS10_RT_as	1,74
PKS11_RT_s/ PKS11_RT_as	1,74
PKS12_RT_s/ PKS12_RT_as	1,53
PKS13_RT_s/ PKS13_RT_as	1,66
NRPS1_RT_s/ NRPS1_RT_as	1,78
NRPS2_RT_s/ NRPS2_RT_as	1,47
NRPS3_RT_s/ NRPS3_RT_as	1,53
NRPS4_RT_s/ NRPS4_RT_as	1,64
PME1_RT_s/ PME1_RT_as	1,41
PME2_RT_s/ PME2_RT_as	1,51
PME3_RT_s/ PME3_RT_as	1,44
PME4_RT_s/ PME4_RT_as	1,40
PME5_RT_s/ PME5_RT_as	1,78
GPD_RT_s/ GPD_RT_as	2,03
HO05J24_RT_s/ HO05J24_RT_as	1,96

B. Anhang DNA-Hybridisierung

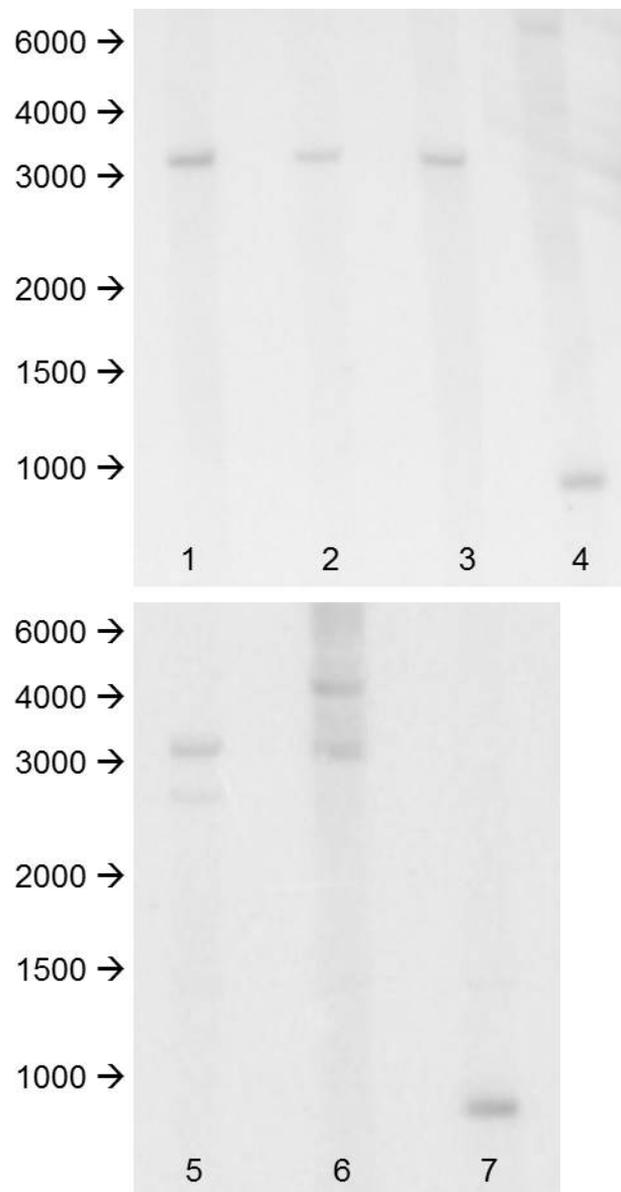


Abbildung B.1.: Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, *PME1*. (1) #443, (2) #456, (3) #488, (4) Wildtyp UK7, (5) #431, (6) #497, (7) Wildtyp UK7

