Untersuchungen zur Physiologie des getreidepathogenen Pilzes *Fusarium graminearum* Schwabe durch gezielte Gendisruption

Dissertation

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

vorgelegt
dem Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

von
Sascha Malz
aus Hamburg

Hamburg 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. W. SCHÄFER
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. H. LÖRZ

Tag der Disputation: 28. November 2003

Hamburg, den 07. November 2003

Universität Hamburg
Fachbereich Biologie
14/1

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Für Jasna und Erich

Two roads diverged in a wood, and I -
I took the one less traveled by,
And that has made all the difference.

Robert Frost

Inhaltsverzeichnis iv

Verzeichnis der Abkürzungen x

1. Einleitung 1

1.1. *Fusarium graminearum* 3

1.2. Transformationssystem 7

1.3. Gezielt disruptierte Gene 8

1.3.1. Aquaporine 8

1.3.2. Alkoholoxidasen 11

1.3.3. Polyketidsynthasen (PKS) 14

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 22

2. Material und Methoden 23

2.1. Material 23

2.1.1. Chemikalien, Enzyme und allgemeines Material 23

2.1.2. Organismen 23

2.1.2.1. Pflanzen 23

2.1.2.2. Pilze 24

2.1.2.2.1. *Fusarium graminearum* Schwabe 24

2.1.2.2.2. *Nectria haematococca und Pyrenophora teres* 24

2.1.2.2.3 Hefeartige Pilze 24

2.1.2.3. Bakterien 24

2.1.2.3.1. Gram-negative Bakterien 24

2.1.2.3.2. Gram-positive Bakterien 24

2.1.3. Vektoren 25

2.1.3.1. Vektoren für die Subklonierung in *Escherichia coli* 25

2.1.3.2. Vektoren für die Transformation von *Fusarium graminearum* 25

2.1.3.3. In dieser Arbeit generierte Vektoren bzw. für deren Erstellung genutzte Plasmide 26

2.1.4. Oligonukleotide 32

2.1.5. cDNA-Bank von *Fusarium graminearum* 34

2.1.6. Medien und Lösungen 34

2.2. Methoden 38
2.2.1. Kultivierung des Pflanzenmaterials 38
2.2.2. Kultivierung von Pilzen 38
2.2.2.1. Filamentöse Pilze 38
2.2.2.1.1. *Fusarium graminearum* 38
2.2.2.1.2. *Nectria haematococca* und *Pyrenophora teres* 38
2.2.2.2. Hefeartige Pilze 38
2.2.3. Kultivierung von Bakterien 39
2.2.4. Transformation 39
2.2.4.1. Transformation von *Fusarium graminearum* 39
2.2.4.1.1. Protoplastierung 39
2.2.4.1.2. Transformation 39
2.2.4.1.3. Regeneration der transformierten Protoplasten 40
2.2.4.1.4. Kultivierung der Transformanden und Einzelkonidiation 40
2.2.4.1.5. Variationen zur Etablierung der Transformation von *Fusarium graminearum* 40
2.2.4.2. Transformation von *Escherichia coli* 41
2.2.4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen 41
2.2.4.2.2. Transformation von *Escherichia coli* 41
2.2.5. Molekularbiologische Methoden 41
2.2.5.1. Standardmethoden 41
2.2.5.2. DNA-Isolierung aus Agarosegelen 42
2.2.5.3. Klonierung von PCR-Produkten 42
2.2.5.4. DNA-Isolierung aus Organismen 42
2.2.5.4.1. Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli* 42
2.2.5.4.2. DNA aus *Fusarium graminearum* 42
2.2.5.5. RNA-Isolierung 44
2.2.5.5.1. Gesamt RNA 44
2.2.5.5.2. mRNA 44
2.2.5.6. Qualitätsbestimmung und Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren 44
2.2.5.7. cDNA Synthese 44
2.2.5.8. PCR-Methoden 45

2.2.5.8.1. Standard PCR 45
2.2.5.8.2. PCR aus Organismen 45
2.2.5.8.2.1. Bakterienkolonie PCR 45
2.2.5.8.2.2. Fusarien-Konidien PCR 45
2.2.5.8.3. PCR zur Erstellung einer Digoxigenin markierten Sonde 45
2.2.5.8.4. Inverse PCR zur Konstruktion eines K.O.-Vektors 46
2.2.5.8.5. Inverse PCR zur Identifizierung Fragment-flankierender Sequenzen 47
2.2.5.8.7. Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) 49
2.2.5.8.8. PCR zur Identifizierung von K.O.-Mutanten 51
2.2.5.8.9. RT-PCR 52
2.2.5.8.9. PCR zum Nachweis von *Fusarium graminearum* 53
2.2.5.9. Sequenzierung 53
2.2.5.10. Southern-Blot Analysen 54
2.2.5.10.1. Transfer der DNA auf eine Nylonmembran 54
2.2.5.10.2. Hybridisierung und Detektion 54
2.2.5.10.3. Bakterienkolonie-Hybridisierung 54
2.2.5.11. Bearbeitung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen *in silico* 55
2.2.6. Verfahren zur Analyse und Charakterisierung von *Fusarium graminearum* Transformanden 55
2.2.6.1. Infektion der Weizenähre mit *Fusarium graminearum* 55
2.2.6.2. Infektion von Weizen durch *Fusarium graminearum* am Blatt 56
2.2.6.3. Wachstumstest 56
2.2.6.3.1. Test von K.O.-Mutanten auf UV-Sensitivität 56
2.2.6.3.2. Test von K.O.-Mutanten auf Temperatur-Sensitivität 57
2.2.6.3.3. Wachstum von K.O.-Mutanten auf verschiedenen Medien 57
2.2.6.3.4. Wachstum von K.O.-Mutanten unter osmotischem Stress 57

2.2.6.3.5. Wachstum von K.O.-Mutanten mit Glycerol als einzige C-Quelle 57

2.2.6.3.6. Bestimmung der Konidienbildung von *Fusarium graminearum* 57

2.2.6.4. Untersuchung eines roten Pigments aus *Fusarium graminearum* 58

2.2.6.4.1. Extraktion eines roten Farbstoffs aus *Fusarium graminearum* 58

2.2.6.4.2. Photometrische Charakterisierung des Farbstoffes aus *Fusarium graminearum* 58

2.2.6.4.3. Wirksamkeit des roten Farbstoffes aus *Fusarium graminearum* gegenüber anderen Organismen 58

2.2.6.5. Untersuchung der Alkoholoxidase aus *Fusarium graminearum* 60

2.2.6.5.1. Induktion der Alkoholoxidase 60

2.2.6.5.2. Erstellung eines Rohproteinextraktes aus *Fusarium graminearum* 60

2.2.6.5.3. Gesamtproteinbestimmung nach Bradford 61

2.2.6.5.4. Alkoholoxidase-Assay 61

3. Ergebnisse 62

3.1. Etablierung eines Systems für die Transformation und Homologe Rekombination von *Fusarium graminearum* 63

3.1.2. Generierung von K.O.-Vektoren 63

3.1.2.1. Vektoren mit der Hygromycin-Resistenz-Kassette in der Zielgensequenz (Replacement-Vektor) 63

3.1.2.2. Vektoren mit der Hygromycin-Resistenz-Kassette in Nachbarschaft zur Zielgensequenz (Insertions-Vektor) 64

3.1.2.3. Polyketidsynthase K.O.-Vektoren 64

3.1.2. Etablierung der Transformation mit PKS-K.O.-Vektoren 65

3.2. Aquaporin aus *Fusarium graminearum* 67

3.2.1. Generierung eines K.O.-Vektors für die Disruption eines Aquaporin-Gens 67

3.2.2. Vollständige Sequenz des *AQP*-Gens 69

3.2.3. Disruption des *AQP*-Gens von *Fusarium graminearum* 70

3.2.4. Untersuchung der AQP-K.O.-Mutanten 71
3.2.4.1. Wachstumsverhalten 71
3.2.4.2. Bestimmung der Konidienbildung und -keimung 73
3.2.4.3. Infektion von Weizen 73
3.3. Die Alkoholoxidase von *Fusarium graminearum* 74
3.3.1. Sequenz für die Generierung des AOX-K.O.-Vektors 74
3.3.2. Vollständige Sequenz des *AOX*-Gens 75
3.3.3. Disruption des *AOX*-Gens von *Fusarium graminearum* 77
3.3.4. Untersuchung der AOX-K.O.-Mutanten 79
3.3.4.1. RT-PCR und Alkoholoxidase-Assay zur Charakterisierung der Transkription und der Translation des *AOX*-Gens 79
3.3.4.2. Wachstumsverhalten 85
3.3.4.3. Analyse des *AOX*-Gens von *Fusarium graminearum* während der Weizeninfektion 85
3.3.4.3.1. RT-PCR 85
3.3.4.3.2. Infektion von Weizen 86
3.4. Die Polyketidsynthase von *Fusarium graminearum* 86
3.4.1. Sequenz für die Generierung der PKS-K.O.-Vektoren 86
3.4.2. Vollständige Sequenz des *PKS*-Gens 87
3.4.3. Disruption des *PKS*-Gens von *Fusarium graminearum* 88
3.4.3.1. Linearisierter Vektor 88
3.4.3.2. Zirkulärer Vektor 90
3.4.3.3. Verlust der Pigmentierung auf CM-Medium 91
3.4.3.4. Pigmentierung und Wachstum 92
3.4.3.5. Möglichen Schutzfunktion des Pigments gegen UV-Bestrahlung 94
3.4.3.6. Wachstum unter verschiedenen Temperaturbedingungen 98
3.4.3.7. Bestimmung der Konidienbildung 98

3.4.3.8. Untersuchung der PKS-K.O.-Mutanten von *Fusarium graminearum* während der Weizeninfektion 101

3.4.3.8.1. Weizenähreninfektion 101

3.4.3.8.2. Weizenblattinfektion 101

3.4.3.8.3. RT-PCR 101

3.4.3.9. Untersuchung eines roten Pigments von *Fusarium graminearum* 103

3.4.3.9.1. Einfluss des pH-Wertes auf den Farbstoff von *Fusarium graminearum* 103

3.4.3.9.2. Absorptionsspektren des Farbstoffs von *Fusarium graminearum* 104

3.4.3.9.3. Aktivität des roten Farbstoffes gegenüber anderen Organismen 105

4. Diskussion 112

5. Zusammenfassung 129

6. Literatur 131

Anhang I

A. Aquaporin I

B. Alkoholoxidase IV

C. Polyketidsynthase X

Danksagung

Verzeichnis der Abkürzungen

1,8-DHN	1,8-Dihydroxynaphthalen	
AAO	Aryl-Alkoholoxidase	
Abb.	Abbildung	
ACP	Acylträgerprotein	*acyl carrier protein*
ADON	Acetyl-Deoxynivalenon	
AOX	Alkoholoxidase	
AQP	Aquaporin	
AS	Aminosäure	
AT	Acyltransferase	
bp	Basenpaare	
cDNA	komplementäre DNA	*complementary DNA*
CHD	Cholindehydrogenase	
CM	Komplettmedium	*Complete Medium*
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat	
dCTP	2'-Desoxy-Cytidinin-5'-Triphosphat	
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat	
DH	Dehydratase	
DIG	Digoxigenin	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	*Deoxyribonucleicacid*
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat	
DON	Deoxynivalenol	
DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin	
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	
DTT	Dithiothreitol	
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat	
dUTP	2'-Desoxy-Uridin-5'-Triphosphat	
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	*Ethylene diamine tetraacetic acid*
ER	Enoylreduktase	
EST		*expressed sequence tags*
EWDB	Europäische Weizen Datenbank	*European Wheat Database*
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid	
FHB	Ährentaubheit	*Fusarium head blight*
GLD	Glucosedehydrogenase	
GMC	Glucose-Methanol-Cholin	
GOX	Glucoseoxidase	
gpd	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	
hph	Hygromycin B Phosphatase	
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galctosid	
K.O.		*knock out*

kb	Kilobasen(paaren)	
KDA	Kilo-Dalton	
KR	Ketoreduktase	
KS	Ketoacylsynthase	
LB	Luria-Bertani	
MCS	multiple Klonierungsstelle	*multiple cloning site*
MIP		*major intrinsic protein*
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansoulfonsäure	
mRNA	Boten-RNA	*messenger RNA*
nt	Nukleotid	
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	*polymerase chain reaction*
PIP	Plasmamembran intrinsisches Protein	
PK	Polyketid	
PKS	Polyketidsynthase	
PTS	Peroxisomentargetsignal	
Pyc	Pyruvatcarboxylase	
REMI	Restriktionsenzym vermittelte Integration	*resctriction enzym mediated integration*
RNA	Ribonukleinsäure	*Ribonucleicacid*
RT	Raumtemperatur	
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR	
SDS	Natriumdodecylsulfat	*Sodium dodecyl sulfate*
SNA	Synthetischer Nährstoff(armer) Agar	*Synthetic Nutrient Agar*
Tab.	Tabelle	
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer	
TE	Thioesterase	
TIP	Tonoplasten intrinsisches Protein	
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	
TRPC	Phosphoribosylanthranilat-Isomerase	
ÜN	über Nacht	
upm	Umdrehungen pro Minute	
URF13		*unknown reading frame 13*
UV	Ultraviolett	
VOL	Volumen	
WT	Wildtyp	
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid	
ZON	Zearalenon	

Maßeinheiten werden nach dem Internationalen Einheitensystem (SI = Système Internationale d'Unité) bezeichnet, Summenformeln und Moleküle nach IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry). Weitere Abkürzungen für Lösungen und Puffer sind im Text erklärt.

1. Einleitung

Der filamentöse Ascomycet *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph *Gibberella zeae* [Schwein.] Petch) ist ein weltweit verbreiteter Erreger von Keimlings-, Halmbasis- und Ährenkrankheiten der Süßgräser (Poaceae). Er bevorzugt wärmere, kontinental beeinflusste Regionen. Die Ährenfusariosen (auch als Ährenbleiche oder "Fusarium head blight [FHB]" bezeichnet, Abb.1A, Beispiel: Weizen) führen unter für den Pilz günstigen Witterungsbedingungen bei Weizen, Gerste und Mais zu hohen Ertrags- und Qualitätseinbußen. Diese äußern sich in nicht oder nur rudimentär ausgebildeten, leichtgewichtigen Körnern (Abb.1B, Beispiel: Weizen) sowie in einer zum Teil erheblichen Belastung des Ernteguts mit Mykotoxinen[1].

Abb.1: Symptome der Ährenfusariose bei Weizen infolge einer Infektion durch *Fusarium graminearum*. (A) Gesamtbild der Ährenbleiche. (B) Körner einer gesunden Ähre (links) in Vergleich zu Körnern einer infizierten Ähre (rechts).

Optimale Bedingungen für den Pilz herrschen vor, wenn es zu häufigem Regenfall und einer hohen Luftfeuchtigkeit in Verbindung mit starker Taubildung während der Blüte und der frühen Phase der Kornbildung kommt. Entsprechende klimatische Bedingungen finden sich in den USA, Kanada, Australien, Südamerika, China und Zentraleuropa und führen dort zu einer Ausbreitung von *F. graminearum* (Schroeder & Christensen, 1963; Bai & Shaner, 1994; McMullen et al., 1997; Nicholson et al., 1998). In kälteren Regionen, wie Frankreich, Finnland, Polen und den Niederlanden, dominiert die sehr eng verwandte Art *Fusarium culmorum* (Miller, 1999), die in ihrer Ausprägung *F. graminearum* sehr ähnlich ist und ebenfalls Mycotoxine ausbildet.

Der Befall wird neben der Witterung von der Fruchtfolge, den Bodenbearbeitungsmaßnahmen und der Sortenwahl beeinflusst. Durch die Wahl der Sorte und der Anbauintensität sind Eigenschaften wie das Mikroklima, die Pflanzenhöhe und die Blühdauer variierbar. Letzteres ist wichtig, da Getreidebestände bevorzugt während der gesamten Blüte

[1] Toxine, die den Menschen und Nutztiere als Endverbraucher schädigen

und der Nachblüte infiziert werden (Andersen, 1948). Bezüglich der Fruchtfolge konnte festgestellt werden, dass Weizenpflanzen signifikant mehr FHB zeigen, wenn sie im Anbau auf Mais, statt auf andere Getreide folgen (Bai & Shaner, 1994).

Einer der frühesten Berichte dokumentiert den Ausbruch einer *Fusarien*-Infektion 1890 in Indiana, USA. Ein Weizenfeld, welches normalerweise einen Ertrag von 2350 bis 2690 kg/ha aufwies, erbrachte lediglich 538 kg/ha (Bai & Shaner, 1994). In Ohio, Indiana und Illinois kam es 1917 zu einem Verlust von 288.000 Tonnen Weizen. 1919 waren es in den gesamten USA bereits 2,18 Millionen Tonnen. Rund 75 Jahre später führte eine Fusarien-Infektion in den USA zu einem Ernteverlust, der 1 Milliarde US-Dollar entsprach, wobei eine Fläche von 4 Millionen Hektar betroffen war (McMullen et al., 1997). In der Volksrepublik China findet sich FHB in zwei Dritteln aller Provinzen, wobei mehr als 7 Millionen Hektar Weizenfelder betroffen sind, was zu einem Verlust von mehr als 1 Million Tonnen Weizen führen kann (Bai & Shaner, 1994). In diesen Gebieten ist FHB eine der gravierendsten Weizenkrankheiten. Auch weitere asiatische Anbaugebiete sind betroffen. Beispielsweise 1963 führte eine Fusarien-Epidemie bei Gerste zu schweren Hungersnöten in der Bevölkerung von Südkorea (McMullen et al., 1997). Im Jahr 1980 kam es durch FHB in Kanada zu einem Ernteverlust von 30 bis 70 % (Bai & Shaner, 1994). Weder durch Resistenzzüchtung noch durch verschiedenste Pflanzenschutzverfahren konnte bisher ein befriedigender Erfolg gegen die Ährenfusariosen erzielt werden. Positive Ergebnisse ergaben sich lediglich durch Spätstickstoffgaben oder Strobilurin-Applikationen (Forschergruppe DFG-Fusarientoxine, 2001).

Die bedeutendsten Mykotoxine von *F. graminearum* sind das östrogene macrocyklische Polyketidderivat Zearalenon (ZON), welches auch kommerziell erzeugt und als Wachstumsstimulans bei Rindern eingesetzt wird (Bowden & Leslie, 1999), sowie die Trichothecene Deoxynivalenol (DON) und Nivalenol (Tuite & Shaner, 1990; Bai & Shaner, 1994; Proctor et al., 1995; McMullen et al., 1997; Miller, 1999). Zur Gruppe der Trichothecene zählen ebenfalls die Vorstufen des DON (3-Acetyl- und 15-Acetyl-DON) und des Nivalenols (Fusarenon X) sowie das HAT-2 Toxin und das T-2 Toxin (Forschergruppe DFG-Fusarientoxine, 2001). Diese Mykotoxine stellen als Kontaminationen von Futtermitteln und Getreideprodukten ein Gesundheitsrisiko für Mensch und Tier dar, insbesondere, da sie während der Getreideverarbeitung - Reinigung, Mehlsiebung, Backen und Kochen - sehr stabil sind.

Die Aufnahme des Polyketidderivats ZON über einen längeren Zeitraum gilt bei Sauen als eine Ursache für Fruchtbarkeitsstörungen und stellt besonders bei präpubertären Schweinen ein hohes Gesundheitsrisiko dar. Dieses Toxin zeigt jedoch auch physiologische Wirkung bei Rindern, Ratten, Mäusen, Meerschweinchen, Geflügel und Pflanzen (Bacon et al., 1977; Forschergruppe DFG-Fusarientoxine, 2001).

Das auch als „Vomitoxin“ bezeichnete Sesquiterpenoid DON wirkt als starker Inhibitor der eukaryotischen Proteinbiosynthese, hauptsächlich in Leber und Darm. In nichtwiederkäuenden Viehbeständen, vor allem bei Schweinen, führt eine akute Vergiftung durch DON zur Futterverweigerung, Erbrechen und starkem Gewichtsverlust. Beim Menschen verursacht es Krankheiten, die verbunden sind mit Übelkeit, Erbrechen und starken Krämpfen.

Zudem wirkt es als starker Immunomodulator und stellt hierdurch ein hohes Risiko für immungeschwächte Menschen dar. Auch hat sich in Tierversuchen gezeigt, dass DON zu einer Überproduktion an Immunoglobinen führen kann, die sich in der Niere ablagern und dort zu Schäden führen (Forschergruppe DFG-Fusarientoxine, 2001; Birren et al., 2002).

1.1. *Fusarium graminearum*

Die Spezies *Fusarium graminearum* wird in zwei ökologische Gruppen unterteilt (Bai & Shaner, 1994; Bowden und Leslie, 1999). Die Gruppe 1 ist in erster Linie dem Boden entstammend („soilborne“) und verursacht Spitzen- oder Wurzelfäulnis bei Weizen, Gerste oder anderen Gräsern. Diese Gruppe kommt vor allem in den Trockengebieten von Australien, Südafrika und Nordamerika vor und führt dort nur bei außergewöhnlich feuchten Wetterlagen zur FHB-Ausprägung. Perithezien werden in der Gruppe 1 nur selten ausgebildet. Die Mitglieder dieser Gruppe sind vorrangig heterothallisch und meist infertil.

Gruppe 2 wird erstrangig auf dem Weg der Luft übertragen („airborne“) und verursacht Ährenfusariosen an kleinkörnigen Gräsern sowie Stängel- oder Ährenfäule an Mais. Die Mitglieder dieser Gruppe sind homothallisch und produzieren sowohl im Freiland als auch in Kultur Perithezien (Fernando et al. 1997; Bowden & Leslie, 1999). Die Gruppe 2 zeigt wiederum die Untergruppen A und B. Gruppe A ist pathogen gegenüber Mais, wächst sehr schnell und bildet rot-pigmentierte Kolonien mit Luftmyzel. Die Gruppe B ist nichtpathogen gegenüber Mais, wächst sehr langsam und bildet gedrungene braungelbe Kolonien. In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem Isolat der Gruppe 2A gearbeitet.

F. graminearum überlebt in der Natur als Myzelium (Abb.2B und C), Makrokonidie (Abb.2A), Chlamydospore und Ascospore (sexuelles Stadium: *Gibberella zeae*, Abb.2D). Charakteristisch für diese *Fusarium*-Art ist die Nichtbildung von Mikrokonidien (Bai & Shaner, 1994).

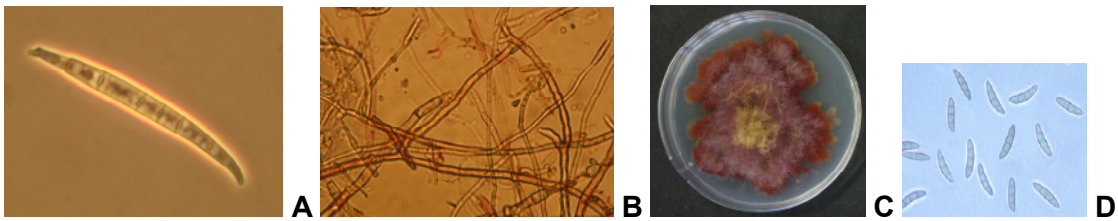


Abb. 2: Verschiedene Lebensformen von *Fusarium graminearum*. (A) Makrokonidie, (B) Myzelhyphen, (C) Myzelkultur auf CM-Medium und (D) Ascosporen

Als fakultativer Parasit lebt *F. graminearum* als Saprophyt auf abgestorbenen Pflanzenteilen oder als Perthophyt nekrotroph auf lebenden Pflanzen. Neben den Kulturpflanzen dienen auch Wildkräuter der natürlichen Vegetation dem Überleben von *F. graminearum.*

Die Überwinterung erfolgt häufig auf Maisstängeln oder in Weizenstroh, wobei es zur Umwandlung in Chlamydosporen, also Überdauerungsstadien, kommen kann. Auf dem Boden verbleibende Getreidereste, resultierend aus einer minimalistischen Ackerbearbei-

tung nach der Ernte, stellen somit in allen Teilen der Erde die primäre Quelle des Inokulums dar. In späteren Phasen kommt es zur Bildung von Perithezien und Sporodochien, aus denen Ascosporen bzw. Makrokonidien hervorgehen (Abb.3).

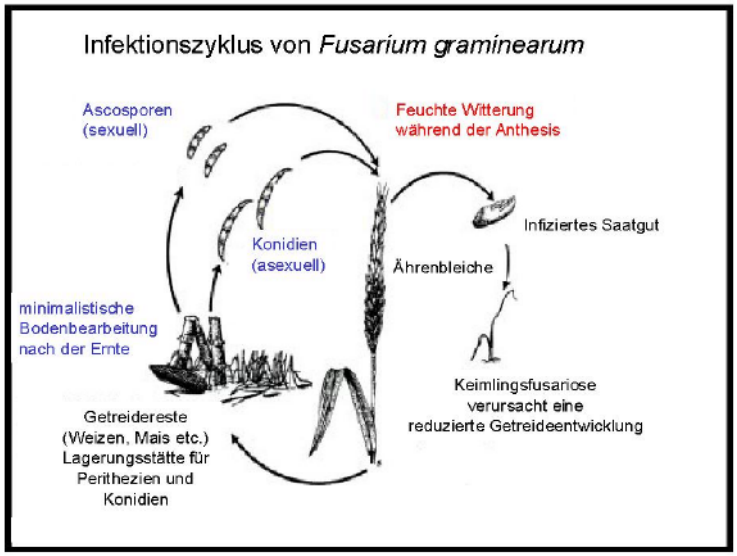


Abb.3: Infektionszyklus von *Fusarium graminearum* (nach G.C. Bergstrom [1993], Scab [Fusarium head blight]. In Seed-borne Diseases and Seed Health Testing of Wheat (Mathur, S.B., Cunter, B.M., Hrsg.)

Zur Zeit der Weizenblüte erfolgt die Entlassung der Ascosporen und Makrokonidien, die sich auf den Weizenähren niederlassen und dort die Symptome der Bleiche zunächst an der Rhachis und an individuellen Ährchen zeigen. Die Infektion verläuft über die bei der Blüte der Weizenähren exponierten Antheren. Es erfolgt eine Verzweigung durch die sich entwickelnde Karyopse, das Blütendeckblatt und die Rhachis. Kurz nach der Infektion zeigen sich dunkelbraune Flecken auf den Glumen der infizierten Ährchen. Unter optimalen Bedingungen für *F. graminearum* kommt es zur Ausprägung des FHB der gesamten Ähre (Bai & Shaner, 1994; Fernando et al., 1997, Abb.1A). Die infizierten Blüten bilden keine oder nur wenig gefüllte Körner.

Da der Weizen zum Zeitpunkt der Blüte und der Nachblüte für die Infektion am empfänglichsten ist, ergibt sich ein relativ kurzer Zeitraum (10 bis 20 Tage im Freiland), in dem es zur Infektion kommen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Zeitraum in der Klimakammer auf 3 bis 5 Tage ab Beginn der Anthesis eingegrenzt. Dieser Zeitraum erstreckt sich vom Beginn der Anthesis bis zum sogenannten „Milch-“ oder„Teig-“Stadium der Kornentwicklung (Andersen, 1948; Bai & Shaner, 1994; Pritsch et al., 2000). Im Anschluss an die Infektion erfolgt eine Inkubation der Primärinfektion über einen Zeitraum von 2 bis 3 Tagen im Gewächshaus bzw. im Labor und 4 bis 5 Tagen im Freiland (Bai und Shaner, 1994), wobei eine hohe Luftfeuchtigkeit und eine erhöhte Temperatur die Infektion sehr stark begünstigen (Andersen, 1948).

Die Initiation der Infektion ist noch nicht vollständig geklärt. Pritsch et al. (2000) sprechen von der Initiation an den toten Antheren allgemein. Strange et al. (1974) hingegen identifizierten Cholin und Betain in den Antheren und Keimlingen von Weizen als Stimulanzien des Pathogenwachstums.

Bei weiterhin günstigen Wetterlagen kommt es zu starkem Myzelwachstum sowie zur Bildung von Sporodochien. Die Rolle der hierbei entstehenden Konidien für eine Sekundärinfektion anderer Ähren ist bislang nicht geklärt (Fernando et al., 1997). Neben den Ascosporen und Makrokonidien können auch Chlamydosporen und Myzelfragmente als Inokulum fungieren. Nach Bai & Shaner (1994) kann es durch die Ausbreitung von Luftmyzel zur Übertragung der Infektion von einer Ähre auf die nächste kommen. Letztlich kann *F. graminearum* auf der Ähre seinen gesamten Lebenszyklus durchlaufen, an dessen Ende wieder die Bildung von Perithezien mit Ascosporen stehen kann (Eudes et al., 2001).

Die Invasion des Wirtes durch *F. graminearum* ist noch nicht vollständig geklärt, wobei bekannt ist, dass es nicht zur Bildung von Appressorien kommt, wie dies für eine Reihe von pathogenen Pilzen beschrieben wurde (Emmet & Parbery, 1975; Dean, 1997; Wharton et al., 2001; Clergeot, 2001).

Pritsch et al. (2000) beschreiben ein Eindringen durch die Stomata des Wirts und schließen eine direkte Penetration des pflanzlichen Zellgewebes aus, obwohl sie auch Hyphen in den epidermalen Zellen der Glumen fanden. Boshoff et al. (1996) beschreiben ebenfalls die Penetration durch die Stomata, aber auch durch Wunden im Gewebe. Nach Pritsch et al. (2000) erreicht *F. graminearum* durch die Stomata direkt das Chlorenchym, welches somit das Ziel der frühen Infektion darstellen könnte. Anschließend konnte ein Wachstum in den Zellen des Parenchyms beobachtet werden, wobei Pritsch et al. (2000) annehmen, dass der Pilz durch Vertiefungen der sonst sehr dicken Zellwand der Parenchymzellen wächst. Pritsch et al. (2000) zeigten ein subcuticulares Wachstum von *F. graminearum*. Für andere Pathogene, wie z.B. *Cochliobolus heterostrophus* (Wheeler, 1977), *Phomopsis leptostromiformis* (Williamson et al., 1991) und *F. nivale* (Malalasekera et al., 1973), konnte diese Art des Wachstums bereits gezeigt werden.

Die primäre Infektion des Wirtes könnte somit über die Stomata erfolgen. Ein weiteres Vordringen des Pilzes innerhalb des Gewebes, wie auch die Ausbreitung über die gesamte Ähre, muss jedoch andere Mechanismen beinhalten. Für viele Pathogene sind zellwandabbauende Enzyme oder eine mechanische Penetration beschrieben (Köller et al., 1991; Koga, 1995) oder werden diskutiert (Wharton et al., 2001).

Kang & Buchenauer (2000) zeigten in cytochemischen Studien, dass das inter- und intrazelluläre Wachstum des mit *F. graminearum* sehr eng verwandten *F. culmorum* zur deutlichen Modifikation der Zellwandkomponenten des Wirts führt. Kruger et al. (2002) identifizierten in einer Bioinformatik-Analyse des Genexpressionsmusters während einer Infektion von Weizenähren durch *F. graminearum* eine Galaktosidase, eine Proteinase sowie verschiedene Xylanasen auf Seiten des Pilzes. Bauknecht et al. (2003) zeigten, dass während der Infektion von Weizen verschiedene Cellulasen transkribiert werden. Das Wachstum auf einem Weizenzellwandextrakt führt außerdem zur Expression einer Xylanase und zweier Pektat-Lyasen. Weitere Studien zeigten *in vitro* eine hohe Amylaseaktivität, eine Pektinaseaktivität, eine Xylanaseaktivität und eine Endoglucanaseaktivität (pers. Mitteilung durch N. Jenczmionka, 2003). Es liegt somit nahe, dass *F. graminearum* nach

der Invasion des Wirtes durch die Stomata zellwanddegradierende Enzyme sekretiert, die sein intra- und interzelluläres Wachstum ermöglichen.

Neben dem Eindringen durch die Stomata bzw. durch Wunden und das anschließende inter- und intrazelluläre Wachstum durch die Sekretion zellwandabbauender Enzyme, nehmen wahrscheinlich auch Mykotoxine Einfluss auf die Infektion des Wirtes durch den nekrotrophen Pilz. Hiermit kommt ihnen eine zusätzliche Rolle als Phytopathotoxine[2] zu. Umfassend untersucht wurde in diesem Zusammenhang die Gruppe der Trichothecene. Diese sesquiterpenoiden Epoxide sind als effektive Inhibitoren in der Proteinbiosynthese wirksam, wobei sie den Peptidyltransferase-Schritt blockieren (Proctor et al., 1995; Kang und Buchenauer, 1999). Sie werden von zahlreichen pflanzenpathogenen Pilzen der Gattung *Fusarium, Myrothecium, Stachybotrys, Trichoderma* und *Trichothecium* gebildet (Bruins et al., 1993; Wang & Miller, 1988). Es konnte gezeigt werden, dass die Disruption eines für den ersten Schritt in der Biosynthese der Trichothecene verantwortlichen Gens zur Reduktion der Virulenz von *F. graminearum* in Weizen führte (Proctor et al., 1995; Desjardins et al., 1996; Proctor et al. 1997; Eudes et al., 2001). Kang und Buchenauer (1999) zeigten in einer Immunocytochemischen Studie die Lokalisation von DON, 3-ADON und 15-ADON in Weizen während einer Infektion durch *F. culmorum*. Die Toxine werden durch *F. culmorum* schon während des oberflächlichen Wachstums auf der Deckspelze und dem Fruchtknoten produziert. Zu diesem Zeitpunkt konnten die Toxine jedoch bereits im Parenchym innerhalb der Blütenorgane identifiziert werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Diffusion der wasserlöslichen DON- und ADON-Moleküle in das Wirtsgewebe, noch bevor es zur Invasion des Pilzes kommt. Nach der Penetration des Pilzes steigt die Konzentration des Toxins im Gewebe an. Dieses führt zu physiologischen Veränderungen des Wirtsgewebes. Es kann zur Inhibition der Proteinbiosynthese, einem Verlust der Elektrolyte und einer Desintegration von Organellen kommen. Die Toxine schädigen somit die Pflanze und bringen dem Pilz einen Vorteil hinsichtlich der Ausbreitung auf dem degradierten Gewebe. Möglicherweise fungieren die Toxine außerdem als Agens zur Verzögerung einer postinfektionellen Abwehr des Wirts. Auch der Transport der wasserlöslichen Toxine durch das Xylem und - gemeinsam mit den Assimilaten - durch das Phloem konnte gezeigt werden. Die Toxine könnten sich folglich in der gesamten Pflanze, zumindest aber in den Geweben in unmittelbarer Umgebung zum Inokulationspunkt, ausbreiten und in die Körner gelangen. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Arbeiten, nach denen DON auch in uninfizierten Geweben von durch *F. graminearum* infizierten Maispflanzen nachgewiesen werden konnte (Young & Miller, 1985; Miller et al., 1993).

In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob durch *F. graminearum* gebildete Polyketide ebenfalls als Mykotoxine sowie als Phytopathotoxine fungieren. Beispielsweise könnte das ZON, ebenso wie die Trichothecene, einen Pathogenitätsfaktor darstellen und eine verminderte Getreidequalität bedingen.

[2] Toxine, die den pflanzlichen Wirt schädigen

1.2. Transformationssystem

Um die durch *F. graminearum* verursachte Pathogenese zu verstehen, ist es wichtig, funktionelle Gene zu untersuchen, die für definierte Prozesse und Stoffwechselwege verantwortlich sind. Die Bedeutung dieser Studien zeigt sich in der Tatsache, dass *F. graminearum* in eine Liste von 15 bedeutsamen Pilzen aufgenommen wurde, deren Genom komplett sequenziert werden soll (Birren et al., 2002). Mittlerweile liegt die gesamte genomische Sequenz von *F. graminearum* vor (publiziert zum Ende dieser Arbeit unter http://www.fgsc.net/) und ermöglicht zukünftig, ohne den Zeitverlust, der sich zuvor aus der Detektion der Gene ergab, eine umfassende Analyse des Pathogens *F. graminearum*.

Da während der Studien für die vorliegende Arbeit das Genomprojekt für *F. graminearum* noch nicht abgeschlossen und die Daten noch nicht zugänglich waren, erfolgte die Analyse nach konventionellen Methoden der Gencharakterisierung über PCR-Methoden. Es sollte außerdem ein Transformationssystem für *F. graminearum* etabliert werden, welches im Anschluss an die Sequenzidentifizierung und -charakterisierung das effiziente und gezielte Ausschalten der Gene ermöglicht.

Es werden hauptsächlich zwei Strategien verfolgt, um Pilze stabil zu transformieren und Gene gezielt zu disruptieren. Erstens durch den Einsatz einer K.O.-Kassette, die ein Marker-Gen trägt, welches flankiert wird von zwei homologen Sequenzen (Aronson et al., 1994; Royer et al., 1999; Schaefer, 2001). Zweitens durch die Verwendung eines Transformations-Plasmids, welches das Marker-Gen in Nachbarschaft zu einer homologen Sequenz trägt (Shortle et al., 1982; Bird & Bradshaw, 1997; Feng et al., 2001; Schaefer, 2001). Ferner hat sich für die Generierung von Mutanten filamentöser pflanzenpathogener Pilze die erstmals für *Saccharomyces cerevisiae* beschriebene Methode der "restriction enzyme-mediated-integration" (REMI) bewährt (Schiestl & Petes, 1991; Maier & Schäfer, 1999). Diese wird jedoch nicht für die gezielte, sondern für die zufällige Gendisruption eingesetzt.

Unter Verwendung der ersten Strategie erfolgt ein doppeltes "cross over"-Ereignis. Die Zielsequenz wird hierbei durch die K.O.-Kassette ersetzt und damit disruptiert ("replacement vector"). Im zweiten Fall erfolgt ein einzelnes "cross over"-Ereignis und das Zielgen wird durch die Insertion des gesamten Vektors unterbrochen. Diese beiden Prozeduren sind Standardmethoden für die Analyse funktioneller Gene durch eine gezielte Genzerstörung. Sie zeigen jedoch in der Regel eine hohe Frequenz illegitimer (ektopischer) Integrationen außerhalb des Zielgens.

In der Vergangenheit haben beispielsweise Procter et al. (1995) durch eine Transformation von *F. graminearum* mit dem "replacement vector", zum gezielten Ausschalten eines Trichothecengens (*Tri5*), 42 Hygromycin B-resistente Transformanden erhalten. Nur sieben dieser Transformanden zeigten eine oder mehr Kopien des Vektors im Zielgen. Ähnliche Resultate erzielten Royer et al. (1999) für *Fusarium venenatum*. Sie führten eine Transformation mit dem "replacement vector" durch, wobei sie einen Teil der Tri5 codierenden Sequenz durch eine Nitratreduktase aus *Neurospora crassa* ersetzten. Sechs der erhaltenen 32 Transformanden wiesen eine Gendisruption auf. In einem weiteren Experi-

ment erhielten Hohn & Desjardins (1992) unter Einsatz eines Insertionsvektors fünf von insgesamt 82 generierten Transformanden, die in *Gibberella pulicaris* die gezielte Disruption des Zielgens zeigten.

Die angeführten Beispiele sowie weitere Daten zu der Effizienz homologer Rekombination in anderen Ascomyzeten (*Aspergillus nidulans*: 5-75% bei einer Länge des homologen Bereichs von 4 bis 6 kb; *Neurospora crassa*: 1-30% bei einer Länge des homologen Bereichs von 2 bis 9 kb [Schaefer, 2001]) führen zu der Vermutung, dass ein Ereignis der homologen Rekombination in dieser Gruppe der Pilze teilweise sehr niedrig ist. Erst der Einsatz einer längeren homologen DNA-Region führt zu moderaten Ergebnissen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war unter anderem die Etablierung eines effizienten Transformationssystems für den Ascomyzeten *F. graminearum.* In diesem System sollte unter Verwendung eines K.O.-Vektors, mit einem möglichst kurzen Bereich der homologen Region (< 1 kb), eine große Zahl an Transformanden generiert werden. Diese Transformanden sollten eine hohe Rate an homologer Rekombination im Zielgen aufweisen.

1.3. Gezielt disruptierte Gene

Im folgenden sollen die in dieser Arbeit untersuchten Gene vorgestellt werden. Im Falle des Aquaporins wurde ein Gen ausgewählt, dessen Funktion in Pilzen noch nicht vollständig verstanden ist. Es sollte untersucht werden, ob es sich hierbei möglicherweise um einen Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor handelt. Die Alkoholoxidase wurde bereits als Pathogenitätsfaktor in einem anderen Pflanzenpathogen beschrieben. Die Gruppe der Polyketide umfaßt eine divergente Substanzklasse, von denen viele als Toxine bekannt sind und einige auch in *F. graminearum* vorkommen.