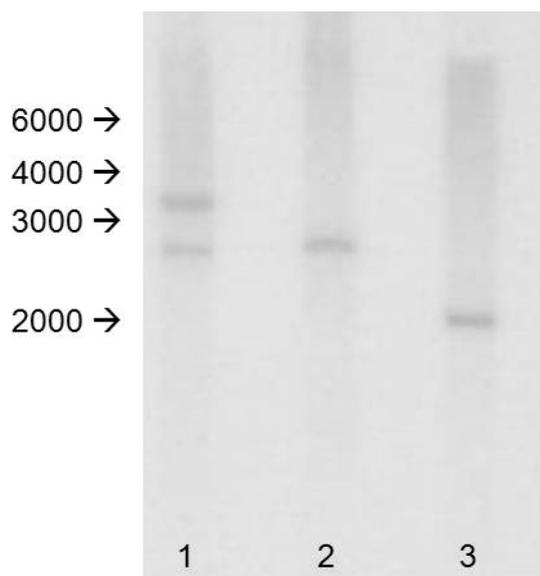


Abbildung B.2.: Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, *RxP1*. (1) #2055, (2) #2217, (3) Wildtyp UK7

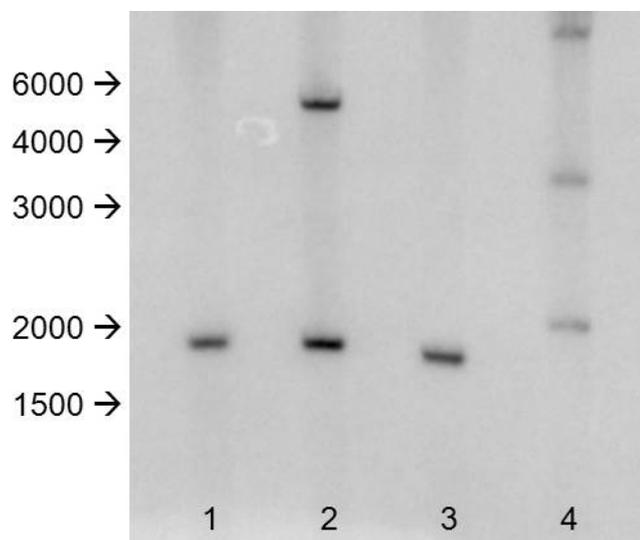


Abbildung B.3.: Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, *PKS1*. (1) #15, (2) #180, (3) #227, (4) Wildtyp UK7

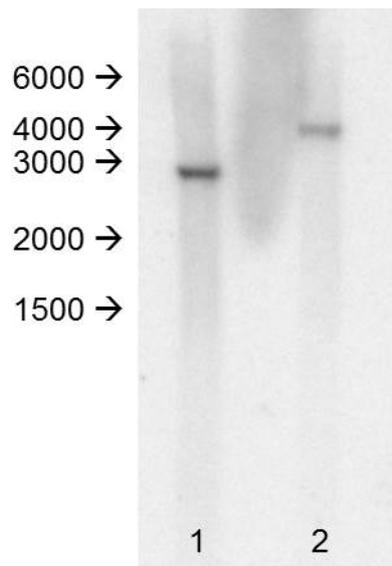


Abbildung B.4.: Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, *PKS2*. (1) #4101, (2) Wildtyp UK7

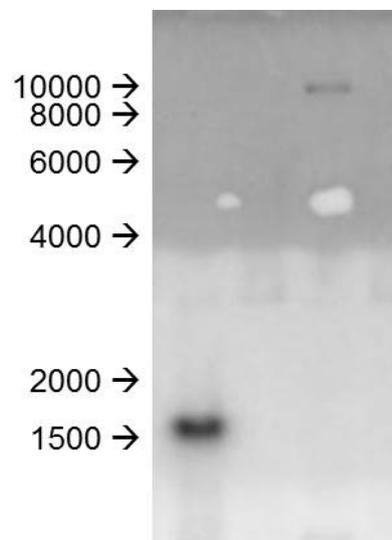


Abbildung B.5.: Phosphor-Screen nach DNA-Hybridisierung, *PKS3*. (1) #5135, (2) Wildtyp UK7