1.3.1. Aquaporine

Der Mechanismus des Wasserfluxes durch Zellmembranen wurde in Verbindung mit Berichten zur hohen Wasserpermeabilität artifizieller Lipidbilayermembranen bis in die 90er Jahre durch freie Diffusion erklärt (Schäffner, 1998). Die gemessenen Werte der osmotischen Wasserpermeabilität in reinen Phospholipidmembranen reichen theoretisch für die meisten Zellen aus, um ein osmotisches Gleichgewicht aufrechtzuerhalten. Für viele tierische Zelltypen fanden sich jedoch Wasserpermeabilitätswerte, die nicht durch eine reine Wasserdiffusion zu erklären sind (Knepper, 1994). Diese hohen Werte korrelieren mit der Anwesenheit eines bestimmten Proteins, welches in menschlichen Erythrozyten erstmals identifiziert (Agre et al., 1987; Knepper, 1994) und als erstes Wasserkanalprotein (Aquaporin) charakterisiert wurde (Agre et al., 1993).

Aquaporine bilden wasser-selektive Kanäle, die den Durchgang von Wasser erlauben, Ionen und Metabolite jedoch ausschließen (Crispeels & Maurel, 1994; Borgnia et al., 1999). Hierbei fungieren diese Kanäle nicht als Pumpen. Die treibende Kraft der Wasserbewegung durch die Aquaporine ist hydraulischer oder osmotischer Natur (Chrispeels &

Maurel, 1994). Die Aquaporine gehören zur Familie der MIP[3], einer Familie von kanalbildenden Proteinen, die jedoch nicht ausschließlich als Aquaporine fungieren.

Eine Unterteilung der MIP-Familie, aufgrund von Homologievergleichen der Aminosäuresequenz, erfolgte durch Yamada et al. (1995). Danach wurden fünf verschiedene Gruppen unterschieden: Glycerol-(Metabolit-)-transportunterstützende Proteine von Bakterien, Nodulin-MIP der Leguminosen, plasmamembranintrinsische Proteine (PIP) der Pflanzen, tonoplastenintrinsische Proteine (TIP) der Pflanzen und tierische Wasserkanalproteine. Da diese Unterteilung um die reinen Aquaporine und die Wasser-Glyceroltransporter (Aquaglyceroporine) einiger Bakterien und tierischer Zellen (Knepper, 1994; Echevarría et al., 1996; Tsukaguchi et al., 1998; Froger et al., 2001) sowie die pilzlichen Aquaporine und Glyceroltransporter (Hohmann et al., 2000) zu ergänzen war, unterteilten Froger et al. (2001) die MIP-Familie in die funktionelle Untergruppen der Aquaporine (AQPs), der Glyceroltransporter und der Aquaglyceroporine.

Alle Proteine der MIP-Familie besitzen sechs putativ membrandurchspannende Domänen und gliedern sich in zwei Wiederholungseinheiten, die aminoterminale Hälfte und die carboxyterminale Hälfte (Johnson et al., 1990; Preston et al., 1992; Reizer et al., 1993; Chrispeels und Agre, 1994; Jung et al., 1994; Maurel et al., 1995; vgl. auch Abb. 4). Im Falle der Aquaporine bilden vier solcher Monomere eine funktionelle Poreneinheit (Jung et al., 1994; Lagrée et al., 1998; Lagrée et al., 1999). Die Glyceroltransporter der Bakterien weisen die gleiche Tertiärstruktur mit sechs membraninserierten Helices auf. Hierbei ist jedoch bislang nicht geklärt, ob monomere oder tetramere Strukturen die funktionellen Einheiten bilden (Lagrée et al., 1998; Braun et al., 2000).

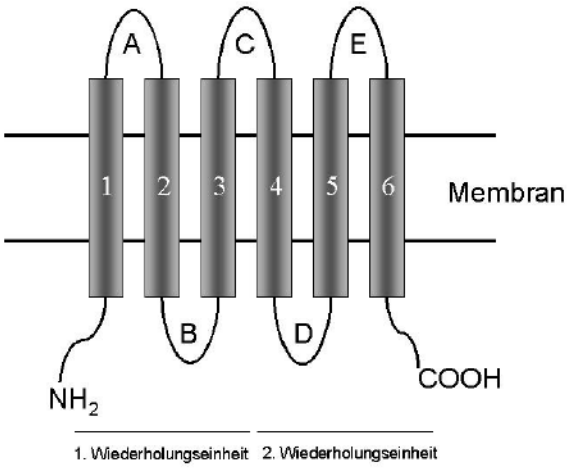


Abb. 4: Topologisches Modell der MIP (nach Reizer et al., 1993) mit den sechs transmembranen Helices (1 bis 6) sowie den intra- und extrazellulären Schleifen (A bis E).

Die als Schleife B und Schleife E bezeichneten Abschnitte spielen in den Aquaporinen eine entscheidende Rolle, da sie im sogenannten „hourglass“-Modell (Jung et al., 1994) den eigentlichen Wasserkanal bilden. In ihnen befindet sich jeweils ein konserviertes

[3]Benannt nach dem „major intrinsic protein“ aus der Linse des Rinderauges (Gorin et al., 1984).

NPA-Motiv, welches sich, neben einer einzelnen AEFL- und einer HW[V/I][F/Y]WXGP-Region, in fast allen Mitgliedern der MIP-Familie finden lässt (Verkman & Mitra, 2000).

Einige tierische Aquaporine, aber auch ein bakterielles, sind neben Wasser auch für andere kleine Moleküle, z.B. Harnstoff oder Glycerol, permeabel (Knepper, 1994; Echevarría 1996; Tsukaguchi et al., 1998; Froger et al., 2001; Virkki et al., 2002). Denkbar wäre hier eine Umleitung dieser Moleküle auf einen alternativen Weg, der ebenfalls durch die Pore führt (Echevarría et al., 1996; Schäffner, 1998).

Als eine Hauptkomponente der Peribacteroidmembran weisen Aquaporine bei Pflanzen eine wichtige Funktion auf (Fortin et al., 1987; Sandal & Marcker, 1988; Baker & Saier, 1990; Ouyang et al., 1991). Hier wird die Wasserpermeabilität nach Phosphorylierung durch eine calciumabhängige Protein-Kinase erhöht (Weaver et al., 1991; Guenther et al., 2003). Auch für die Zellelongation bzw. -differenzierung in pflanzlichen Zellen sowie für den Wasserhaushalt in tierischen Zellen konnten Aquaporine verantwortlich gezeigt werden (Ludevid et al., 1992; Maurel et al., 1993; Phillips & Huttly, 1994; Knepper, 1994; Malz & Sauter, 1999; Verkman, 2003; Stamer et al., 2003). Ferner konnten auch für die Wasseraufnahme bei Salzstress funktionelle Aquaporine als notwendige Elemente identifiziert werden, wobei gezeigt wurde, dass es zu gewebsspezifischen Expressionen kam (Yamada et al., 1995; Kirch et al., 2000). Neben der Funktion der Wasseraufnahme zur Zellexpansion oder zum Ausgleich von Salzstress spielen die Aquaporine auch bei der Pollenentwicklung von Pflanzen sowie bei der Selbstinkompatibilität eine entscheidende Rolle (Ruiter et al., 1997; Ikeda et al. 1997). Aquaporine scheinen hierbei nicht nur für die Hydratation der Pollen wichtig zu sein, sondern auch für die in den Antheren eingeleitete Austrocknung der Pollen.

Neben den Aquaporinen weisen tierische und mikrobielle Systeme Mitglieder der MIP-Familie auf, die sich für den Transport von Signalmolekülen, Glycerol und Harnstoff verantwortlich zeigen (Chrispeels & Maurel, 1994; Reizer et al., 1993; Lagrée et al., 1998; Lagrée et al., 1999; Hohmann et al., 2000).

In *S. cerevisiae* konnten drei Mitglieder der MIP-Familie identifiziert werden (Van Aelst et al., 1991; Bonhivers et al., 1998; Laize et al., 2000; Carbrey et al., 2001), welche näher charakterisiert wurden. Es handelt sich hierbei um einen Glyceroltransporter (Luyten et al., 1995; Tamas et al., 1999; Remize et al., 2001; Hohmann, 2002) sowie um zwei Aquaporine (Bonhivers et al., 1998; Laize et al., 2000; Carbrey et al., 2001). Das erste Aquaporin-Gen konnte nur in einzelnen Wildtypstämmen, jedoch nicht in Laborstämmen in funktionalen Einheiten detektiert werden. Folglich ist es nicht lebensnotwendig für *S. cerevisiae* (Bonhivers et al., 1998). Die gezielte Deletion des Gens im Wildtyp führte zur erhöhten Überlebensfähigkeit gegenüber osmolarem Stress. Neben der Diskussion einer Osmoregulation und der Pseudohyphenbildung konnte eine physiologische Rolle des Gens jedoch nicht näher definiert werden. Auch dem zweiten Aquaporin-Gen konnte keine eindeutige physiologische Rolle zugeordnet werden. Osmotische Untersuchungen nach der gezielten Deletion des zweiten Gens zeigten für *S. cerevisiae* den gleichen Verlust an Sensitivität gegenüber osmotischem Stress wie dies für das erste Aquaporin-Gen beobachtet werden konnte (Laize et al. 2000). Ein weiterer Phänotyp zeigt sich jedoch im

Aggregationsverhalten der Zellen (Carbrey et al., 2001). Da eine Veränderung der Hydrophobizität der Oberfläche bei *Candida albicans* zu einer Erhöhung der Virulenz führte (Hazen et al., 1990), diskutieren Carbrey et al. (2001) eine mögliche Parallele für die Virulenz von *S. cerevisiae* Stämmen, denen die Aquaporingene fehlen.

Auch im Genom der pathogenen Hefe *C. albicans* konnte ein offener Leserahmen für ein Aquaporin identifiziert werden (Carbrey et al., 2001b). Oocyten-Schwellversuche zeigten für das Gen aus *C. albicans* den gleichen Wasserpermeabilitätskoeffizienten wie für die Aquaporingene aus *S. cerevisiae*. Auch die verminderte Sensitivität gegenüber einem osmotischen Schock konnte in Null-Mutanten für das Aquaporin-Gen beobachtet werden. Ein Einfluss auf die Zelloberfläche konnte, ebenso wie ein Zusammenhang mit der Virulenz, nicht gezeigt werden. Die physiologische Rolle des Aquaporins in *C. albicans* bleibt bislang ungeklärt.

Mitglieder der MIP-Familie konnten in weiteren Pilzen identifiziert werden (Hohmann et al., 2000), wobei meist die putativen Proteine aufgrund ihrer Sequenzsignatur dieser Familie zugeordnet wurden. So wurden im Genom von *Aspergillus nidulans*, *Botrytis cinerea* und *Neurospora crassa* lediglich Homologien zu MIPs festgestellt, ohne dass bislang Funktionsanalysen erfolgt sind.

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob *F. graminearum* ebenfalls ein Gen der MIP-Familie trägt. Ziel dieser Arbeit war ferner die gezielte Disruption dieses Gens, um zu untersuchen, ob die Physiologie und insbesondere die Pathogenität des Pilzes hierdurch beeinflusst würde. In diesem Zusammenhang wäre beispielsweise, vergleichbar mit der Bildung pflanzlicher Pollen, eine Rolle des Gens für die Dehydratation oder Hydratation der infektiösen Dauerstadien (Konidien) denkbar. Auch für die Expansion des Pilzes auf der Wirtspflanzenähre wäre die vermehrte Expression von Aquaporin-Genen vorstellbar. Zum Zeitpunkt der Infektion kommt es im Rahmen der Stärkeakkumulation während der Kornbildung durch die Pflanze zu einem erhöhten Transport an Zuckern in die infizierten Bereiche. Hierdurch bildet sich für den Pilz ein hyperosmolares Milieu aus. Parallel zu den Aquaporinen von *S. cerevisiae* und *C. albicans* wäre somit die Involvierung eines Aquaporin-Gens von *F. graminearum* in den Zusammenhang einer veränderten Osmolarität denkbar. Neben der Untersuchung der Pathogenität *in planta* sollte in der vorliegenden Arbeit daher auch *in vitro* das Wachstumsverhalten eines Aquaporin-defizienten Stammes auf hyperosmolaren Medium analysiert werden.

1.3.2. Alkoholoxidasen

Bislang wurden Alkoholoxidasen einzig im Reich der Pilze entdeckt. Zunächst in den methyltrophen Hefen, wo sie als Schlüsselenzym im Methanolmetabolismus fungieren. Später wurden homologe Gene auch in den filamentösen Pilzen *Penicillium chrysogenum* (Schreiner et al., 1995; Holzmann et al., 2002), *Cladosporium fulvum* (Segers et al., 2001), *Cochliobolus victoriae* (Ghabrial, 2001), *Mycosphaerella fijiensis* (Donzelli & Churchill, 2003) und *F. graminearum* (diese Arbeit) gefunden. Southern-Blot-Analysen weisen

ferner auf homologe Sequenzen in *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Yarrowia lipolytica* hin (Holzmann et al., 2002).

Die Alkoholoxidase (AOX) wurde zunächst als Schlüsselenzym für den Methanolmetabolismus in den methyltrophen Hefen *Hansenula polymorpha* (Ledeboer et al., 1985), *Pichia pastoris* (Ellis et al., 1985; Koutz et al., 1989; Cregg et al., 1989) und *Candida boidinii* (Sakai & Tani, 1992) identifiziert, wo die AOX die Oxidation des Methanols unter Bildung von Formaldehyd und Wasserstoffperoxid katalysiert (van der Klei et al., 1990).

Bei der Alkoholoxidase handelt es sich um ein Flavoprotein, welches FAD als prosthetische Gruppe trägt. In der Regel wird eine zunächst inaktive monomere AOX im Cytosol gebildet, wo sie FAD aufnimmt und anschließend in die Peroxisomen transportiert wird. Dort bilden sich aktive oktamere Enzyme von etwa 600 kDa (van der Klei et al., 1990; Evers et al., 1994; Waterham et al., 1997; Ozimek et al., 2003). Hierbei konnte eine Pyruvatcarboxylase als entscheidender peroxisomalen Faktor identifiziert werden. Nicht die enzymatische Aktivität, sondern das Protein in seiner Struktur, ist dabei für die Bildung des aktiven Oktamers verantwortlich (Ozimek et al. 2003). Die Fähigkeit zur Bildung aktiver Oktamere in Abhängigkeit der Zielorganelle ist jedoch offensichtlich von Organismus zu Organismus verschieden (van der Klei et al.1991; Waterham et al., 1997). In Peroxisomen-defizienten Mutanten von *H. polymorpha* kommt es zur Bildung aktiver oktamerer Formen der AOX auch im Cytosol. Peroxisomen-defiziente Mutanten von *P. pastoris* zeigen diese Fähigkeit nicht.

Aufgrund ihrer Studien stellten Ozimek et al. (2003) ein hypothetisches Modell für die Bildung der AOX und ihren Transport in die Peroxisomen auf. An den freien Ribosomen des Cytosols werden die AOX-Monomere synthetisiert. Die Pyruvatcarboxylase (Pxc) unterstützt den Vorgang der Bindung des Co-Faktors FAD an das Monomer. Über ein Peroxisomentargetsignal (PTS) bindet das Monomer, wieder losgelöst von der Pyc, an den PTS-Rezeptor Pex5p. Der gesamte Komplex wird durch die Peroxisomenmembran translociert, um in der Organellenmatrix wieder zu dissoziieren. Die FAD-haltigen AOX-Monomere finden sich hier zur funktionellen Oktamer-Einheit zusammen; Der Pex5p-Rezeptor wird wieder in das Cytosol geschleust, um dort den nächsten AOX-Komplex zu bilden.

Cavener definierte 1992 eine Familie homologer Proteine mit verschiedenen katalytischen Aktivitäten. Diese Glucose-Methanol-Cholin- (GMC-) Oxidoreduktase-Familie beinhaltet die Alkoholoxidasen von *P. pastoris* und *H. polymorpha* sowie die Glucosedehydrogenase (GLD) von *Drosophila melanogaster*, die Glucoseoxidase (GOX) von *Aspergillus niger* und die Cholindehydrogenase (CHD) von *Escherichia coli*. Mit Ausnahme der GOX und der GLD verwenden alle diese Enzyme verschiedene Substrate. Gemeinsam ist diesen Flavoenzymen jedoch eine βαβ-Falte (Wierenga et al., 1986) in der Nähe des N-Terminus, die sehr wahrscheinlich für die Bindung des ADP-Teils des FADs verantwortlich ist. Auch darüber hinaus zeigen die Mitglieder der GMC-Oxidoreduktase eine signifikante Ähnlichkeit in der Primärstruktur. Sie weisen außerdem ein konserviertes GMC-Oxidoreduktase-Muster auf (Cavener, 1992; Mizuguchi et al., 1998).

Weitere, den Alkoholoxidasen eigene Motive sind eine mögliche N-Terminale Peroxisomenzielsequenz (Nishimura et al., 1996 und Flynn et al., 1998) sowie eine C-terminale Peroxisomenzielsequenz, welche lediglich aus einem Tripeptid besteht. Dieses Tripeptid wurde zunächst als SKL-Motiv festgelegt, später jedoch durch verschiedene Arbeiten zu der konservierten Sequenz [S/T/A/G/C/N/P/H]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y] erweitert (Gould et al., 1989; De Hoop & Ab, 1992; Nishimura et al., 1996; Waterham et al., 1997; Birdsey & Danpure 1998).

Die erläuterten Analysen der Alkoholoxidasen wurden ausschließlich für Hefen durchgeführt. Doch auch in einigen filamentösen Pilzen konnten Homologien zu AOX-Genen nachgewiesen werden. Hierbei zeigen sich jedoch nicht alle Alkoholoxidase-homologen Gene für eine Alkoholoxidaseaktivität verantwortlich. So bleibt beispielsweise die Bedeutung eines Alkoholoxidase-Gens von *P. chrysogenum* unklar (Schreiner et al., 1995; Holzmann et al., 2002). Auch die aus dem Pflanzenpathogen *C. victoriae* isolierte Alkoholoxidase zeigt nur eine geringe Methanoloxidationsaktivität, und die Expression des entsprechenden Gens konnte nicht durch Methanol als einzige Kohlenstoffquelle induziert werden (Ghabrial, 2001). Das Alkoholoxidase-homologe Gen konnte jedoch durch die Infektion des Pilzes mit einem isometrischen dsRNA-Virus induziert werden und zeigt sich verantwortlich für die virale RNA-Hüllprotein-Assoziation und die Regulation der viralen Pathogenese. Die Bindung der RNA erfolgt hierbei durch das Protein in dem oben beschriebenen βαβ-Motiv, welches normalerweise den Co-Faktor FAD bindet.

Für die Alkoholoxidase des Tomatenpathogens *C. fulvum* konnte eine Aktivität gegenüber Methanol, aber auch Ethanol, Propanol und in geringem Maße Butanol bestimmt werden. Außerdem spielt die Alkoholoxidase hier eindeutig eine Rolle als Pathogenitätsfaktor (Segers et al., 2001). *In vitro* ergab sich die höchste Expression des Gens in Kohlenstoffmangelmedium. *In planta* konnte das Gen zu jedem Zeitpunkt detektiert werden, wobei sich die stärksten Signale bei 10 bis 12 Tagen nach der Infektion zeigten. Sieben Tage nach der Infektion zeigten sich nur schwache Signale. Die gezielte Disruption des AOX-Gens führte zu einer extremen Reduktion der Virulenz, wobei die Rolle der AOX in diesem Zusammenhang weiter unklar bleibt. Segers et al. (2001) mutmaßen, dass die AOX Methanol oder Ethanol metabolisieren könnte, welche beide in Tomatenblättern vorkommen. Ebenfalls in Betracht gezogen wird der Abbau von Ethanol, welches bei Gärungsprozessen während der Infektion entstehen könnte. Auch eine Rolle der Alkoholoxidase für die Produktion von H_2O_2 als Co-Substrat für eine Gewebe-degradierende Peroxidase wird diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das Weizenpathogen *F. graminearum*, ähnlich dem Tomatenpathogen *C. fulvum*, ebenfalls ein Alkoholoxidase-Gen besitzt. Ferner sollte die mögliche Rolle einer AOX in *F. graminearum* untersucht werden. Hierfür sollte ein Alkoholoxidase-Gen nach der Identifikation in *F. graminearum* gezielt disruptiert werden. Anschließend sollte die Analyse der K.O.-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp erfolgen, wobei die Pathogenität des Pilzes im Vordergrund stand.

1.3.3. Polyketidsynthasen (PKS)

Ein weiteres, in dieser Arbeit untersuchtes Gen gehört zur Klasse der Polyketidsynthasen. Die Polyketide umfassen eine große Gruppe komplexer und in ihrer Struktur divergenter Naturprodukte, die vermehrt eine starke Bioaktivität aufweisen. Häufig bilden die Polyketide auch die Zwischenprodukte wichtiger Sekundärmetabolite. Bekannt sind Triketide, Tetraketide, aber auch Dekaketide, die durch Zyklisierung, Enolisierung, Methylierung und andere Reaktionen zu komplexen Molekülen umgewandelt werden.

In die Gruppe der Polyketide gehören Antibiotika, Krebstherapeutika, Immunosuppressoren, antiparasitische Agenzien, Antifungizide und cardiovasculare Agenzien (Khosla & Zawada, 1996; Khosla et al., 1999; Lal et al., 2000) sowie Phytoalexine, Pigmente und ungesättigte Fettsäuren (Ferrer et al., 1999; Jez et al., 2000; Metz et al., 2001). Den pharmazeutisch genutzten Gruppen gehören beispielsweise die Antibiotika Rifamycin, Erythromycin und Tetracyclin an. Ferner sind das Immunosuppressivum Rapamycin, das Antiprotozoikum Monensin und das Antiparasitikum Avermectin sowie zahlreiche Phytopathotoxine (T-Toxin, PM-Toxin) und Mycotoxine (u.a. Aflatoxin, Sterigmatocystin, Ochratoxin, Patulin, Zearalenon, Fumonisin) zu nennen (Steyn, 1992; Yang et al., 1996; Brown et al., 1996; Yun et al., 1997; Paitan et al., 1999; Khosla et al., 1999; Proctor et al., 1999; Lal et al., 2000; Metz et al., 2001). Auch das für viele human- und phytopathogene Pilze bedeutsame Melanin ist der Gruppe der Polyketide zuzuordnen (Taylor et al., 1987; Chumley & Valent, 1990; Howard & Valent, 1996; Langfelder et al., 1998; Tsai et al., 1998; Thompson et al., 2000; Feng et al., 2001; Langfelder et al., 2003). Ferner wurden für Eukaryoten und für Prokaryoten PKSs für die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren beschrieben. Diese Fettsäuren bilden essentielle Membranbestandteile sowie Vorstufen lipidartiger Signalmoleküle (Metz et al., 2001).

Die PKSs sind eng verwandt mit den Fettsäuresynthasen. Sie verknüpfen ebenfalls über zyklische Schritte der decarboxylativen Kondensation C-Körper miteinander zu Polymeren. Hierbei dienen den PKSs C2-, C3- oder C4-Körper, wie Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, Butyryl-CoA sowie deren aktivierte Derivate als Startermoleküle (Khosla et al., 1999). An diese werden Acetyl- oder Propionyl-Einheiten angeknüpft (Lal et al., 2000). Die Fettsäuresynthase hingegen nutzt in der Regel einen Butyryl- oder, wenn nicht verfügbar, einen Acetyl-Rest als Startermolekül. Auf diesen wird nach und nach ein carboxyliertes Acetyl-CoA (Malonyl-CoA) übertragen, wodurch es zur Strangverlängerung kommt (Karlson et al., 1994; Proctor et al., 1999). Anders als die Fettsäuresynthasen kommt es bei den PKS-Reaktionen nicht zwingend nach jeder Strangverlängerung zu einer Ketoreduktion, Dehydratation und Enoylreduktion. Die PKS kann zwar, aufgrund der unten beschriebenen Domänen, unter Umständen all diese Modifikationen ausführen, doch kommt es häufig auch zu keiner oder nur zur partiellen Reaktion. Diese Möglichkeit führt zu einer umfassenden Komplexität der synthetisierten Produkte (Yang et al., 1996; Khosla und Zawada, 1996; Khosla et al., 1999).

Nach Khosla et al. (1999) können mindestens drei Typen an PKSs unterschieden werden: (1) Der Typ I, welcher analog ist zu den Fettsäuresynthasen der Vertebraten, ist typisch für pilzliche PKSs. Es handelt sich hierbei um ein großes multidomänes Protein, welches

die verschieden aktiven Motive trägt, die für die Polyketid-Biosynthese notwendig sind. (2) In den iterativen[4] PKSs des Typs II sind die aktiven Motive auf mehrere kleine Enzyme verteilt, die in der Regel monofunktional sind (Khosla et al., 1999; Paitan et al., 1999; Lal et al., 2000). Diese PKSs zeigen Analogien zu bakteriellen Fettsäuresynthasen. (3) Der Typ III der PKSs beinhaltet die sogenannten modularen PKSs, in denen Module aufeinander folgen, die jeweils die aktiven Motive (häufig nochmals in repititiver Abfolge) tragen. Im Rahmen der Elongation kommt es hierbei zu einem Transport des sich verlängernden Moleküls von Modul zu Modul, wobei es zu einer komplexeren, weil seriellen, Modifikation des C-Körpers kommt. Die Abfolge der Module könnte mit dem clusterartigen Aufbau mehrerer PKS-Gene des Typs I verglichen werden. Paitan et al. (1999) und Lal et al. (2000) ordnen diese Gruppe der PKSs deshalb ebenfalls dem Typ I zu. Yang et al. (1996) unterscheiden hierbei noch den Subtyp I (entspricht PKS Typ I nach Khosla et al., 1999) sowie den Subtyp II (entspricht Typ III nach Khosla et al., 1999).

Jede PKS trägt als Minimum die drei folgenden Domänen (Khosla et al., 1999; Lal et al., 2000): (1) Eine β-Ketoacylsynthase (KS), (2) eine Acyltransferase (AT) und (3) ein Acylträgerprotein ("acyl carrier protein", ACP). Zusätzlich können spezifische Kombinationen weiterer Domänen zur fortschreitenden Modifikation des entstehenden Polyketids führen. Hierbei handelt es sich beispielsweise um eine Ketoreduktase (KR), eine Dehydratase (DH), eine Enoylreduktase (ER) und eine Thioesterase (TE).

Die AT-Domäne ist verantwortlich für die Selektion der Strang-verlängernden Einheiten (Acetyl oder Propionyl). Die KS-Domäne katalysiert die Kondensation zur Verknüpfung der Einheiten. Die ACP-Domäne bindet die wachsende Polyketid-Kette zwischen den Kondensationsschritten über eine Thioesterbindung an einen Phosphopanthotenarm und nimmt zudem die Elongationseinheit von der AT-Domäne entgegen. Das Ketoesterprodukt, welches aus diesen Kerndomänen hervorgeht, wird anschließend optional durch die reduktiven Domänen (ER, KR und DH) prozessiert. Das Vorhandensein einer TE-Domäne, die sich in der Regel am Ende einer PKS befindet, kann zur Bildung eines makrozyklischen Moleküls führen. Die PKS-Produkte können abschließend durch Post-PKS-Modifikationen weiter variiert werden (Lal et al., 2000).

Die Analyse pilzlicher *PKS*-Gene zeigte, dass hier zwei Unterklassen unterschieden werden können (Bingle et al., 1999). Zum einen die MSAS-Klasse (benannt nach der 6-Methylsalicylsäuresynthase aus *Aspergillus terreus*) und zum anderen die WA-Klasse (benannt nach dem wA-Gen aus *A. nidulans*). Im folgenden sollen exemplarisch einige Bereiche vorgestellt werden, in denen PKSs, vorwiegend der WA-Klasse, eine Rolle spielen. In diesen Beispielen soll die Komplexizität der PKSs und die Diversität ihrer Produkte aufgezeigt werden. Abschließend wird erläutert, warum eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit u.a. die Disruption einer PKS in *F. graminearum* war.

[4] iterativ = sich wiederholend

Pigmente

In *Aspergillus nidulans* wurde eine Mutante analysiert, die in der Pigmentierung ihrer Konidien gestört ist (Mayorga & Timberlake, 1992). Für den Verlust der dunkelgrünen Pigmentierung konnten die beiden Genloci *wA* („white Conidial") und *yA* („yellow Conidial“) verantwortlich gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es zur Umwandlung eines farblosen Precursors durch das Produkt des *wA*-Gens in ein gelbes Pigment kommt. Dieses wird durch die *ya*-codierte Laccase in das grüne Endprodukt umgewandelt. Die nähere Untersuchung des WA Polypeptids zeigte eine signifikante Ähnlichkeit zu prokaryotischen und eukaryotischen PKSs sowie zu Fettsäuresynthasen der Vertebraten. Hierbei zeigten sich Homologien zur KS-, zur AT- und zur ACP-Domäne. Diese bilden die "Grundeinheiten" der PKSs sowie der Fettsäuresynthasen. Es konnte jedoch keine Fettsäuresynthase-spezifische KR-Domäne detektiert werden. Statt dessen fand sich im WA-Peptid eine für PKSs charakteristische TE-Domäne (Langfelder et al., 1998; Feng et al., 2001). Alle Fakten weisen somit auf die Bildung eines gelben Polyketids hin, welches anschließend, in einer Post-PKS-Modifikation, durch das Genprodukt von yA (Laccase) zu einem grünen Pigment umgesetzt wird.

Als weiteres Pigment, welches zum Teil auf eine PKS zurückzuführen ist, beinhaltet Melanin eine Gruppe diverser polymerer Verbindungen aus makrozyklischen Untereinheiten. Diese spielen in einer Reihe von pathogenen Pilzen (Polak, 1989; Butler et al., 2001; Langfelder et al., 2003), wie z.B. dem Reispathogen *Magnaporthe grisea* (Chumley & Valent, 1990; Howard & Valent, 1996) sowie den Humanpathogenen *Cryptococcus neoformans* (Kwon-Chung & Rhodes, 1986; Polacheck & Kwon-Chung, 1988), *Aspergillus fumigatus* (Jahn et al., 1997; Langfelder et al., 1998; Tsai et al., 1998) und *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis* (Dixon et al., 1987; Schnitzler et al., 1999; Feng et al., 2001) eine Rolle in der Virulenz. Sie sind jedoch nicht essentiell für das eigentliche Wachstum des jeweiligen Pilzes. Melanisierte Pilze zeigen eine höhere Resistenz gegenüber UV-, Röntgen- oder Gammastrahlung und sind besser gegen hydrolytische Enzyme wie Chitinase oder Glucanase geschützt (Polak, 1989). Melanin besitzt ferner die Fähigkeit, Metalle zu binden und fungiert als physiologischer Redoxpuffer und Radikalfänger (Langfelder, 2003).

Die Synthese des Melanins verläuft in Pilzen entweder über einen Phenoloxydasen- (z.B. Laccasen oder Tyrosinasen; Hogan et al., 1996; Langfelder et al., 2003) oder einen PKS-Syntheseweg (Taylor et al., 1987; Chumley & Valent, 1990; Howard & Valent, 1996; Feng et al., 2001; Langfelder et al., 2003). Der Phenoloxidasen-Syntheseweg ist in erster Linie charakteristisch für Basidiomyceten; der PKS-Syntheseweg für Ascomyceten (Feng et al., 2001).

Das über den Phenoloxidaseweg synthetisierte Melanin wird als DOPA-Melanin (nach einer ersten Vorstufe, dem L-3,4-Dihydroxyphenylalanin [DOPA]) bezeichnet. Der PKS-Syntheseweg bringt das DHN-Melanin (bezeichnet nach einem Zwischenprodukt, dem 1,8-Dihydroxynaphthalen [1,8-DHN]) hervor.

Unter Nutzung des spezifischen Syntheseweg-Inhibitors Tricyclazol, die Zufütterung von Metaboliten und die Studie Melanin-defizienter Mutanten konnte der PKS-Syntheseweg

biochemisch weitgehend aufgeklärt werden (Taylor et al., 1987; Chumley & Valent, 1990; Howard & Valent, 1996; Feng et al., 2001; Langfelder et al., 2003). Genetisch ist dieser Weg bislang nicht vollständig aufgeklärt. In *M. grisea* konnten jedoch vier Gene identifiziert werden, die in die Melanin-Biosynthese involviert sind (Howard & Valent, 1996; Thompson et al., 2000). Eines dieser Gene zeigt eine signifikante Homologie zu PKSs anderer Pilze und ist vermutlich für die anfängliche Bildung des Pentaketids verantwortlich. *M. grisea* zeigt eine starke Melanisierung der Appressorien-Zellwand und des Septums, welches den Keimschlauch vom Appressorium trennt. Vermutlich spielt die Melanisierung in diesem Zusammenhang eine Rolle für die Starrheit und Stabilität der Zellwand der Appressorien. Diese können hierdurch einem zeitweiligen Turgordruck von ca. 80 bar standhalten, durch welchen *M. grisea* befähigt ist, eine spezialisierte Hyphe in die unverletzte Wirtsepidermis zu stoßen (Howard & Valent, 1990; Clergeot et al., 2001). Melanindefizienten Mutanten fehlt die Fähigkeit zum Aufbau eines hohen Turgors im Appressorium. Sie können intakte Wirtspflanzen nicht mehr penetrieren.

Auch in den Humanpathogenen *A. fumigatus* und *W. dermatitidis* konnten Gene identifiziert werden, die zeigen, dass ein DHN-Melanin-Syntheseweg vorliegt (Tsai et al., 1997; Tsai et al. 1999; Langfelder et al., 2003). In dem Atemwegspathogen *A. fumigatus* zeigte eines der identifizierten Gene eine hohe Homologie zu anderen PKSs aus Pilzen, insbesondere zu dem *wA*-Gen aus *A. nidulans* und einem PKS-Gen aus *Colletotrichum lagenarium* (Langfelder et al., 1998; Tsai et al., 1998). Letzteres spielt eine Rolle im DHN-Melanin-Biosyntheseweg (Takano et al., 1995). Des weiteren ließ sich die Pigmentation der Konidien von *A. fumigatus* durch den DHN-Melanin-Inhibitor Tricyclazol hemmen (Langfelder et al., 1998). Nicht melanisierte Mutanten von *A. fumigatus* zeigten im Maus-Modell eine deutlich verminderte Virulenz. Dieser Zustand konnte durch eine Komplementierung des PKS-Gens wieder rückgängig gemacht werden (Jahn et al., 1997; Langfelder et al., 1998). Die gezielte Disruption des PKS-Gens führte umgekehrt zu einer verminderten Virulenz im Mausmodell (Brakhage, 2002). In der Schwarzhefe *W. dermatitidis* konnte das Gen einer putativen PKS (WdPks1) mit den typischen konservierten Bereichen der KS-, AT-, ACP- und TE-Domäne identifiziert werden (Feng et al., 2001). Nach Disruption des *WdPKS1*-Gens kam es zur Ausbildung von Albino-Mutanten. Zufütterungsstudien führten zu einer Remelanisierung. Dieses Ergebnis, im Zusammenhang mit früheren biochemischen Aufklärungen der Melaninbiosynthese von *W. dermatitidis* (Taylor et al., 1987), weist darauf hin, dass das *WdPKS1*-Gen hiermit im Zusammenhang steht. Es ist vermutlich, wie die PKS-Gene in *M. grisea* und *A. fumigatus,* für die Bildung eines Pentaketids verantwortlich. Schnitzler et al. (1999) zeigten, dass die Melanisierung von *W. dermatitidis* den Pilz vor der Eliminierung in den Phagolyosomen der Neutrophilen schützt. Ferner zeigen melanisierte Zellen von *W. dermatitidis* generell eine höhere Resistenz gegenüber Zellwand-lysierenden Enzymgemischen, wie z.B. Zymolase oder Glusulase (Taylor et al., 1987).

Bei *A. fumigatus* scheint zusätzlich zum DHN-Melanin- der DOPA-Melanin-Syntheseweg vorzuliegen. Die Biosynthese des DOPA-Melanins sowie dessen Bedeutung für die Virulenz von *A. fumigatus* muss jedoch noch aufgeklärt werden (Brakhage, 2002).

Antibiotika

Eine weitere Gruppe der Polyketide beinhaltet klinisch eingesetzte Antibiotika. Das Erythromycin beispielsweise ist eines der erstendeckten Macrolide (große makrozyklische Polyketide) und wird als Breitband-Antibiotikum eingesetzt Es wird durch *Saccharopolyspora erythraea* gebildet und zeigt eine hohe Aktivität gegenüber *Mycobacterium leprae* und *Mycobacterium avium*. Erythromycin wird durch eine modulare PKS (Typ III nach Khosla et al., 1999; bzw. Typ I nach Paitan et al.,1999 und Lal et al., 2000) gebildet. Der Erythromycin-PKS-Cluster enthält drei multifunktionelle Proteine (Khosla et al., 1999; Lal et al., 2000). Die hierfür codierenden Gene sind um ein Gen angeordnet, welches dem produzierenden Stamm von *S. erythraea* eine Erythromycinresistenz vermittelt (Lal et al., 2000). Am C-Terminus der letzten funktionellen Einheit liegt eine TE-Domäne, welche den Ringschluss des Heptaketids zum makrozyklischen Lacton 6-Desoxythronolid B katalysiert. Abschließend erfolgt die Post-Modifikation zu dem Aglykon Erythromycin A (Lal et al., 2000).

Ähnlich wie für das Erythromycin, erfolgt auch die Synthese des Rapamycins aus *Streptomyces hygroscopius* mit seiner antitumoralen und immunosuppressiven Wirkung. Der verantwortliche PKS-Cluster hat eine Größe von 107 kb, wobei die Gene der modularen PKS etwa 80 kb umfassen (Lal et al., 2000; Khosla et al. 1999). Der gesamte Cluster enthält drei große Gene. Zwischen diesen liegt ein weiteres Gen, welches möglicherweise den Ringschluss des Macrolids katalysiert (Lal et al., 2000). Ähnlich wie die Erythromycin-PKS, bestehen auch die Rapamycin-PKS Proteine jeweils aus mehreren Modulen.

Als drittes Beispiel für die modularen PKS soll hier das Rifamycin aufgeführt werden. Dieses 1959 erstmals isolierte Antibiotikum wird durch den Actinomyceten *Amycolatopsis mediterranei* produziert und zeigt Aktivität gegen Tuberkulose, Lepra und weitere mycobakterielle Infektionen (Yu et al., 1999 und Lal et al., 2000). Als Startereinheit dient hier der Aromat 3-Amino-5-hydroxybenzoesäure, auf den durch 10 Module, welche auf fünf PKS-Proteinen liegen, Propionat und Acetateinheiten übertragen werden. Es entsteht schließlich ein Undecaketid, welches in einer Post-PKS-Modifikation in das makrozyklische Rifamycin umgewandelt wird (Yu et al., 1999).

Phytopathotoxine

Neben klinisch eingesetzten Antibiotika zeigen PKS-Produkte eine Bioaktivität im Pathosystem Pilz/Pflanze. Hier weist das PKS-Produkt des Pathogens gegenüber dem Wirt eine toxische Wirkung auf und zeigt damit in seiner Eigenschaft als Phytopathotoxin eine Bedeutung als Pathogenitätsfaktor.

Der heterothallische Ascomycet *Cochliobolus heterostrophus* (anamorph: *Bipolaris* [*Helminthosporium*] *maydis*) wurde in zwei Rassen aufgeteilt, die sich in Hinsicht ihrer Virulenz gegenüber männlich sterilem Texas (T) Mais unterscheiden (Yoder & Gracen, 1974; Yang et al., 1996). Die Rasse T produziert T-Toxine, eine Familie von langkettigen linearen Polyketiden. Diese binden spezifisch an ein Protein (URF13) der inneren Mitochondrienmembran (Dewey et al., 1987; Rhoads et al., 1995). Die Bindung des T-Toxins führt

zur Bildung von hydrophilen Poren in der inneren Mitochondrienmembran, was auch durch heterologe Expression in *E. coli* gezeigt werden konnte (Siedow et al., 1995). Die Abwesenheit des URF13 Proteins führt zu einer Resistenz der Pflanze gegenüber der T-Rasse von *C. heterostrophus*. Lediglich der T-Mais verfügt über das Protein URF13 (Yang et al., 1996).