C. Anhang Sekundärstoffwechsel-Gencluster

Tabelle C.1.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS4. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS4:		
mögliches Gen, putative Genfunktion	1	2
Methyltransferase		
3-Ketoacyl-Carrier-Protein-Reduktase		
Cytochrom P450		
PKS4		
Cytochrom P450		
Transkriptionsfaktor		
Cytochrom P450		
Methyltransferase		
Cytochrom P450		
Hydrolase		
Cholindehydrogenase		
Dioxygenase		
DMATS1		
unch.		
MFS (major facilitator superfamily), Transporter		
Cytochrom P450		
NmrA-ähnlich, negativer Transkriptionsregulator		

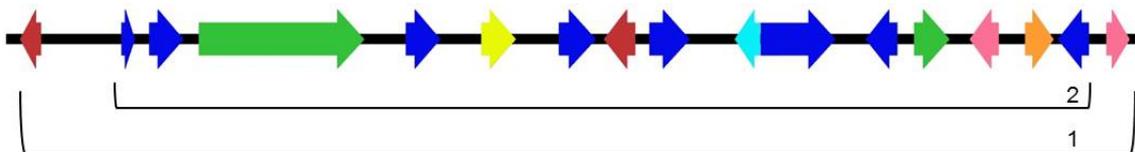


Abbildung C.1.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS4, schematisch. Cluster umfasst ca. 52 kb (Klammer 2) bzw. 54 kb (Klammer 1), (grün) PKS bzw. DMATS, (gelb) Transkriptionsfaktor, (blau) Oxidoreduktasen, (dunkelrot) Transferasen, (orange) Transporter der MFS, (hellblau) Hydrolase, (rosa) sonstige Gene, (Klammer 1) Vorhersage HKI, (Klammer 2) Vorhersage SMURF

Tabelle C.2.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS10. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS10:

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	2
MFS (major facilitator superfamily), Transporter		
Dehydratase		
Dioxygenase		
Citratsynthase		
unch.		
unch.		
unch.		
PKS10		
Protease		
Oxidase-Domäne		
unch.		
Xylanase		

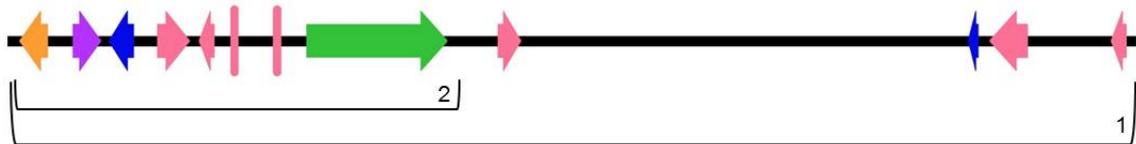


Abbildung C.2.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS10, schematisch. Cluster umfasst ca. 63 kb (Klammer 1) bzw. 25 kb (Klammer 2), (grün) PKS10, (blau) Oxidoreduktasen, (orange) Transporter der MFS, (violett) Lyasen, (rosa) sonstige Gene, (Klammer 1) Vorhersage HKI, (Klammer 2) Vorhersage SMURF

Tabelle C.3.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS3 + PKS13. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013) für PKS3, es wurden zwei verschiedene mögliche Sekundärstoffwechsel-Gencluster vorhergesagt, die Überschneidung ist in schwarz dargestellt, (3) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013) für PKS13, (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS3 + PKS13:

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	3	2
unch.			
Cholindehydrogenase			
Phosphatidylinositol Phospholipase C			
Pigment Biosynthese Protein			
PKS3			
Transkriptionsfaktor			
Transkriptionsfaktor			
unch.			
unch.			
2-Methylcitrat-Dehydratase			
Citratsynthase			
MFS (major facilitator superfamily), Transporter			
unch.			
Transferase			
Hydratase			
PKS13			
PCL7, Cyclin-ähnliches Protein			
Aminopeptidase			
KRE9, Zellwandsynthese			
Cystathionin-Synthase			
SRP102 („signal recognition particle“)			
Palmitoyltransferase			
Untereinheit ATP Synthase			

Tabelle C.4.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS6. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), es wurden zwei verschiedene mögliche Sekundärstoffwechsel-Gencluster vorhergesagt, die Überschneidung ist in schwarz dargestellt, (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS6:

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	2
unch.		
Methyltransferase (LaeA-ähnlich)		
unch.		
unch.		
Maltose Permease		
Purinnukleosid Permease		
unch.		
unch.		
ABC Transporter		
PKS6		
unch.		