Die Synthese des T-Toxins erfolgt im genetisch definierten Genlocus *Tox1*, in dem sich die Rasse T und die Rasse O unterscheiden. Dieser Genort besteht aus zwei Loci (*Tox1A* und *Tox1B*) auf zwei verschiedenen Chromosomen (Turgeon et al., 1995). Die *PKS1* aus *C. heterostrophus* ist im *Tox1A*-Locus lokalisiert. *Tox1B* trägt ein Gen, welches homolog zu einer Azetoazetatdecarboxylase ist. Die Disruption dieses Gens zeigte eine signifikante Reduktion in der Produktion des T-Toxins und in der Virulenz von *C. heterostrophus* (Rose et al., 2002). Es wird somit vermutet, dass der Genort des Locus *Tox1B* für die Modifikation der T-Toxin-Polyketidkette verantwortlich ist (Yang et al., 1996; Rose et al., 2002).

Nach Yang et al. (1996) war zunächst unklar, ob es sich bei der *PKS1* aus *C. heterostrophus* um eine iterative oder eine modulare PKS des Typ I handelt. Das T-Toxin Molekül enthält drei bis vier funktionale Gruppen (Keto-, Hydroxyl- und Alkylgruppe), die durch eine PKS entstanden sind. Die PKS, welche ein Molekül dieser Art synthetisiert, muss eine KS-, eine AT- und eine ACP-Domäne für die Kettenverlängerung sowie eine KR-, DH- und ER-Domäne für die β-Ketogruppen-Prozessierung besitzen. Die *PKS1* codiert jede der sechs essentiellen Domänen und enthält somit alle für die notwendigen Schritte der Polyketidbildung erforderlichen Informationen.

Ähnlich wie *C. heterostrophus* produziert auch *Mycosphaerella zeae-maydis* (teleomorphe Form von *Phyllosticta maydis*) ein Toxin (PM-Toxin), gegen welches sich ausschließlich die Texas Maissorte (T) mit sterilem männlichen Cytoplasma hoch suszeptibel verhält (Comstock et al., 1973; Yoder, 1973; Yun et al., 1998). Bei diesem Toxin handelt es sich ebenfalls um ein langkettiges, lineares Polyketid, welches spezifisch an das Protein URF13 bindet (Dewey et al., 1987; Levings & Siedow, 1992; Siedow et al., 1995; Rhoads et al., 1995). Auch hier konnte das verantwortliche Gen als PKS-Gen identifiziert werden, welches zudem eine hohe Homologie zur *ChPKS1* aus *C. heterostrophus* zeigte (Yun et al., 1997, Yun et al., 1998). Diese, als *MzmPKS1* bezeichnete, PKS zeigte die gleichen sechs enzymatischen Domänen wie die *ChPKS1*. Ferner wurde ein weiterer offener Leserahmen gefunden, der signifikante Homologien zu Reduktasen aufwies, die mit pflanzlichen und bakteriellen PKSs assoziiert sind. Die gezielte Disruption dieses Leserahmens führte ebenfalls zu einem Verlust des PM-Toxins. Es könnte sich bei der *MzmPKS1* somit um eine modulare PKS handeln (Yun et al., 1997).

Mykotoxine

Eine weitere Gruppe der Polyketide bilden die Mykotoxine, die als hochtoxische Substanzen den Endverbraucher (Mensch oder Nutztier) von belasteten Nahrungsmitteln schädigen. Die Aflatoxine bildeten in den 60iger Jahren den Beginn der Mycotoxinforschung und umfassen mehr als 20 verschiedene Toxine. Diese heterozyklischen Verbindungen, die von verschiedenen Stämmen der Ascomyceten *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasi-*

ticus synthetisiert werden, zählen zu den stärksten bekannten leberkrebsauslösenden Substanzen (Eaton & Groopman, 1994; Bürgerinformation Mykotoxine, 1999; Engelhardt, 2002). Für die Synthese der Aflatoxine ist eine PKS des Typs I verantwortlich, die mit einem Paar spezieller Fettsäuresynthasen eine funktionelle Einheit bildet. Die in *A. parasiticus* als *pksA* identifizierte PKS zeigt eine signifikante Homologie zu dem PKS Gen (*wA*) von *Aspergillus nidulans* (Chang et al., 1995). Durch ein Dimer dieser Einheiten, den als Norsolorininsäuresynthase bezeichneten Multienzymkomplex, wird das zyklische Polyketid Norsolorininsäure gebildet (Brobst & Townsend, 1994; Chang et al., 1995). Durch eine Superfamilie von Oxygenasen wird die Norsolorininsäure in über 15 Redoxreaktionen zum Aflatoxin umgesetzt (Sweeny & Dobson, 1999; Watanabe & Townsend, 2002; Townsend 2003). Neben der Produktion der Aflatoxinintermediate scheint die *pksA* auch für die Bildung eines gelben Pigments verantwortlich zu sein (Chang et al., 1995).

Die Mating Population A von *Gibberella fujikuroi* (anamorph *Fusarium moniliforme*), einem häufigen Maispathogen, bildet das Mykotoxin Fumonisin, welches als Verursacher der tödlich verlaufenden Leukoencephalomalacia bei Pferden sowie von Speiseröhrenkrebs bei Menschen identifiziert wurde (ApSimon, 1994). Des weiteren zeigt sich bei Ratten ein hohes Leberkrebspotential (Wang et al., 1991; Proctor et al., 1999). Wang et al. (1991) zeigten, dass Fumonisin B_1 den Einbau von Serin in zelluläre Sphingolipide inhibiert. ApSimon (1994) erklärt mit der Beteiligung der Sphingolipide in der Zellmembran, insbesondere in Hirn- und Nervengewebe, den Effekt des Fumonisins auf die Leukoencephalomacia. Da die Sphingolipide außerdem in der Zell zu Zell Kommunikation, dem Zellwachstum, der Differenzierung und der Transformation eine Rolle spielen, könnte dies, nach ApSimon (1994), eine Erklärung für die cancerogene Wirkung des Fumonisins sein.

Aufgrund seiner langkettigen Struktur und der starken Ähnlichkeit zu Sphinganin, einem Fettsäurederivat innerhalb des Sphingolipidstoffwechsels, wurde zunächst angenommen, dass Fumonisin durch eine Fettsäuresynthase generiert würde. Die Modifikationen der langkettigen Struktur sprach jedoch auch für einen Polyketidsynthaseweg (Proctor et al., 1999). Proctor et al. (1999) gelang es, eine PKS in *G. fujikuroi* zu identifizieren, die zum Zeitpunkt der Fumonisinbildung in Kultur exprimiert wurde. Diese PKS zeigte die höchste Homologie zu der *PKS1* aus *C. heterostrophus* (Yang et al., 1996) und trägt sechs charakteristische Domänen (KS, AT, DH, ER, KR und ACP). Eine TE-Domäne wurde nicht gefunden. Ferner besitzen pilzliche Fettsäuresynthasen in der Regel zwei Peptiduntereinheiten, auf welche die entsprechenden Domänen verteilt sind. Dieser Fakt, in Verbindung mit dem Verlust der Fumonisin-Synthese durch die gezielte Disruption des PKS-Gens, ließ den Schluss zu, dass die Fumonisin-Biosynthese durch eine PKS erfolgt (Proctor et al., 1999).

Weitere aus *Fusarium sp*. bekannte mycotoxine Polyketide sind das Zearalenon, das Fusarin und das Moniliformin (Steele et al., 1974; Blackwell et al., 1985; Barrero et al., 1991; Steyn, 1992; ApSimon, 1994; Linnemannstöns et al., 2002), die genetisch bislang nicht aufgeklärt sind. Zearalenon weist eine östrogene und anabolische Wirkung auf. Fusarin zeigt im Ames Test eine mutagene Wirkung, und Moniliformin bedingt akute toxische Effekte auf Hühner, Enten und Ratten.

Allgemeine Bioaktivität

Ein weiteres Polyketid mit einer diversen bioaktiven Wirkung ist das rote Pigment Bikaverin. Es wurde erstmals von Kreitmann & Nord (1949) aus *Fusarium lycopersici* isoliert und ist außerdem auch in *Fusarium oxysporum* und *G. fujikuroi* zu finden (Cornforth et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002). Nach der anfänglichen Bezeichnung als Lycopersin wurde es später in Bikaverin umbenannt (Cornforth et al., 1971;).

Strukturell handelt es sich bei Bikaverin um ein Benzoxanthonringsystem, für dessen Generierung zunächst ein Polyketid als Vorstufe angenommen wurde (Kjær et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002), welches mit Orsellininsäure als Startermolekül beginnt. Studien mit radioaktiven [^{13}C]-Isotopen zeigten jedoch, dass neun Acetat-Moleküle durch Kondensation zunächst eine Polyketidkette bilden, welche anschließend zum Bikaverin-Skelett gefaltet und verbunden wird (McInnes et al., 1976).

Aufgrund seiner antiprotozoalen und antifungalen Aktivität hat das Bikaverin an Bedeutung gewonnen (Kjær et al., 1971; Cornforth et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002). Cornforth et al. (1971) beschrieben eine senescente Wirkung des Bikaverins aus *F. oxysporum* auf andere Pilze. Balan et al. (1970) wiederum erzielten mit Bikaverin aus *G. fujikuroi* zwar letale Effekte gegen *Leishmania brasiliensis*, konnten jedoch selbst mit hohen Konzentrationen keinen Effekt gegen *Trypanosoma cruzi*, *Euglena gracilis*, *Astasia chattoni*, *Strigomonas culicidarum*, *Tetrahymena pyriformis* sowie gegen Bakterien und Pilze erzielen. Auch eine Inhibition mitochondrialer Funktionen in Tumorzellen und isolierten Rattenlebermitochondrien konnte gezeigt werden, wobei Bikaverin als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung fungiert (Kováč et al., 1978). Darüber hinaus zeigten Kováč et al. (1978) einen starken hämolytischen Effekt des Bikaverins.

Linnemannstöns et al. (2002) konnten ein PKS-Gen (*pks4*) identifizieren, welches vier funktionale Domänen (KS, AT, ACP und TE) trägt und signifikante Homologien zu dem *pksP/alb1*-Gen aus *A. fumigatus*, dem *Pks1*-Gen aus *C. lagenarium* und dem *wA*-Gen aus *A. nidulans* zeigt. Die Disruption des pks4-Gens führt zu einem Verlust der Bikaverinbiosynthese (Linnemannstöns et al., 2002). Das Produkt des *pks4*-Gens könnte somit die Kondensation der neun Acetat-Körper zu einem Nonaketid katalysieren, welches anschließend zum Bikaverin-Skelett umgesetzt wird.

Die angeführten Beispiele zeigen auf, dass es sich bei den Polyketiden um eine divergente Gruppe mit zahlreichen Mitgliedern handelt. Insbesondere Pigmente sowie toxische Verbindungen sind sehr zahlreich vertreten. In *F. graminearum* wurden bisher die als Mykotoxine bekannten Substanzen Zearalenon und Fusarin als Polyketide identifiziert, wobei es zur Zeit noch keine genetischen Hinweise auf den Syntheseweg gibt. In weiteren Fusarien-Spezies finden sich zahlreiche Polyketide mit mykotoxischer sowie allgemeiner Bioaktivität. Yoder & Turgeon (2001) nennen insgesamt 35 mögliche PKS-Gene für *F. graminearum*, wobei sich diese Angaben auf ein nichtpubliziertes Genomprojekt stützen. Ebenfalls untersuchte Saprophyten weisen, im Gegensatz zu den analysierten pathogenen Pilzen, lediglich null bis sieben PKS-Gene auf (Yoder & Turgeon, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, ein PKS-Produkt von

F. graminearum zu identifizieren, zu charakterisieren und zu disruptieren. Abschließend sollten die generierten K.O.-Mutanten in ihrem Verhalten charakterisiert werden. Hierbei sollte die Pathogenität im Vordergrund stehen. Ebenfalls sollte eine mögliche Bioaktivität gegenüber anderen Mikroorganismen analysiert werden. Ferner sollte eine mögliche Änderung der Zellsensitivität gegenüber UV-Strahlung und Temperatur sowie ein Einfluss auf die Konidiation untersucht werden. Mit diesen Versuchen soll die Bedeutung der Polyketide in *F. graminearum* näher bestimmt werden.

1.4. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Transformationssystem etabliert werden, welches die effiziente und gezielte Disruption von Genen in *F. graminearum* ermöglicht. Hierfür sollten sowohl Replacement-Vektoren als auch Insertions-Vektoren konstruiert und in eine PEG-vermittelte Transformation eingesetzt werden.

Nach Etablierung des Transformationssystems sollten gezielt die Gene eines Aquaporins, einer Alkoholoxidase sowie einer Polyketidsynthase ausgeschaltet werden. Die K.O.-Transformanden sollten anschließend charakterisiert und im Pflanzen-Assay auf ihre Pathogenität gegenüber *Triticum aestivum* getestet werden.

Aquaporine wurden bislang nur in wenigen Pilzen identifiziert und bisher nicht als Pathogenitätsfaktor postuliert. Da sie jedoch in zahlreichen physiologischen Zusammenhängen eine Rolle spielen, sollte ihre Funktion im Pathogen *F. graminearum* untersucht werden.

Eine Alkoholoxidase wurden bereits als Virulenzfaktor eines Pflanzenpathogens charakterisiert. Es sollte geprüft werden, ob diese Funktion auch im Pathosystem *F. graminearum*/*T. aestivum* zu beschreiben ist.

Polyketide umfassen eine große Gruppe diverser Stoffklassen, von denen einige als Pathogenitätsfaktoren oder bioaktive Substanzen beschrieben wurden. Da Polyketide auch in *F. graminearum* vorkommen, sollte untersucht werden, ob sich eine Polyketidsynthase als Pathogenitätsfaktor oder Toxin identifizieren lässt.

In allen genannten Fällen lagen bereits Sequenzen aus anderen Organismen vor, so dass degenerierte Primer erstellt und somit grundlegende Sequenzen aus der genomischen Sequenz von *F. graminearum* amplifiziert und bearbeitet werden konnten. Diese Sequenzen sollten zur weiteren Charakterisierung vervollständigt werden. Die Ausnahme bildet das Alkoholoxidase-Gen. Hier wurde über die Suche in einer cDNA-Bank ein Sequenzabschnitt zur Grundlage genommen, der vervollständigt wurde.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Enzyme und allgemeines Material

Die im nachfolgenden aufgeführten Chemikalien, Enzyme und Membranen wurden von den Firmen AGS (Heidelberg), Amersham (Braunschweig), Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym (Hessisch Oldendorf), Difco (USA), Ducefa (Niederlande), DYNAL (Norwegen), Gibco BRL (Eggenstein), Interspex (USA), Invitrogen (Karlsruhe), Macherey-Nagel (Düren), MBI Fermentas (Frankreich), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), MWG (Ebersberg), New England Biolabs (Schwalbach), peqlab (Erlangen), Pharmacia (Schweden), Promega (Mannheim), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Schleicher & Schüll (Dassel) und Sigma (Taufkirchen) bezogen. Weitere Hersteller werden gesondert aufgeführt.

Das für alle Lösungen und Reaktionen verwendete doppelt deionisierte Wasser entstammte einer Millipore Aufbereitungsanlage der Firma Milli-Q Water Systems (Millipore, Eschborn) und wird im folgenden als H_2O bezeichnet.

Die zu sterilisierenden Medien, Lösungen, Gefäße und Pipettenspitzen wurden für 20 min bei 120 °C und 2 x 10^5 Pa autoklaviert. Lösungen und Medien wurden zum Teil sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm).

Für PCR Reaktionen wurden in dieser Arbeit Thermocyler der Firma Hybaid (Heidelberg; Sprint und Express), der Firma MWG (Ebersberg; Primus 25 und Primus 96) und der Firma Perkin Elmer Cetus (USA) genutzt.

Zur Massen- und Größenabschätzung von DNA wurden die folgenden DNA-Marker eingesetzt: GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas ; 100 bis 3000 bp), GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas; 100 bis 10000 bp), Lambda DNA/*Hin*dIII Marker 2 (MBI Fermentas; 564 bis 23130 bp) und SmartLadder (Eurogentec, Belgien; 200 bis 10000 bp).

2.1.2. Organismen

2.1.2.1. Pflanzen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Pathogenitätstests wurden die folgenden suszeptiblen Weizensorten (*Triticum aestivum* L.) verwendet: *Nandu* (Sommerweizen, „European Wheat Database[5]“ [EWDB] 58436, Accession Nummer RICP 01C0203421), *Munk* (Sommerweizen, EWDB 58451, Accession Nummer RICP 01C0203436) und *Florida* (Winterweizen, EWDB 3189, Accession Nummer RICP 01C0103544).

[5] http://genbank.vurv.cz/ewdb/asp/ewdb_sur31.asp?START=2201&cnt_code=DEU

2.1.2.2. Pilze

2.1.2.2.1. *Fusarium graminearum* Schwabe

Der in dieser Arbeit durchgängig verwendete Wildtypstamm von *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph: *Gibberella zeae* [Schwein] Petch) trägt die Bezeichnung 8/1 (im folgenden bezeichnet als *Fg* 8/1) und wurde freundlicherweise von T. Miedaner (Landessaatzuchtanstalt, Hohenheim) zur Verfügung gestellt.

2.1.2.2.2. *Nectria haematococca und Pyrenophora teres*

Für einen Versuch zur Wachstumshemmung von Organismen durch einen Extrakt aus *Fg* 8/1 wurden die beiden pflanzenpathogenen filamentösen Pilze *Nectria haematococca* (anamorph: *Fusarium solani*, MP VI Isolat 77-2-3, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch H.D. Van Etten, University Arizona, USA) und *Pyrenophora teres* (Isolat 6A, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Steffenson, USA) eingesetzt.

2.1.2.2.3 Hefeartige Pilze

Für den unter 2.2.2.2. genannten Versuch zur Wachstumshemmung von Organismen durch einen Extrakt aus *Fg* 8/1 wurden die folgenden hefeartig wachsenden Pilze eingesetzt: *Saccharomyces cerevisiae* JRY-645*, Candida albicans* SC 5314*, Candida parapsilosis* C32*, Pichia pastoris* KM 31 (Invitrogen) und *Geotrichum candidum* DSM 1240 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [DSMZ]).

2.1.2.3. Bakterien

2.1.2.3.1. Gram-negative Bakterien

Für die Klonierungsarbeiten wurden in dieser Arbeit die *Escherichia coli* Stämme XL1-Blue (Stratagene), DH5α (Gibco BRL) und Top10 (Invitrogen) verwendet.

Für die oben angeführten Wachstumshemmversuche wurde neben *E. coli* DH5α auch das Bakterium *Pseudomonas aeroginosa* eingesetzt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Fortnagel, Hamburg).

2.1.2.3.2. Gram-positive Bakterien

Ebenfalls für die Wachstumshemmversuche wurden die Bakterien *Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* verwendet (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Fortnagel, Hamburg).

2.1.3. Vektoren

2.1.3.1. Vektoren für die Subklonierung in Escherichia coli

- **pGEM®-T (Promega) und pCR®-XL-TOPO® (Invitrogen)**

  Diese Vektoren wurden für die Ligation und Amplifikation von PCR-Produkten genutzt.

- **pUC19 (New England Biolabs)**

  Dieser Vektor wurde für die Ligation und die Amplifikation von Restriktionsfragmenten eingesetzt.

- **pGUS5 (Mönke und Schäfer, 1993)**

  Dieser Vektor trägt neben dem *E. coli* β-Glucuronidase Expressionsgen auch das aus *E. coli* stammende Hygromycin B Phosphatase-Gen (*hph*-Gen) zur Hygromycin Resistenz. Dieses Gen steht unter der Kontrolle des Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase-Promotors (*gpd1*-Promotor) aus *Cochliobolus heterostrophus*. Das Plasmid wurde für die Generierung von Konstrukten mit dieser hph-Kassette eingesetzt.

- **pALα (Lösch, 1997; Maier & Schäfer, 1999)**

  Dieser Vektor besitzt die zwei promotorlosen Reportergene β-Glucuronidase und Luciferase, die über eine „multiple cloning site“ (MCS) miteinander verbunden sind. Er besitzt ein pUC19 Rückgrat und das *hph*-Gen zur Selektion. Letzteres steht unter der Kontrolle des *gpd1*-Promotors aus *Cochliobolus heterostrophus*. Der Vektor wurde in dieser Arbeit zur Konstruktion von K.O.-Vektoren als Template für die hph-Kassette genutzt.

2.1.3.2. Vektoren für die Transformation von Fusarium graminearum

Zur Konstruktion von Vektoren für die Transformation wurden die folgenden Plasmide zu Grunde gelegt:

- **pAN7-1 (Punt et al., 1987)**

  Hierbei handelt es sich um einen Vektor, der zur Transformation von Pilzen hergestellt wurde. Er trägt das *hph*-Gen aus *E. coli* unter der Kontrolle des *gpd1*-Promotors aus *Aspergillus nidulans* und erlaubt somit die Selektion der Pilztransformanden auf Hygromycin.

- **pUCmin/VaHyg**

  Dieser für die Transformation von *F. graminearum* erstellte Vektor wurde freundlicherweise von der BASF AG (Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt. Er trägt im Minimal-Rückgrat von pUC19 (Sequenz zur Ampicillinresistenz und zum Replikationsursprung) die hph-Kassette aus dem pGUS5 Vektor.

2.1.3.3. In dieser Arbeit generierte Vektoren bzw. für deren Erstellung genutzte Plasmide

Im folgenden wird die Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren kurz beschrieben. Der Vollständigkeit halber werden an dieser Stelle auch Vektoren genannt, die unmittelbar vor Beginn dieser Arbeit durch F.J. Maier erstellt und dann direkt im Rahmen der hier beschriebenen Studien weiter bearbeitet wurden. Hinzu kamen Versuche zur Entwicklung von Plasmiden, deren Konstruktion jedoch nicht gelang.

- **pGEM-T/HomoFgA8**

  Mit degenerierten Primern (DEG HOM I und DEG HOM II), die auf der Aminosäuresequenz verschiedener Homoaconitase-Gene basierten, wurde aus genomischer DNA von *F. graminearum* ein 1757 bp großes Fragment amplifiziert und in pGEM®-T ligiert. Der Vektor wurde freundlicherweise von F.J. Maier zur Verfügung gestellt.

- **pUC/HomoFgA8-2**

  Aus dem Plasmid pGEM-T/HomoFgA8 wurde ein 1791 bp großes Fragment (Insert plus 44 bp Vektor-Rückgrat) mit *Eco*52I herausgeschnitten. Die 3‘ überhängenden Enden wurden mit Klenow-Fragment (Roche) nach Herstellerangaben aufgefüllt. Anschließend erfolgte die Ligation in den mit *Sma*I linearisierten pUC19 Vektor.

- Versuche für **K.O. HomoA8-Hyg**

  Für die Konstruktion eines Knockout-Vektors, in dem die als Selektionsmarker dienende hph-Kassette von Regionen des zu deletierenden Gens (hier: Homoaconitase) flankiert wird, fanden verschiedene Strategien Verwendung.

  In mehreren Experimenten wurden sowohl der Vektor pGEM-T/HomoFgA8 als auch der Vektor pUC/HomoFgA8-2 zugrunde gelegt. Die Vektoren wurden jeweils mit *Eco*147I im Insert linearisiert. Nacheinander wurden die folgenden Versuche durchgeführt:

  1. Die hph-Kassette wurde mit den Enzymen *Ehe*I und *Bsa*BI aus dem Vektor pGUS5 herausgeschnitten.
  2. Die hph-Kassette wurde aus dem Vektor pAN7-1 mit (a) den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI bzw. (b) dem Enzym *Afl*II herausgeschnitten.
  3. Die hph-Kassette wurde aus dem Vektor pALα mit den Primern SmaIgroßFw und SmaIgroßRev amplifiziert und anschließend mit dem Enzym *Sma*I verdaut.

  Die unter Punkt eins bis drei erhaltenen hph-Kassetten sollten anschließend in die linearisierten Vektoren ligiert werden. Überhängende Enden wurden hierbei mit dem Klenow-Fragment (Roche) nach Herstellerangaben aufgefüllt.

- **pGEM-T/SacFg-F4**

  Mit degenerierten Primern (DEGSacchDH1 und DEGSacchDH2), die auf der Aminosäuresequenz verschiedener Saccharopindehydrogenase-Gene basierten, wurde aus genomischer DNA von *F. graminearum* ein 1050 bp großes Fragment amplifiziert und

in den pGEM®-T Vektor ligiert. Der Vektor wurde freundlicherweise von F.J. Maier zur Verfügung gestellt.

- **pUC/SacFgF4-10**

  Aus dem Plasmid pGEM-T/SacFg-F4 wurde ein 1486 bp großes Fragment (Insert plus 436 bp Vektor-Rückgrat) mit *Pvu*II herausgeschnitten und in den mit *Sma*I linearisierten pUC19 Vektor ligiert.

- Versuche für **K.O. SacF4-Hyg**

  Wie unter dem Punkt „Versuch für K.O.HomoA8-Hyg“ beschrieben, wurden hier ebenfalls die dort genannten, verschiedenen Strategien zur Konstruktion eines K.O.-Vektors mit einer von Zielgenfragmenten flankierten hph-Kassette durchgeführt. Auch hier wurden in mehreren Experimenten sowohl der Vektor pGEM-T/SacFgF4 als auch der Vektor pUC/SacFgF4-10 zugrunde gelegt. Die Vektoren wurden jeweils mit *Ksp*AI im Insert linearisiert, und es wurde versucht, die oben beschriebenen hph-Kassetten einzufügen.

- **pGEM-T/AQPFg-37**

  Unter Verwendung von degenerierten Primern (AQP-fw und AQP-rev), die auf den Aminosäuresequenzen homologer Regionen von Aquaporinen (AQP) verschiedener Organismen basierten, wurde aus genomischer DNA von *F. graminearum* ein 432 bp großes Fragment amplifiziert und in den pGEM®-T Vektor ligiert. Der Vektor wurde freundlicherweise von F.J. Maier zur Verfügung gestellt.

- **pUC/AQP-4**

  Aus dem aufgeführten Vektor pGEM-T/AQPFg-37 wurde das Insert mit *Pvu*II herausgeschnitten (Insert plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) und in den mit *Sma*I linearisierten pUC19 Vektor hineinligiert.

- Versuche für **K.O. AQP37-Hyg**

  In diesem Versuch wurden ebenfalls die unter den Punkten „Versuch für K.O.HomoA8-Hyg“ und „Versuch für K.O. SacF4-Hyg“ beschriebenen, verschiedenen Strategien zur Konstruktion eines K.O.-Vektors mit einer von Zielgenfragmenten flankierten hph-Kassette durchgeführt. Auch hier wurden in mehreren Experimenten sowohl der Vektor pGEM-T/AQPFg-37 als auch der Vektor pUC/AQP-4 zugrunde gelegt. Die Vektoren wurden jeweils mit *Bpi*AI im Insert linearisiert, um die oben beschriebenen hph-Kassetten einzufügen.

- **pGEM-T/AQP37-A7**

  Ausgehend vom Vektor pGEM-T/AQPFg-37 wurde mit den Primern AQP37InvA und AQP37InvB eine Inverse PCR für eine Deletion von Basen und die Einfügung einer Restriktionsschnittstelle (*Eco*47III) durchgeführt (Material und Methoden 2.2.5.8.4.). Über eine Selbstligation des Amplifikationsproduktes aus der Inversen PCR entstand der Vektor pGEM-T/AQP37-A7.

- **pAN7-1/AQP37-A7-62**

  Mit *Pvu*II wurde das Insert (plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) aus dem Vektor pGEM-T/AQP37-A7 herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert.

Mit den Primern SMTAIL1FAQP bis -3FAQP sowie SMTAIL1RAQP bis -3RAQP und den AD-Primern (FJM-tail-AD1-9) wurde, ausgehend von der bekannten Sequenz aus dem Vektor pGEM-T/AQPFg-37, eine TAIL-PCR (Material und Methoden 2.2.5.8.7.) durchgeführt. Die folgenden Vektoren beinhalten Fragmente aus dieser PCR.

- **pGEM-T/AQPFAD5.1.**

  In den pGEM®-T Vektor wurde das 1300 bp große TAIL-Produkt der Primer FJM-tail-AD5 und SMTAIL3FAQP ligiert.

- **pGEM-T/AQPRAD4.2.**

  In den pGEM®-T Vektor wurde das 750 bp große TAIL-Produkt der Primer FJM-tail-AD4 und SMTAIL3RAQP ligiert.

- **pGEM-T/AQPRAD5.2**

  In den pGEM®-T Vektor wurde das 900 bp große TAIL-Produkt der Primer FJM-tail-AD5 und SMTAIL3RAQP ligiert.

- **PGEM-T/FgAQPgr14**

  Ausgehend von den durch die TAIL-PCR erhaltenen Sequenzinformationen wurde das Primerpaar AQPgrF und AQPgrR-2 erstellt. In einer Standard PCR mit genomischer DNA wurde ein 1536 bp großes Fragment amplifiziert und in den pGEM®-T Vektor ligiert.

- **pGEM-T/PKSFg-59**

  Unter Verwendung von degenerierten Primern (LC1 und LC2c, Bingle et al., 1999), die auf der Aminosäuresequenz homologer Regionen von Polyketidsynthase (PKS)-Genen aus *Aspergillus nidulans*, *Colletotrichum lagenarium*, *Penicillium patulum* und *Aspergillus parasiticus* basierten, wurde aus genomischer DNA von *F. graminearum* ein Fragment in der Größe von 835 bp amplifiziert und in den pGEM®-T Vektor ligiert. Der Vektor wurde freundlicherweise von F.J. Maier zur Verfügung gestellt.

- **pAN7-1/PKSFg-59**

  Aus dem Vektor pGEM-T/PKSFg-59 wurde mit *Pvu*II (schneidet vor und hinter der MCS von pGEM®-T) ein 1271 bp langes Fragment (Insert plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert. Das Genfragment lag anschließend im Vektor in Nachbarschaft zu der hph-Kassette.

Ausgehend von der in pGEM-T/PKSFg-59 vorliegenden Sequenz wurden Primerpaare erstellt, welche die Amplifikation um eine *Eco*47III Schnittstelle erlaubten, die im Fragment vorlag. Die Primer wurden so gewählt, dass die *Eco*47III-Schnittstelle ungefähr in der Mit-

te der amplifizierten Sequenzen lag. Durch die Ligation dieser Fragmente entstanden die folgenden Plasmide:

- **pGEM-T/PKSFg-100.1**
  Mit den Primern PKS F 100 und PKS R 100 entstand ein PCR-Produkt der Größe von 106 bp.
- **pGEM-T/PKSFg-200.1**
  Mit den Primern PKS F 200 und PKS R 200 entstand ein PCR-Produkt der Größe von 200 bp.
- **pGEM-T/PKSFg-300.1**
  Mit den Primern PKS F 300 und PKS R 300 entstand ein PCR-Produkt der Größe von 301 bp.
- **pGEM-T/PKSFg-400.1**
  Mit den Primern PKS F 400 und PKS R 400 entstand ein PCR-Produkt der Größe von 401 bp.
- **pGEM-T/PKSFg-500.2**
  Mit den Primern PKS F 500 und PKS R 500 entstand ein PCR-Produkt der Größe von 498 bp.
- **pGEM-T/PKSFg-600.2**
  Mit den Primern PKS F 600 und PKS R 600 entstand ein PCR-Produkt der Größe von 598 bp.
- **pAN7-1/PKS100.1.12**
  Mit *Pvu*II wurde das Insert (plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) aus dem Vektor pGEM-T/PKSFg-100.1 herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert.
- **pAN7-1/PKS200.1.20**
  Mit *Pvu*II wurde das Insert (plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) aus dem Vektor pGEM-T/PKSFg-200.1 herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert.
- **pAN7-1/PKS300.1.16**
  Mit *Pvu*II wurde das Insert (plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) aus dem Vektor pGEM-T/PKSFg-300.1 herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert.
- **pAN7-1/PKS500.2. 25**
  Mit *Pvu*II wurde das Insert (plus 436 bp Plasmid-Rückgrat) aus dem Vektor pGEM-T/PKSFg-500.2 herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert.

Ausgehend von dem in pGEM-T/PKSFg-59 vorliegenden Insert wurden Primerpaare für eine Inverse PCR zur Identifizierung der flankierenden Sequenzen (Material und Metho-

den 2.2.5.8.5.) erstellt. Die erste PCR wurde mit den Primern iPKS1 und iPKS2 durchgeführt. Die Produkte der anschließenden „*nested*“ PCR, mit den Primern iPKS1b und iPKS2b, wurden in den pCR®-XL-TOPO® Vektor ligiert, wodurch die folgenden Plasmide entstanden:

- **TOPO-XL/PKSG3.3.**
  Die genomische DNA wurde für die Inverse PCR mit dem Enzym *Xho*I restringiert. Es konnte ein 2514 bp großes Fragment amplifiziert und ligiert werden.
- **TOPO-XL/PKSC5.3.**
  Die genomische DNA wurde für die Inverse PCR mit dem Enzym *Pst*I restringiert. Es konnte ein 2559 bp großes Fragment amplifiziert und ligiert werden.

Ausgehend von den Sequenzinformationen der Inserts in TOPO-XL/PKSG3.3. und TOPO-XL/PKSC5.3. wurden mehrere TAIL-PCR-Durchgänge mit den Primern tailPKS1c-e sowie tailPKS2c-h durchgeführt, um die weiteren flankierenden genomischen Sequenzen zu identifizieren. Im Rahmen dieser TAIL-PCR entstanden die folgenden Plasmide:

- **pGEM-T/PKSAD41E.1**
  Das Plasmid enthält ein mit den Primern FJM-tail-AD4 und tailPKS1e amplifiziertes Fragment in der Größe von 513 bp.
- **pGEM-T/PKSAD72E.3**
  Das Plasmid enthält ein mit den Primern FJM-tail-AD7 und tailPKS2e amplifiziertes Fragment in der Größe von 832 bp.
- **pGEM-T/ PKSAD82H.1**
  Das Plasmid enthält ein mit den Primern FJM-tail-AD8 und tailPKS2h amplifiziertes Fragment in der Größe von 995 bp.
- **pGEM-T/PKSB1**
  Aufgrund der durch die Inverse PCR, die TAIL-PCR und der vorliegenden cDNA-Bank erlangten Sequenzinformationen konnten Primer erstellt werden, die vor und nach dem Start Codon des PKS Gens lagen. Aus cDNA konnte mit den Primern PKS-V-Start und PKS R 600 ein 1914 bp großes Fragment amplifiziert werden, welches in den pGEM®-T Vektor ligiert wurde.
- **TOPO-XL/PKSC2**
  Vergleichbar mit dem Fragment aus dem vorherigen Vektor, wurde hier ein PCR-Produkt mit den Primern PKS F 600 und PKS-N-Stop amplifiziert. Das 4864 bp große Fragment wurde in den pCR®-XL-TOPO® Vektor ligiert.
- **pUCmin/AOX**
  Aus einer cDNA-Bank von *F. graminearum* wurde ein EST-Klon ausgewählt, der eine hohe Homologie zu der Alkoholoxidase (AOX) aus *Cladosporium fulvum* (Segers et al., 2001) aufwies. Mit den spezifischen Primern ANK530AOX und ANK531AOX, die

eine *Not*I bzw. eine *Asc*I Erkennungsstelle haben, wurde aus dem gewählten cDNA Klon ein 559 bp großes Fragment amplifiziert. Nach Verdau mit den genannten Enzymen entstand ein 539 bp großes Fragment, das in den mit *Not*I und *Asc*I linearisierten Vektor pUCmin/VaHyg einligiert wurde. Der Vektor konnte für die Transformation von *F. graminearum* mit dem Enzym *Xho*I im Insert linearisiert werden.

- **pGEM-T/AOX38**

  Durch eine Textsuche in der vorliegenden cDNA-Bank konnte ein weiterer cDNA Klon mit Homologie zum genannten Gen der Alkoholoxidase aus *Cladosporium fulvum* identifiziert werden. Die Sequenz dieses zweiten Klons zeigte eine Homologie im 5'-Bereich der Alkoholoxidase-Gene. Die im Vektor pUCmin/AOX enthaltende Sequenz zeigte eine Homologie im 3'-Bereich. Durch den Einsatz eines Primerpaars (AOXF1 und AOXR1), das die Zusammengehörigkeit der beiden Sequenzen voraussetzte, konnte ein Fragment in einer Größe von 2031 bp amplifiziert werden, welches in den Vektor pGEM®-T ligiert wurde.

- **pGEM-T/AOX-M-1**

  Ausgehend von der in pGEM-T/AOX38 enthaltenen Sequenzinformation wurde das Plasmid pGEM-T/AOX-M-1 generiert. Als Template diente hier cDNA, die aus mit *F. graminearum* infizierten Weizenähren stammte. Die eingesetzten Primer (AOXINF1 und AOXINR1) sollten die beiden in der cDNA-Bank identifizierten Abschnitte des putativen Gens überbrücken und den „Mittelteil" bilden. Es wurde ein 683 bp großes Fragment amplifiziert und in den Vektor pGEM®-T ligiert.

Ausgehend von der Sequenzinformation des Vektors pGEM-T/AOX38 wurde mit den Primern AOXT1a-c sowie AOXT2a-c eine TAIL-PCR durchgeführt. Hieraus entstanden die folgenden Plasmide:

- **pGEM-T/AOXAD71c.1**

  Mit den Primern FJM-tail-AD7 und AOXT1c konnte ein 1224 bp großes Fragment amplifiziert werden. Dieses wurde in den pGEM®-T Vektor ligiert.

- **pGEM-T/AOXAD22c.4**

  Mit den Primern FJM-tail-AD2 und AOXT2c konnte ein 999 bp großes Fragment amplifiziert werden. Dieses wurde in den pGEM®-T Vektor ligiert.

Für eine Kontrolle der synthetisierten cDNA aus mit *F. graminearum* infizierten Weizenähren sollten pflanzenspezifische Primer eingesetzt werden. Hierfür wurden Primer gewählt, die ein Fragment des *gpd*-Gens amplifizieren sollten. Die Primer GAP1 und GAP2 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch D. Becker) wurden ursprünglich aus der Sequenz der für den Photosyntheseapparat spezifischen *gpd* von Mais (Quigley et al., 1989) abgeleitet.

- **pGEM-T/GAP-N-1**

  Aus der cDNA einer Weizenähreninfektion (Zeitpunkt 24 h) durch *F. graminearum* konnte mit den genannten GAP-Primern ein 623 bp großes Fragment amplifiziert werden. Dieses wurde in den pGEM®-T Vektor kloniert.
- **pGEM-T/GAP-M-1**

  Aus der cDNA einer nichtinfizierten Weizenähre konnte mit den GAP-Primern ein 623 bp großes Fragment amplifiziert werden. Dieses Fragment wurde in den pGEM®-T Vektor ligiert.
- **pGEM-T/GAP-Q-1**

  Auch aus cDNA von *F. graminearum* konnte mit den genannten GAP-Primern ein Fragment amplifiziert werden. Dieses Fragment hatte ebenfalls eine Größe von 623 bp und wurde in den pGEM®-T Vektor kloniert.

2.1.4. Oligonukleotide

Im folgenden sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide in alphabetischer Reihenfolge aufgelistet. Die Positionen der spezifischen Primer in den entsprechenden Genen sind im Anhang aufgeführt.