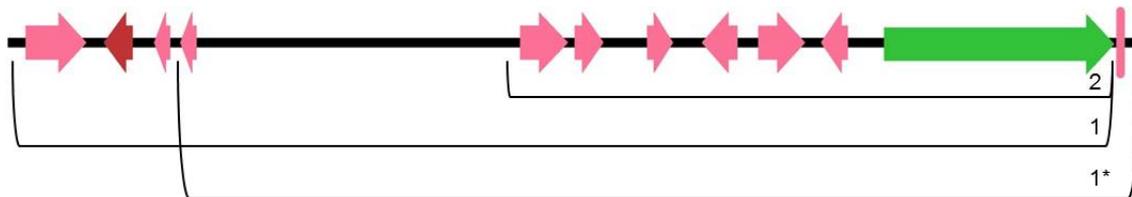


Abbildung C.4.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS6, schematisch. Cluster umfasst ca. 48 kb (Klammer 1), 42 kb (Klammer 1*) bzw. 26 kb (Klammer 2), (grün) PKS6, (dunkelrot) Transferase, (rosa) sonstige Gene, (Klammer 1 bzw. 1*) Vorhersage HKI, (Klammer 2) Vorhersage SMURF

Tabelle C.5.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS8. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), es wurden zwei verschiedene mögliche Sekundärstoffwechsel-Gencluster vorhergesagt, die Überschneidung ist in schwarz dargestellt, (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS8:

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	2
unch.		
Proteinkinase-Domäne		
Reduktase		
PKS8		
unch.		
MCH1 (Monocarboxylat Permease Homolog)		
TMS1, Membranprotein		
Dehydrogenase		
Lyase		
DNA mismatch repair protein		
unch.		
Oxidoreduktase		
Elektronentransfer Flavoprotein		
Nukleosom Remodelling Komplex		
unch.		
Helikase		
unch.		
unch.		

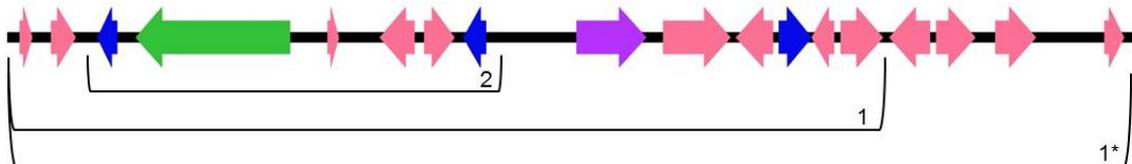


Abbildung C.5.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS8, schematisch. Cluster umfassen ca. 45 kb (Klammer 1), 58 kb (Klammer 1*) bzw. 21 kb (Klammer 2), (grün) PKS8, (blau) Oxidoreduktasen, (violett) Lyasen, (rosa) sonstige Gene, (Klammer 1 bzw. 1*) Vorhersage HKI, (Klammer 2) Vorhersage SMURF

Tabelle C.6.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS12 + NRPS2. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013) für PKS12, es wurden zwei verschiedene mögliche Sekundärstoffwechsel-Gencluster vorhergesagt, die Überschneidung ist in schwarz dargestellt, (3) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013) für NRPS2, (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS12 + NRPS2:

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	3	2
unch.			
unch.			
Oxygenase			
Acyl-CoA-Synthetase			
β -Keto-Acyl-Synthase			
Transferase			
unch.			
NRPS2			
Glucose-/ Galactose-Transporter			
F-box-Domäne-Protein			
unch.			
unch.			
PKS12			
Glycogensynthase			
unch.			
Ulp1, postranslationale Modifikation			
Cytochromoxidase Vorläufer			
unch.			
FEN1, Fettsäureelongase			
unch.			
unch.			
RPL4A, ribosomales Protein			
Histondeacetylase			
Oxidoreduktase			
hPOT1_OB-ähnliche Domäne, Telomerlängenregulation			
Monoxygenase			

Tabelle C.7.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS9. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010)

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS9:

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	2
Transferase-Domäne		
Transferase		
unch.		
MFS (major facilitator superfamily), Transporter		
Transkriptionsfaktor		
unch.		
Hemerythrin-ähnlich		
Monooxygenase		
Permease		
unch.		
unch.		
Trypsin Vorläufer		
Dehydrogenase		
Oxidoreductase		
Multidrug Resistenzprotein		
Serinhydrolase		
PKS9		
unch.		
Multidrug Resistenz assoziiertes Protein		
unch.		
Peroxin-1		
DNA Replikationslizenzierungsfaktor		
unch.		
Transkriptionsfaktor		
unch.		
SUMO Protease		

Tabelle C.9.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS1. (unch.) uncharakterisiertes Gen, (1) Vorhersage HKI Jena (Wolf *et al.*, 2013), (2) Vorhersage SMURF (Khaldi *et al.*, 2010) ergab kein Sekundärstoffwechsel-Gencluster

Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS1 (PKS-NRPS):

mögliches Gen, putative Genfunktion	1	2
Ubiquitin-ähnlich, posttranslationale Modifikation		
MAM3, nötig für Mitochondrienmorphologie		
unch.		
Cholindehydrogenase		
SWF1 (spore wall formation), Zellwandausbildung		
Transkriptionsfaktor		
unch.		
SIS2, spezifisch für den Zellzyklus		
Transkriptionsfaktor		
unch.		
O-Fucosyl-Transferase		
PKS1		



Abbildung C.9.: Sekundärstoffwechsel-Gencluster PKS1, schematisch. Cluster umfasst ca. 57 kb, (grün) PKS1, (gelb) Transkriptionsfaktoren, (blau) Oxidoreduktase, (dunkelrot) Transferase, (rosa) sonstige Gene