ANK530AOX	5‘-ATA AGA ATG CGG CCG CTC AAG ATC CGA CCA ACT GA-3‘
ANK531AOX	5‘-AAA TGG CGC GCC ATT TGA GTT TGC GGC TGC A-3‘
ANK568AOX	5‘-TGG AAC TGA AGG GTA CTG GA-3‘
AOXF1	5‘-TCT CGA CCC ATT TCT TCA ACG-3‘
AOXINF1	5‘-TGA GGG CCC AAT CAA GGT CTC-3‘
AOXINR1	5‘-ACT CCT TGA GTT CCT GCT CAG-3‘
AOXR1	5‘-AGG AGA AGA CCA GCT TCC GTG-3‘
AOX-START	5‘-ATG GCG TCT TCC AAC TCG TAC G-3‘
AOXT1a	5‘-AGA CTT GGA TTT CCG TTA CTT ACC-3‘
AOXT1b	5‘-TTG TGA TCG AGG TTG GCA AGT C-3‘
AOXT1c	5‘-TAC GAT AAT GTC AAA CTC CTC G-3‘
AOXT2a	5‘-TGA TCC TTA TGA CAC TCC CG-3‘
AOXT2b	5‘-AAC GAT GAG CGA GAC ATG GTT C-3‘
AOXT2c	5‘-TGG TAC GTC AAT CTC CTA ACT C-3‘
AOX-V-Stop	5‘-TCA TCT CAA GAG CCT CGC CAG AG-3‘
AQP3‘a	5‘-TCG GTT TCT CTC TCA TGG TCA ACG-3‘
AQP3‘SM	5‘-CAT GTT GAT GGT CAA GGC C-3‘
AQP37InvA	5‘-AGC GCT CTT CTA CTG CTG AAC TGG TCT TTA C-3‘
AQP37InvB	5‘-GAT GAA ACA CCC TGG ACC AGA GAT GCA C-3‘
AQP5‘a	5‘-ACA CGG CGA TCA GAG AAC CG-3‘
AQP5‘SM	5‘-AGT AAA CCC AGT GCT CGG-3‘
AQPFB	5‘-GAC AGG AGA AGT CCG AGA TCA TG-3‘
AQP-fw (F.J. Maier, pers.)	5‘-TCC GGC GGC CAC ATN AA($^{C}/_{T}$) CCN GCN G-3‘
AQPgrF	5‘-AGT TTT ACA GCA GTG ACG ACC C-3‘
AQPgrR-2	5‘-CGC AGG CAT TCA AGC AGA TTC-3‘
AQP-rev (F.J. Maier, pers.)	5‘-GAA GGG GCC GAT CCA G($^{A}/_{T}$)A NA($^{C}/_{T}$) CCA ($^{A}/_{G}$)TG-3‘
DEGSacchDH1 (F.J. Maier, pers.)	5'-CAC CTG GCG GGC CGA ($^{A}/_{G}$)AC NAA ($^{A}/_{G}$)CC-3'
DEGSacchDH2 (F.J. Maier, pers.)	5'-GCA GCA GGG AGG GCA ($^{A}/_{G}$) ($^{A}/_{G}$)T G($^{A}/_{G}$)T C($^{A}/_{G}/^{T}$)A T-3'
DEG HOM I (K. Sonnenberger, pers.)	5‘-CGG CCA CCA GAT CAT GAT ($^{A}/_{C}/^{T}$)GA ($^{A}/_{G}$)GA-3‘

DEG HOM II (K. Sonnenberger, pers.)	5‘-GATG GAG TTC CGG GAG AAG AT($^{A}/_{G}$) TTN CC($^{A}/_{G}$) AA-3‘
Fc01F (Nicholson et al., 1998)	5‘-ATG GTG AAC TCG TCG TGG C-3‘
Fc01F (Nicholson et al., 1998)	5‘-CCC TTC TTA CGC CAA TCT CG-3‘
Fg16F (Nicholson et al., 1998)	5‘-CTC CGG ATA TGT TGC GTC AA-3‘
Fg16R (Nicholson et al., 1998)	5‘-GGT AGG TAT CCG ACA TGG CAA-3‘
FgBetaTubF (N. Jenczmionka, pers.)	5‘-TGC TGT TCT GGT CGA TCT TG-3‘
FgBetaTubR (N. Jenczmionka, pers.)	5‘-GAC GGA AGT TTG GAC GTT G-3‘
FJM-tail-AD1 (Liu et al., 1995)	5’-NGT CGA ($^{G}/_{C}$)($^{A}/_{T}$)G ANA ($^{A}/_{T}$)GA A-3’
FJM-tail-AD2 (Arie et al., 1997)	5’-GTN CGA ($^{G}/_{C}$)($^{A}/_{T}$)C ANA ($^{A}/_{T}$)GT T-3’
FJM-tail-AD3 (Liu et al., 1995)	5’-($^{A}/_{T}$)GT GNA G($^{A}/_{T}$)A NCA NAG A-3’
FJM-tail-AD4 (Liu et al., 1995)	5’-NTC GA($^{G}/_{C}$) T($^{A}/_{T}$)T ($^{G}/_{C}$)G($^{A}/_{T}$) GTT-3’
FJM-tail-AD6 (Liu and Whittier, 1995)	5’-TG($^{A}/_{T}$) GNA G($^{A}/_{T}$)A NCA ($^{G}/_{C}$)AG A-3’
FJM-tail-AD7 (Liu and Whittier, 1995)	5’-AG($^{A}/_{T}$) GNA G($^{A}/_{T}$)A NCA ($^{A}/_{T}$)AG G-3’
FJM-tail-AD8 (Liu and Whittier, 1995)	5’-CA($^{A}/_{T}$) CGI CNG AIA ($^{G}/_{C}$)GA A-3’
FJM-tail-AD9 (Liu and Whittier, 1995)	5’-TC($^{G}/_{C}$) TIC GNA CIT ($^{A}/_{T}$)GG A-3’
GAP1 (D. Becker, pers.)	5‘-AGG GTG GTG CCA AGA AGG TGG-3‘
GAP2 (D. Becker, pers.)	5‘-GTA GCC CCA CTC GTT GTC GTA-3‘
gpdI	5'-TCC CCC GGG GGA GCG AGG TGG GTG ATG TAG C-3'
hyg	5'-TCC CCC GGG GGA CAG CTC TTG TTC GGT CGG C-3'
iPKS1	5’-TGC CAC CTG TAG TCT GCA ATC AG-3’
iPKS1b	5’-CCA GGA TCC GAC TGC TCA G-3’
iPKS2	5’-TGA CTA ACC CTG ACA ACT TCG CTG-3’
iPKS2b	5’-CTA CAT CGA GAT GCA CGG CAC-3’
Lac197 ([PKS] T. Lacour, pers.)	5‘-AGG GTC CTT ACA ATT TGG GAG GAT G-3‘
Lac198 ([PKS] T. Lacour, pers.)	5‘-AAT ACA CAA ACA GCC CTC TCC ATC G-3‘
Lac92 ([pUC/minVaHyg] T. Lacour, pers.)	5‘-CGG CTA CAC TAG AAG GAC AGT ATT TGG TA-3‘
Lac93 ([pUC/minVaHyg] T. Lacour, pers.)	5‘-GTC AGG CAA CTA TGG ATG AAC GAA ATA GAC-3‘
LC1 ([PKS] Bingle et al., 1999)	5'-GA(T/C) CCI (A/C)GI TT(T/C) TT(T/C) AA(T/C) ATG-3'
LC2c ([PKS] Bingle et al., 1999)	5'-GTI CCI GTI CC(A/G) TGC AT(T/C) TC-3'
M13/pUC Reverse Sequencing Primer [-24]	5’-AAC AGC TAT GAC CAT G-3’
M13/pUC Sequencing Primer [-20]	5’-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3’
NJ7 ([MAPK33F] N. Jenczmionka, pers.)	5‘-GCG ATA CTT CAA CCA CGA GAA C-3‘
NJ8 ([MAPK33R] N. Jenczmionka, pers.)	5‘-GCA GCG GAT CGC GCA AGA CCG-3‘
PKS F 100	5'-GAG CGT TCA CTC CTG GTC G-3'
PKS F 200	5'-GTT TGT TCG CGT TTC ACG AC-3'
PKS F 300	5'-CAA CAG TGG GCA GAA TGT CG-3'
PKS F 500	5'-GAG GCG CTT GAG ATG GCT AG-3'
PKS F 600	5’-CTG AGC AGT CGG ATC CTG G-3’
PKS forward	5'-GCG CTT GAG ATG GCT AGT ATC G-3'
PKS R 100	5'-CAA GCC AAG TGC AAG CCA AC-3'
PKS R 200	5'-CGC CCG CAA TAG CTG TAT C-3'
PKS R 300	5'-GAA GTG GCC TCG GTC CAA AC-3'
PKS R 500	5'-CAA AGG TGT TGC AGT TGC CTG-3'
PKS R 600	5’-GAT GAT GGT TCC GAC GCC-3’
PKS revers	5'-GTG CCG TGC ATC TCG ATG TAG-3'
PKS-N-Stop	5’-ACA AAC AGC CCT CTC CAT CGT G-3’
PKS-V-Start	5’-ACA ACT ACT TGG AGT TCA AAC CAC-3’
SmaIgroßFw	5‘-TCC CCC GGG GGA AGA TGC GTA AGG AGA AAA TAC CGC-3‘
SmaIgroßRev	5‘-TCC CCC GGG GGA GTG TTT GTG GAC GAA GTA CCG AA-3‘
SMTAIL1FAQP	5‘-GAT AGT AAA GAC CAG TTC AGC AG-3‘
SMTAIL1RAQP	5‘-TCT TCA TCG AGG CTC TTC TTA C-3‘
SMTAIL2FAQP	5‘-CAC CAA GAG TGG TTC GAA CGT T-3‘

SMTAIL2RAQP	5‘-TTC ATT GCT CCC GTC GGT ATT-3‘
SMTAIL3FAQP	5‘-CAT AGA CCC GAG AAT TTG AGC G-3‘
SMTAIL3RAQP	5‘-CCT TGT GTC ATC ACC GGT AGC T-3‘
tailPKS1c	5’-TTG TTA CTG GAG AGG TAA TGA AG-3’
tailPKS1d	5’-AGC ATG GCA CTT GAC GTG ATT AAG-3’
tailPKS1e	5’-TGT TAG ACA GCA TTC GGA TCA CG-3’
tailPKS2c	5’-TGA GAC AGA TCT CGC GAG CCC TC-3’
tailPKS2d	5’-TCT TCC GTG TAC GCT GAT GTT G-3’
tailPKS2e	5’-TCG ATG TTC ACG GTA TTG AGG TCC AC-3’
tailPKS2f	5’-AGT TCG CTG GTG ACT TGT ACA TTC TTG-3’
tailPKS2g	5’-TGG TTG GTG TTT ATG GAG ACA TAA C-3’
tailPKS2h	5’-ACA ACA ATG CTA ACG TAA AGA ACA G-3’

2.1.5. cDNA-Bank von *Fusarium graminearum*

Für Teile dieser Arbeit wurden die Sequenzinformationen einer cDNA-Bank freundlicherweise durch die BASF AG zur Verfügung gestellt.

2.1.6. Medien und Lösungen

LB-Medium (Luria-Bertani, nach Sambrook et al., 1989)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H_2O ad	1000 ml

pH mit NaOH auf 7,3 einstellen.

Für Festmedium wurde 1,5 % Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren wurde ggf. Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (30 µg/ml) für eine Selektion zugesetzt. War eine Blau-Weiß Selektion erwünscht, so wurden IPTG (10 µg/ml) und X-Gal (50 µg/ml) zugefügt.

SOC-Medium (nach Sambrook et al., 1989)

Trypton	2,00 g
Hefeextrakt	0,50 g
NaCl	0,58 g
KCl	0,19 g
$MgSO_4 \bullet 7\ H_2O$	1,20 g
Glucose	3,60 g
H_2O ad	1000 ml

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

YPG-Medium

Hefeextrakt	10 g
Pepton	10 g
Glucose	20 g
H_2O ad	1000 ml

Für Festmedium wurde 1,5 % Agar zugesetzt. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

YG-Medium

Das Medium entsprach dem YPG-Medium, ohne Pepton

PDB-Medium

Das Potato-Dextrose-Broth Medium stammte von der Firma Difco und wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Für Festmedium wurde 1,5 % Agar zugesetzt. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Corn Meal Agar

Corn Meal Agar stammte von der Firma Difco und wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Stärke-Agar

Der Stärke-Agar stammte von der Firma Difco und wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

CM „Komplettmedium“ (Leach et al., 1982)

10 ml Lösung A
⇒ (1g/l $Ca(NO_3)_2 \bullet 4\ H_2O$, autoklavierbar)

10 ml Lösung B
⇒ (200 mg/l KH_2PO_4, 250 mg/l $MgSO_4 \bullet 7\ H_2O$ und 150 mg/l NaCl, Sterilfiltrat)

10 g Glucose (Sterilfiltrat in Lösung B)

1 ml Suspension C
⇒ (60,0 mg/l H_3BO_3, 390,0 mg/l $CuSO_4 \bullet 5\ H_2O$, 13,0 mg/l KI,
60,0 mg/l $MnSO_4 \bullet H_2O$, 50,6 mg/l $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \bullet 4\ H_2O$,
5480,0 mg/l $ZnSO_4 \bullet 7\ H_2O$, 932,0 mg/l $FeCl_3 \bullet 6\ H_2O$,
Steril durch 2 ml/l Chloroform)

1 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l Caseinhydrolysat (enzymatisch hydrolysiert),
0,5 g/l Caseinhydrolysat (säurehydrolysiert), gemeinsam in Lösung autoklavierbar

10 ml Suspension D

⇒ (2,5 g/l Chloramphenicol (in 20 ml Ethanol lösen),
2,5 g/l Kanamycin (in 200 ml H_2O lösen) und
1,0 g/l Tetracyclin (in 200 ml H_2O lösen),
einzeln sterilfiltrieren, zusammengeben und auf 1 l H_2O auffüllen)

Zusatz E (für Festmedium)

⇒ 16 g/l Agar, granuliert (Difco)

Die genannten Komponenten wurden einzeln angesetzt, sterilisiert, zusammengegeben und mit H_2O auf 1000 ml aufgefüllt.

Hygromycin-Selektionsmedium

Das Hygromycin-Selektionsmedium entspricht dem CM-Komplettmedium mit einem Zusatz von 100 bis 150 µg/ml Hygromycin B (Ducefa).

Protoplastenregenerationsmedium (Yoder, 1988)

Hefeextrakt	1 g
Caseinhydrolysat (enzymatisch hydrolysiert)	1 g
Saccharose	342 g
Agar (granuliert)	16 g
H_2O ad	1000 ml

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

SNA-Medium (nach Nirenberg, 1981)

KH_2PO_4	1,0 g
KNO_3	1,0 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
Glucose	0,2 g
Saccharose	0,2 g
1 N NaOH	0,6 ml
Agar (granuliert)	22,0 g

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Driselase/ Glucanase (Interspex) Enzym Lösung für die Protoplastierung

Für die Protoplastierung wurde eine „5 % Glucanase/ 3 % Driselase“-Lösung (Pilzzellwand-abbauende Enzyme) erstellt. Die Enzyme (Pulverform mit Stärkegrundlage) wurden entsprechend eingewogen und für eine halbe Stunde in 700 mM NaCl (mit 8,6 ml/l

500mM NaH_2PO_4 und 1,4 ml/l 500 mM Na_2HPO_4 auf pH 5,45 eingestellt) gelöst. Die Lösung wurde dann 10 min bei 5000 upm (Heraeus Minifuge RF) zentrifugiert, um die im Enzympulver enthaltene Stärke zu pelletieren. Abschließend wurde die Enzymlösung nacheinander über einen 1,2 µm, einen 0,45 µm und einen 0,2 µm Filter gegeben, um die Stärkereste zu entfernen und die Lösung zu sterilisieren.

Hygromycin-Selektionsagar

1,6 % Agar (granuliert) in H_2O

Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 48 °C mit Hygromycin B versetzt. Die eingesetzte Menge Hygromycin B wurde auf die wirksame Selektionsendkonzentration berechnet, die in den mit dem Selektionsagar zu überschichtenden Platten vorhanden sein sollte.

Czapek-Medium (Raper und Thorn, 1949, modifiziert)

Czapek-Konzentrat

$NaNO_3$	30,0 g
KCl	5,0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,0 g
$FeSO_4 \cdot H_2O$	0,1 g
H_2O ad	100 ml

Czapek-Flüssigmedium

Saccharose	30 g
Czapek-Konzentrat	10 ml
K_2HPO_4	1 g
H_2O ad	1000 ml

Czapek-Agar

Czapek-Flüssigmedium + 30 g Noble Agar (Difco)

Der Noble Agar wurde mit 5 l H_2O gewaschen, um mögliche Restgehalte an Aminosäuren zu entfernen.

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung des Pflanzenmaterials

Zur Aussaat wurden die Weizensamen zunächst 15 min in einer 1 %igen Natriumhypochloritlösung oberflächensterilisiert und anschließend mit Leitungswasser gewaschen. Die so behandelten Samen wurden in zweifach autoklavierter Anzuchterde ausgesät und anschließend in Klimakammern kultiviert. In diesen lag ein Wechsel von Tag (16 h Licht – 10.000 lx) und Nacht (8 h) bei einer konstanten Temperatur von 21 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % vor. Die Weizenpflanzen wurden etwa zwei Monate bis zur Blüte kultiviert und konnten dann für den in dieser Arbeit angewendeten Pathogenitätstest (Material und Methoden 2.2.6.1.) genutzt werden.

2.2.2. Kultivierung von Pilzen

2.2.2.1. Filamentöse Pilze

2.2.2.1.1. *Fusarium graminearum*

Myzel

Zur Erzeugung von Myzel wurde *F. graminearum* in der Regel in flüssigem oder auf festen CM-Medium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C, wobei die Flüssigkultur bei 150 bis 180 upm geschüttelt wurde.

Konidieninduktion

Zur Induktion von Konidien wurden SNA-Platten mit Myzel oder Konidien inokuliert und bei 18 °C unter langwelligem UV Licht (TLD 36 W-08, Philips, Niederlande) und Weißlicht (TL 40 W-33 RS, Philips, Niederlande) inkubiert. Nach ca. 5 Tagen konnten die Konidien mit sterilem Wasser abgeschwemmt und ihre Konzentration in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden.

Dauerkultur

Für die Dauerlagerung von *F. graminearum* wurden Konidien in H_2O oder Myzel auf Agar bei –70 °C kryokonserviert.

2.2.2.1.2. *Nectria haematococca* und *Pyrenophora teres*

Für Versuche der vorliegenden Arbeit wurden freundlicherweise Glycerol-Myzelstocks (*P. teres*) von B. Hadeler sowie Festmedien mit Konidien (*N. haematococca*) von C. Kröger zur Verfügung gestellt. Die beiden Pilzarten wurden für den beschriebenen Wachstumshemmtest (Material und Methoden 2.2.6.4.3.) unter Schütteln bei 28 °C in CM-Medium kultiviert.

2.2.2.2. Hefeartige Pilze

Die Kultivierung der hefeartigen Pilze erfolgte in YPG Medium unter Schütteln bei 28 °C (*S. cerevisiae, C. parapsilosis, P. pastoris* und *G. candidum*) bzw. bei 37 °C (*C. albicans*).

2.2.3. Kultivierung von Bakterien

Die in dieser Arbeit verwendeten gram-positiven und gram-negativen Bakterien wurden in LB Flüssig-Medium unter Schütteln bei 37 °C (*E. coli* und *B. subtilis*) oder 28 °C (*M. luteus* und *P. aeroginosa*) kultiviert. Des weiteren erfolgte die Kultur bei den jeweiligen Temperaturen auf LB-Platten. Bei der Arbeit mit *E. coli* nach der Transformation mit rekombinanten Plasmiden erfolgte das Wachstum in LB-Medium unter Selektionsdruck durch Ampicillin bzw. Kanamycin.

Für die Dauerkultur wurden LB-Flüssigkulturen auf eine Endkonzentration von 30 % Glycerol gebracht und bei -70 °C gelagert.

2.2.4. Transformation

2.2.4.1. Transformation von Fusarium graminearum

2.2.4.1.1. Protoplastierung

In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 50 ml CM-Medium mit 10^5 Konidien von *F. graminearum* inokuliert. Die Kultur wurde für zwei Tage bei 28 °C und 140 upm inkubiert. Die erhaltene Myzelkultur wurde in einem Waring-Blendor homogenisiert. Anschließend wurden 200 ml CM-Medium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 8 ml der gehäckselten Myzelkultur beimpft und ÜN bei 24 °C und 140 upm kultiviert.

Am nächsten Tag wurde das Myzel durch Filtrieren über einen sterilen Faltenfilter vom Medium getrennt und zweimal mit sterilem H_2O gewaschen. Zwei Gramm des Myzels wurden in 20 ml Driselase/Glucanase Lösung resuspendiert und 2 ½ bis 3 h bei 28 °C und 75 upm verdaut. Nach Kontrolle der Protoplastierung unter dem Lichtmikroskop erfolgte zur Abtrennung von nichtverdauten Myzelresten eine Filtration der Protoplastensuspension zunächst durch Verbandsmull und anschließend durch eine Nyboldmembran (50 µm Porengröße). Es wurde jeweils mit 10 ml NaCl (700 mM, pH 5,45) nachgespült, so dass es zu einem Endvolumen von 40 ml Protoplastensuspension kam. Angepaßt an Royer et al. (1995) wurden die Protoplasten in einem Ausschwingrotor bei 4 °C und 1300 x g pelletiert und in eiskalter NaCl (700 mM) gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt, wobei jetzt bei 830 x g zentrifugiert wurde. Die gewaschenen Protoplasten wurden abschließend in eiskaltem STC (800 mM Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM $CaCl_2$) resuspendiert und bis zur Transformation auf Eis gelagert. Die Lagerung der Protoplasten auf Eis war, ohne Verlust der Transformationseffizienz, bis zu einer Woche möglich.