D. Anhang Expressionsanalysen *in planta*

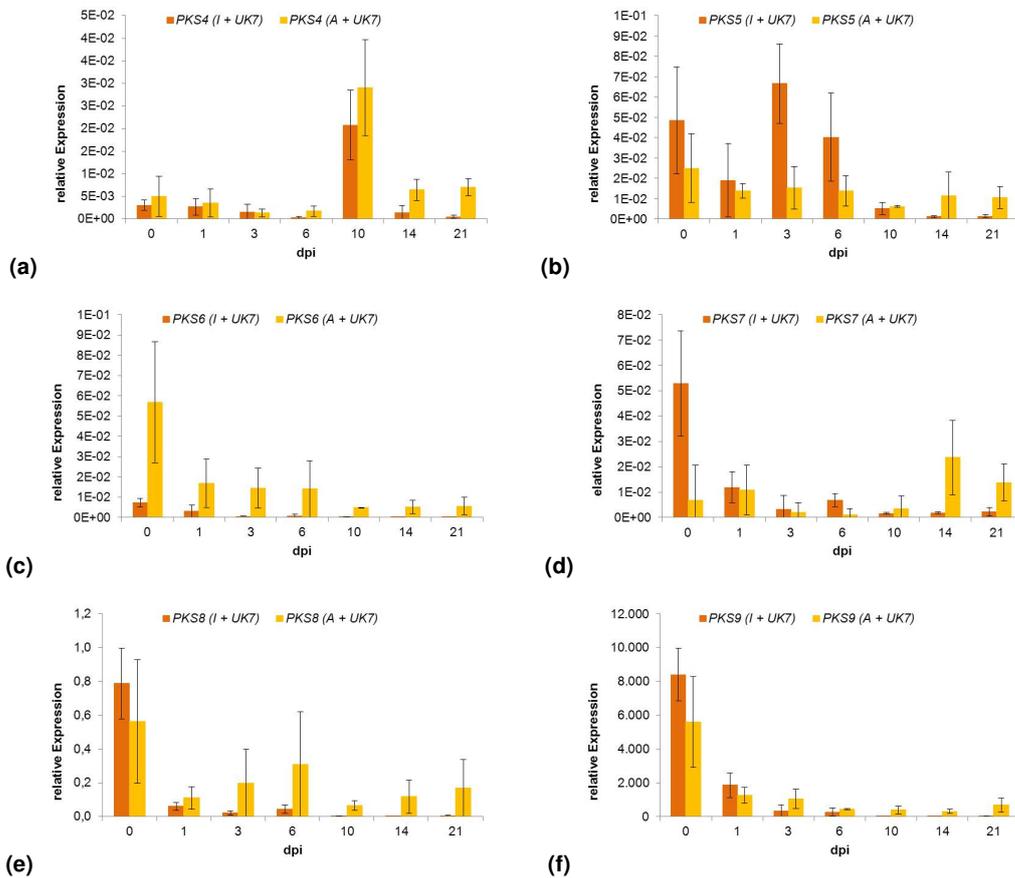


Abbildung D.1.: Expression von *PKS4-9* *in planta* während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) *PKS4*-Expression, (b) *PKS5*-Expression, (c) *PKS6*-Expression, (d) *PKS7*-Expression, (e) *PKS8*-Expression, (f) *PKS9*-Expression, (I) Ingrid: hoch susceptible Gerstensorte, (A) Atlas: moderat susceptible Gerstensorte, (dpi) Tage nach Inokulation, n=4

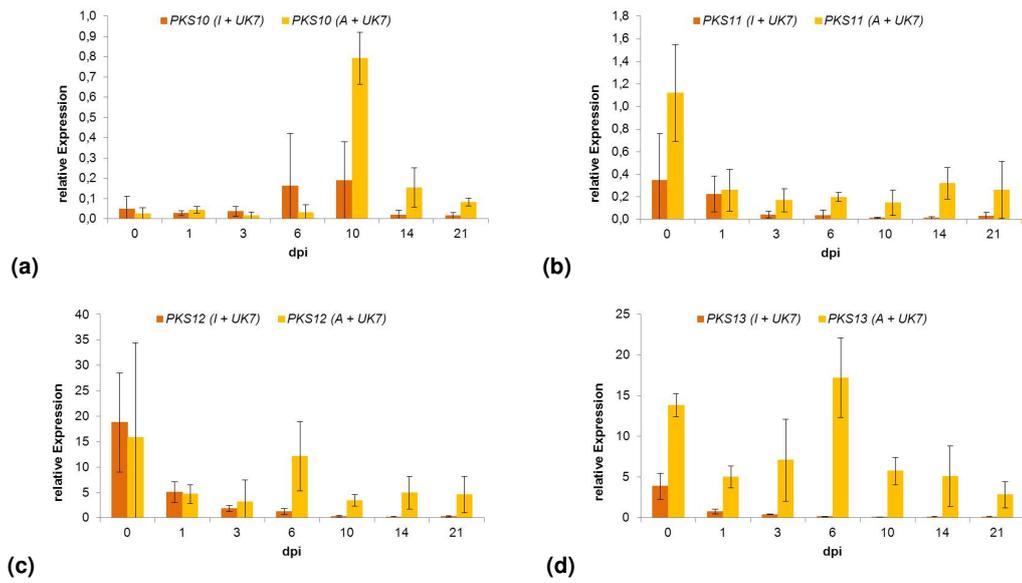


Abbildung D.2.: Expression von *PKS10-13* *in planta* während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) *PKS10*-Expression, (b) *PKS11*-Expression, (c) *PKS12*-Expression, (d) *PKS13*-Expression, (I) Ingrid: hoch susceptible Gerstensorte, (A) Atlas: moderat susceptible Gerstensorte, (dpi) Tage nach Inokulation, n=4

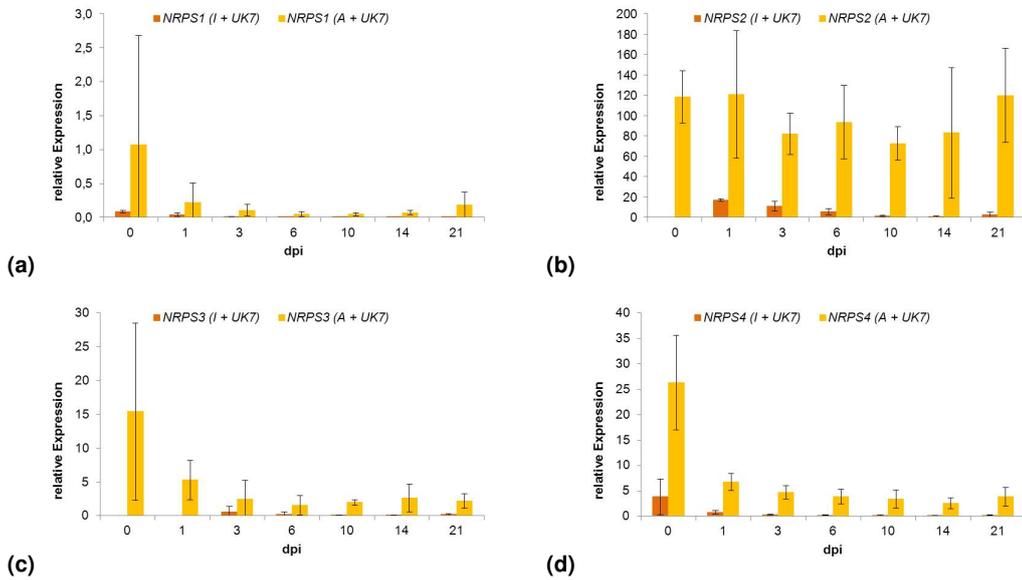


Abbildung D.3.: Expression von *NRPS1-4* *in planta* während der Interaktion mit zwei verschiedenen Gerstensorten. (a) *NRPS1*-Expression, (b) *NRPS2*-Expression, (c) *NRPS3*-Expression, (d) *NRPS4*-Expression, (I) Ingrid: hoch susceptible Gerstensorte, (A) Atlas: moderat susceptible Gerstensorte, (dpi) Tage nach Inokulation, n=4

Danksagung

Diese Seiten sind allen gewidmet, die mich während meiner Doktorandenzeit unterstützt haben.

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dierk Scheel dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat in seiner Abteilung als Doktorandin tätig zu sein sowie für die Übernahme des Erstgutachtens zu meiner Arbeit.

Dr. Wolfgang Knogge danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen, die Betreuung und die Hilfestellungen und Diskussionen zu meinem Thema.

Bei meiner Mentorin Prof. Dr. Sabine Rosahl möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand sowie die Überlassung des GFP-exprimierenden *P. infestans*-Stammes.

Meinem Zweit- und Drittgutachter danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Bei Prof. Dr. B. Hause und Prof. Dr. P. Tudzinsky möchte ich mich für die Überlassung von mCherry bzw. des alcA-Promotors bedanken.

Dr. Martin Münsterkötter und Dr. Aura Navarro-Quezada danke ich für ihre Arbeit an der Genomsequenzierung und -annotation bzw. an der EST-Datenbank und ihre Hilfe, wenn ich Fragen hatte.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die Chemiker aus der Abteilung NWC, die mir eine sehr, sehr große Hilfe bei der Identifizierung von $C_{15}H_{14}O_6$ waren und niemals müde wurden etwas Neues auszuprobieren um die Struktur aufzuklären. Ich danke: Dr. Tilo Lübken, Dr. Jürgen Schmidt, Dr. Norbert Arnold, Dr. Andrea Porzel, Dr. Katrin Franke, Anja Ehrlich, Martina Lerbs, Alexander Otto und Nicole Hünecke.

Thomas Wolf und Dr. Ekaterina Shelest vom HKI Jena waren mir eine große Hilfe bei der Sekundärstoffwechsel-Gencluster-Analyse. Vielen Dank dafür.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe: Daniel Penselin, Jenny

Danksagung

Graap und Susanne Kirsten sowie Andrea Leitner und Sylvia Siersleben danke ich für das tolle Arbeitsklima und eure Hilfe im Labor, wann immer sie nötig war.

Bei meinen HiWis Anna Thamm, Andreas Matern und Jenny Graap möchte ich mich für die Hilfe beim Erstellen, Überprüfen und der Charakterisierung der Mutanten bedanken. Danke, dass ihr auch bei der Millionsten PCR und Tausendsten Klonierung nicht laut gemurrt habt.

Bei Andreas Matern und Xiaohan Wang möchte ich mich für ihre Mitarbeit an den Projekten von RxP1 bzw. PME1 im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten bedanken.

Ines und Micha: an euch geht ein riesiges Dankeschön, für eure Begleitung durch die Doktorandenzeit. Danke für „Das-mit-mir-freuen“, wenn alles toll war und die aufbauenden Worte, wenn *Rhyncho* mal wieder nicht so wollte wie ich.

Steffi, Anett, Andreas, Heike und Susi danke ich für die moralische Unterstützung, besonders auf den „letzten Metern“.

Zu guter Letzt geht noch ein Dank an meine Schwester Sabine, Matthias, meine Eltern sowie alle Freunde außerhalb des Institutes für ihre Unterstützung, auch wenn ihr immer sagt, dass ihr nicht so recht wisst, was ich da eigentlich im Labor treibe.

Lebenslauf

persönliche Daten

Name	Claudia Wenzel, geb. Böhm
akademischer Grad	Diplom-Biochemikerin
Geschlecht	weiblich
Geburtsdatum	27.11.1980
Geburtsort	Leipzig
Nationalität	deutsch

Werdegang

09/1987 - 07/1999	Schulausbildung in Leipzig Abschluss: Abitur (Leipzig, 08.07.1999)
09/1999 - 06/2002	Ausbildung zur Chemielaborantin in Halle/Saale Abschluss: IHK-Facharbeiter (Halle/Saale, 28.06.2002)
07/2002 - 08/2002	Chemielaborantin bei Bell Flavors & Fragrances (Leipzig)
10/2002 - 09/2008	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg Abschluss: Diplom (Halle/Saale, 11.09.2008) Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zum Nekrosen induzierenden Protein 2 (NIP2) aus <i>Rhynchosporium secalis</i> “, angefertigt am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle/Saale), Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. D. Scheel), AG Molekulare Kommunikation in Pflanze-Pathogen-Interaktionen bei Dr. W. Knogge
10/2008 - 11/2008	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei NHDyeAGNOSTICS (Halle/Saale)
12/2008	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle/Saale)
seit 02/2009	Promotion zum Thema „Identifizierung und Charakterisierung von putativen Virulenzfaktoren des Gerstenpathogens <i>Rhynchosporium commune</i> “, angefertigt am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Halle/Saale), Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. D. Scheel), AG Molekulare Kommunikation in Pflanze-Pathogen-Interaktionen bei Dr. W. Knogge

Publikationsliste

Kirsten, S., Navarro-Quezada, A., Penselin, D., **Wenzel, C.**, Matern, A., Leitner, A., Baum, T., Seiffert, U., Knogge, W. (2012). Necrosis-inducing proteins of *Rhynchosporium commune*, effectors in quantitative disease resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**:1314-25.

eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt und die der benutzten Literatur wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Halle/Saale, den 23.09.2013

Claudia Wenzel