2.2.4.1.2. Transformation

Für die Transformation wurden die Protoplasten mit vier Teilen STC und einem Teil SPTC (STC mit 40 % Polyethylenglykol 4000) auf eine Endkonzentration von 0,5 bis 2 x 10^8 pro ml gebracht. Zu 100 µl dieser Protoplastensuspension wurden 5 µl Heparin (5 mg/ml in STC) und 30 µg der zu transformierenden Plasmid DNA gegeben. Der Ansatz wurde durch Drehen des Reaktionsgefäßes vorsichtig gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde der Ansatz alle 5 min durch Drehen gemischt. Anschließend

wurde 1 ml SPTC zum Ansatz gegeben und die Inkubation für 20 min bei RT fortgesetzt. Auch während dieser Zeit wurde alle 5 min durch Drehen gemischt.

2.2.4.1.3. Regeneration der transformierten Protoplasten

Die transformierten Protoplasten wurden vorsichtig in 200 ml 43 °C warmes Regenerationsmedium eingerührt. Jeweils 20 ml dieser Lösung wurden in 94 mm Petrischalen gegossen. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert und nach Auskeimung der Protoplasten (nach 12 bis 24 h) mit 10 ml Hygromycin-Selektionsagar überschichtet (wirksame Hygromycin B Endkonzentration 100 µg/ml). Anschließend wurden die Platten weiter bei 28 °C inkubiert. Nach etwa fünf Tagen waren die Transformanden durch den Selektionsagar hindurchgewachsen und haben deutliche Myzelkolonien gebildet.

2.2.4.1.4. Kultivierung der Transformanden und Einzelkonidiation

Die Transformanden der Selektionsplatten wurden durch Ausschneiden von Myzel aus dem Überschichtungsagar auf frische CM Platten mit Hygromycin B (100 µg/ml) gesetzt und bei 28 °C inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurden Agar-Myzel-Blöckchen auf SNA Platten umgesetzt und die Konidienbildung induziert. Nach etwa fünf bis sieben Tagen hatten sich auf den SNA Platten Konidien gebildet, die mit sterilem H_2O abgeschwemmt werden konnten. Jeweils 2000 Konidien wurden auf 60 mm CM-Hygromycin-Platten (100 µg/ml) ausgespatelt. Nach der Markierung von einzeln liegenden Konidien auf der Platte unter dem Binokular, wurden diese ÜN bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurden die ausgekeimten Konidien auf frische CM-Selektionsplatten übertragen und bei 28 °C inkubiert. Durch diese Prozedur wurden Transformandenklone erhalten, die aus einer Spore entstanden und somit homokaryotisch sind, da die in der Konidie enthaltenden Kerne mitotisch aus einem Ursprungskern entstehen (Deacon, 1997). Ein Protoplast hingegen enthält mehrere Kerne, die nicht alle transformiert werden. Des weiteren neigen Protoplasten zur Fusion. Bei der Regeneration könnte somit zunächst ein heterogenes Myzel mit transformierten und nicht transformierten Kernen entstehen.

2.2.4.1.5. Variationen zur Etablierung der Transformation von *Fusarium graminearum*

Die unter Material und Methoden 2.2.4.1.1. bis 2.2.4.1.3. beschriebenen Vorgehensweisen erfolgten standardmäßig nach Etablierung des Transformationssystems. Darüber hinaus wurden folgende Modifikationen für das Standard-Transformationssystem getestet:

- Die zu transformierende DNA wurde linear und zirkulär angeboten.
- Die zu transformierende DNA wurde in Mengen von 5 µg bis 50 µg eingesetzt.
- Die zu protoplastierende Myzelkultur wurde in CM-Medium, in PDB-Medium und in YPG-Medium kultiviert.
- Für die Protoplastierung wurde Driselase oder eine Kombination aus Driselase und Glucanase eingesetzt.

- Die Protoplastierung erfolgte alternativ in 1 M $MgSO_4$ (pH 5,9 mit Natrium-phosphat-puffer eingestellt) bei 33 °C.
- Die Protoplasten wurden statt mit 700 mM NaCl als Osmotikum in 2 M und 1 M Sorbitol gewaschen.
- Die Protoplastierung erfolgte direkt aus dem Myzel einer mit 6 x 10^6 Konidien beimpften ÜN YPG-Kultur.
- Die wirksame Hygromycin B Endkonzentration im Überschichtungsmedium sowie im CM-Selektionsmedium wurde von 25 µg/ml bis 200 µg/ml variiert.

2.2.4.2. Transformation von Escherichia coli

2.2.4.2.1. Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen (DH5α, XL-1-Blue oder Top 10) erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Sambrook et al., 1989).

2.2.4.2.2. Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation verlief nach Anleitung des Herstellers bei der Nutzung elektrokompetenter Zellen (*E. coli* Top 10) aus dem pCR®-XL-TOPO® Kit von Invitrogen.

Bei der Nutzung der nach Material und Methoden 2.2.4.2.1. selbst erstellten kompetenten Zellen erfolgte die Transformation modifiziert nach Sambrook et al. (1989): 100 µl der frischen oder auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen wurden mit 10 bis 50 ng rekombinierter Plasmid DNA versetzt und 10 min auf Eis gehalten. Anschließend erfolgte für 2 min ein Hitzeschock bei 42 °C und ein erneuter Inkubationsschritt für 2 min auf Eis. Die Zellen wurden dann in 500 µl SOC Medium gegeben (vorgewärmt auf 37 °C) und 60 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde auf Selektionsmedium (LB mit Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1. Standardmethoden

Generelle Standardtechniken der Molekularbiologie, wie z.B. die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren oder die Alkoholpräzipitation, wurden nach Sambrook et al. (1989) bzw. nach Herstellerangaben durchgeführt und sind nicht extra aufgeführt. Restriktionen, Ligationen, Dephosphorylierungen, Digoxigenin-Markierungen sowie das Auffüllen von 5´-überhängenden Enden wurden entsprechend den Herstellerangaben (AGS, Gibco BRL, Invitrogen, MBI Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Roche, Stratagene) durchgeführt.

2.2.5.2. DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus Agarose erfolgte mit dem 'Nucleospin Extract-Kit' der Firma Macherey-Nagel oder mit 'Ultrafree-DA Filtrationseinheiten' der Firma Millipore.

2.2.5.3. Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden entweder das pGEM®-T Vector System-Kit (Promega) oder das pCR®-XL-TOPO® Kit (Invitrogen) verwendet. Es handelt sich hierbei um linearisierte Vektoren mit 3'-dT-Überhängen, in welche PCR-Produkte mit einem 3'-dA-Überhang einkloniert werden können. Hierbei wird der Umstand genutzt, dass die Taq DNA Polymerase aus *Thermus aquaticus* diese Überhänge Template-unabhängig an die Enden der amplifizierten Produkte anfügt. Die Klonierung in die genannten Vektoren erfolgte nach Herstellerangaben unter Zugabe von T4 DNA Ligase (pGEM®-T) oder durch die Aktivität einer Topoisomerase, die bereits am Vektor gebunden war und dort aktiviert wurde (pCR®-XL-TOPO®). Waren distinkte Banden in einem Testgel zu erkennen, wurden die zu klonierenden PCR Produkte direkt aus dem Reaktionsansatz der PCR eingesetzt. Waren im Testgel neben der erwarteten Bande weitere unspezifische Produkte zu sehen, so wurde das Produkt über die elelektrophoretische Auftrennung aufgereinigt und aus dem Gel eluiert.

2.2.5.4. DNA-Isolierung aus Organismen

2.2.5.4.1. Plasmid-Isolierung aus *Escherichia coli*

Mini-Präparation

Die Plasmid-DNA, die als Template für die Sequenzierung oder für weitere Klonierungsarbeiten eingesetzt werden sollte, wurde über das NucleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel nach den Herstellerangaben isoliert.

Maxi-Präparation

Für die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA, z.B. für die Transformation von *F. graminearum* , erfolgte die Isolierung nach Sambrook et al. (1989).

2.2.5.4.2. DNA aus *Fusarium graminearum*

Mini-Präparation

Für die Nutzung von DNA als Template für PCR-Methoden und Southern-Blot-Analysen wurde die Isolierung nach einem für Hefe optimierten Protokoll im Minimaßstab durchgeführt. *F. graminearum* wurde zunächst auf CM-Festmedium für zwei bis drei Tage bei 28 °C kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Myzel mit einem Objektträger vom Medium abgekratzt und bis ca. zur 0,5 ml Marke in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff oder bei –70 °C eingefroren. Zu dem gefrorenen Myzel wurden 650 µl Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA, 1 % SDS) gegeben. Nach Zugabe von fünf Spatelspitzen Glasperlen (Ø 100 bis 200 µm, mit konzentrierter HCl ge-

waschen und gebacken) wurde der Ansatz 5 min gevortext. Nach dem Aufschluss des Myzels wurde die flüssige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 275 µl Ammoniumacetat (7 M, pH 7) zugegeben. Der Ansatz wurde zunächst für 5 min bei 65 °C inkubiert und dann für weitere 5 min auf Eis gehalten. Nach Zugabe von 500 µl Chloroform wurde kurz gevortext und anschließend für 2 min in einer Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde nun die DNA mit 1 ml Isopropanol für 5 min bei RT gefällt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl H_2O mit RNase A (10 µg/ml) resuspendiert.

Puregene DNA Isolation Cell and Tissue Kit

Für eine höhere Ausbeute wurde die Fusarium DNA mit dem ‚Puregene DNA Isolation Cell and Tissue Kit' der Firma Biozym nach dem ‚Plant Tissue Protocols 10-30 mg' isoliert. Hierfür wurde *F. graminearum* in CM-Flüssigmedium für drei Tage bei 28 °C kultiviert. Das Myzel wurde durch einen Büchnertrichter vom Medium getrennt und bei –70 °C oder in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alternativ wurden kleinere Myzelmengen wie für die oben genannte Mini-Präparationsmethode von CM-Festmedium gewonnen. Der Aufschluss des Myzels erfolgte durch Mörsern unter flüssigem Stickstoff oder, nach Gefriertrocknen, in der Kugelmühle (MM 200, Retsch). Im Anschluss wurde entsprechend der Herstellerangaben verfahren.

Maxi-Präparation

Für die höchste Ausbeute wurde eine nach Garber und Yoder (1983) modifizierte DNA-Isolationsmethode für Pilz-DNA eingesetzt. Die Gewinnung des Myzels erfolgte aus einer CM-Flüssigkultur. Das Myzel wurde unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 6 ml Isolationspuffer (150 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8, 1 % N-Laurylsarkosin, 300 mg/l Proteinase K) versetzt. Nach gründlicher Durchmischung (60 sec auf dem Vortexer) wurde für 10 min bei 4 °C und 5000 upm (Heraeus Minifuge RF) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 µl RNase A Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation für 20 min bei 37 °C wurde je eine Extraktion mit Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) und mit Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) durchgeführt. Durch Zugabe von 1/10 Vol Natriumacetat (3 M) und 2 ½ Vol Ethanol kam es zur Präzipitation, die durch eine Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10.000 upm (Centrikon H-401) pelletiert wurde. Der Niederschlag wurde in 1,6 ml H_2O gelöst und mit 1,1 ml PEG-NaCl-Lösung (20 % PEG 8000, 2,5 M NaCl) durch eine Inkubation für 60 min auf Eis erneut gefällt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 20000 upm. Anschließend wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 500 µl TE gelöst.

2.2.5.5. RNA-Isolierung

2.2.5.5.1. Gesamt RNA

Die RNA Isolierung erfolgte nach der auf Chomczynski und Sacchi (1987) basierenden *single-step*-Guanidinisothiocyanat-Methode mit dem peqGOLD RNAPure™ Kit der Firma peqlab. Das hierfür eingesetzte Gewebe wurde entweder unter flüssigem Stickstoff gemörsert (Weizenähren, Myzel aus Flüssigkultur) oder mit Glasperlen im RNAPure™ Puffer gevortext (Myzel von Festmedien oder aus Flüssigkultur).

2.2.5.5.2. mRNA

Für die Durchführung einer auf cDNA basierenden Methode zur Genexpressionsanalyse, der sogenannten „Massively Parallel Signature Sequencing“ (MPSS™, Brenner et al., 2000), wurde mRNA aus der Gesamt RNA verschiedener Fusarium-Infektionsstadien auf Weizenähren erstellt. Dies erfolgte mit Hilfe des Dynabeads® mRNA Purification Kits (DYNAL) aus Gesamt RNA nach Angaben des Herstellers.

2.2.5.6. Qualitätsbestimmung und Quantitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualität und Quantität der isolierten DNA erfolgte im Elektrophoresegel anhand eines Vergleichs mit Längen- und Mengenstandards. Zum Teil wurde auch eine photometrische Messung bei 260 nm durchgeführt.

Auch die Qualität der isolierten Gesamt-RNA wurde, nach einer Hitzedenaturierung, über die elektrophoretische Auftrennung im Gel bestimmt (hierbei war es wichtig, ein TBE-Gel zu verwenden, da die sichtbare ribosomale RNA in einem TAE Gel nicht sauber aufgetrennt wird, sondern stark schmiert). Die Mengenbestimmung der RNA erfolgte stets über die photometrische Messung bei 260 nm.

2.2.5.7. cDNA Synthese

Die cDNA Synthese erfolgte mit dem Enzym SuperScript™ II RNase H^- Reverse Transcriptase (Invitrogen) angelehnt an die Angaben des Hersteller nach folgendem Protokoll. Zunächst erfolgte ein DNase-Verdau, um Reste der genomischen DNA zu eliminieren. Je Ansatz wurden 5 µg Gesamt RNA mit RNase-freiem H_2O auf ein Volumen von 7 µl gebracht. Nach Zugabe von 1 µl Reaktionspuffer (10 x), 1 µl RNase Out (Invitrogen) und 1 µl DNase Grade I (Invitrogen) wurde der Ansatz 1 ½ h bei RT inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) abgestoppt. Anschließend wurden durch eine Inkubation für 10 min bei 70 °C gleichzeitig die DNase inaktiviert und Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst. Der Ansatz wurde dann direkt auf Eis gestellt. Nach dem DNase-Verdau erfolgte die cDNA Erststrangsynthese. Hierfür wurden zum DNase-Verdau-Ansatz (11 µl) 4 µl Reaktionspuffer (5 x), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix (je dNTP 10 mM) und 1 µl Oligo$(dT)_{12\text{-}18}$ (0,5 µg/µl) gegeben und der Ansatz bei 42 °C inkubiert. Nach 2 min wurde 1 µl SuperScript™ hinzugegeben und die Inkubation bei 42 °C für eine Stunde fortgesetzt. Abschließend wurde die Transkriptase durch eine Inku-

bation für 15 min bei 70 °C hitzeinaktiviert. Die cDNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

2.2.5.8. PCR-Methoden

2.2.5.8.1. Standard PCR (Mullis, 1990)

Die standardmäßige Amplifikation von Fragmenten der Größe bis zu 5 kb erfolgte mit der *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen oder Eppendorf) nach den Angaben der Hersteller. Die eingesetzten Primermengen betrugen hierbei 10 bis 20 pmol je 25 µl Ansatz; die Nucleotidmenge, je nach Fragmentlänge, 0,25 bis 0,4 mM (jedes dNTP). Die Annealingtemperatur (Primeranlagerung) für die eingesetzten Primer war abhängig von der jeweiligen Sequenz und wurde aufgrund der einfachen Formel [GC=4°C] + [AT=2°C] berechnet. Für die Zeit der Strangverlängerung wurde je kb zu amplifizierendes Produkt 1 min angenommen. Ein Standard-PCR-Programm für die Amplifizierung eines 1 kb großen Fragments mit der *Taq* Polymerase sah wie folgt aus:

Erstdenaturierung	3 min 95 °C	
Denaturierung	30 sec 95 °C	30 Zyklen
Primeranlagerung	45 sec 55 °C	
Strangverlängerung	1 min 72 °C	
Vollständige Strangverlängerung	10 min 72 °C	

2.2.5.8.2. PCR aus Organismen

2.2.5.8.2.1. Bakterienkolonie PCR

Für die PCR-Analyse rekombinierter Plasmide in transformierten Bakterien wurde die PCR-Reaktion direkt aus den *E. coli*-Kolonien durchgeführt. Statt aufgereinigte DNA als Template einzusetzen, wurde je Ansatz eine Bakterienkolonie mit einer Pipettenspitze aufgenommen und im PCR Reaktionsansatz resuspendiert. Anschließend wurde eine Standard PCR durchgeführt, wobei die Erstdenaturierung auf 6 min verlängert wurde.

2.2.5.8.2.2. Fusarien-Konidien PCR

Ähnlich, wie die Bakterienkolonie-PCR wurde die direkte PCR aus Konidien von *F. graminearum* durchgeführt. Hierfür wurden die Konidien zunächst für mindestens 30 min bei –70 °C eingefroren und anschließend in eine Standard-PCR mit einer auf 10 min verlängerten Erstdenaturierung eingesetzt.

2.2.5.8.3. PCR zur Erstellung einer Digoxigenin markierten Sonde

Zur Erstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten Sonde für die Verwendung in einer nichtradioaktiven Southern-Blot-Analyse wurde eine Standard-PCR durchgeführt, in der das zu hybridisierende DNA-Fragment unter Einsatz von DIG-11-dUTP (Roche) im dNTP-Mix (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,625 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP im Reaktionsansatz) amplifiziert wurde. Als Template diente das aufgereinigte Amplifikationsprodukt aus einer vorangegangenen Standard-PCR des Fragments.

2.2.5.8.4. Inverse PCR zur Konstruktion eines K.O.-Vektors

Durch eine Variante der Inversen PCR wurde die Möglichkeit genutzt, über den Einsatz von entsprechenden Primern eine Restriktionsstelle, zur Linearisierung des K.O.-Vektors, in die Zielsequenz einzufügen. Des weiteren konnten Basen vor und hinter der eingefügten Schnittstelle deletiert werden, was nach der Insertion des Vektors im Zielgen zu einer Verschiebung im Leserahmen führt. Als Template diente zunächst der Klonierungsvektor pGEM®-T (siehe Abb. 5), in den das gewünschte Fragment des Zielgens ligiert war. Dieser Vektor wurde, ausgehend von zwei direkt aneinandergrenzenden Primern, die aus dem Insert herausliefen, unter Einsatz der Deep $Vent_R$® DNA Polymerase (New England Biolabs) nach Herstellerangaben ohne Zugabe von zusätzlichem $MgSO_4$ vollständig amplifiziert. Diese DNA Polymerase besitzt eine 3‘ → 5‘ „proofreading“ Aktivität, die zu einer nahezu fehlerfreien Sequenz führt, und ist für die Amplifikation von Fragmenten bis zu 14 kb geeignet. Nach der Amplifikation wurde in einem 25 µl Ansatz mit der T4 DNA Ligase von MBI Fermentas eine Selbstligation des Vektors durchgeführt. Der zirkuläre Vektor konnte dann in *E. coli* transformiert und amplifiziert werden. Abschließend wurde das mit der Restriktionsstelle versehene Zielgenfragment aus dem Vektor pGEM®-T herausgeschnitten und in den K.O.-Vektor pAN7-1 einligiert. Dieser Vektor konnte nun für die Transformation von *F. graminearum* eingesetzt werden.

Im folgenden ist das PCR Programm für die Inverse PCR aufgeführt.

Erstdenaturierung	6 min 94 °C	
Denaturierung	30 sec 94 °C	5 Zyklen
Primeranlagerung	45 sec 53 °C	
Strangverlängerung	3 ½ min 75 °C	
Denaturierung	30 sec 94 °C	25 Zyklen
Primeranlagerung	45 sec 68 °C	
Strangverlängerung	3 ½ min 75 °C	
Vollständige Strangverlängerung	20 min 75 °C	

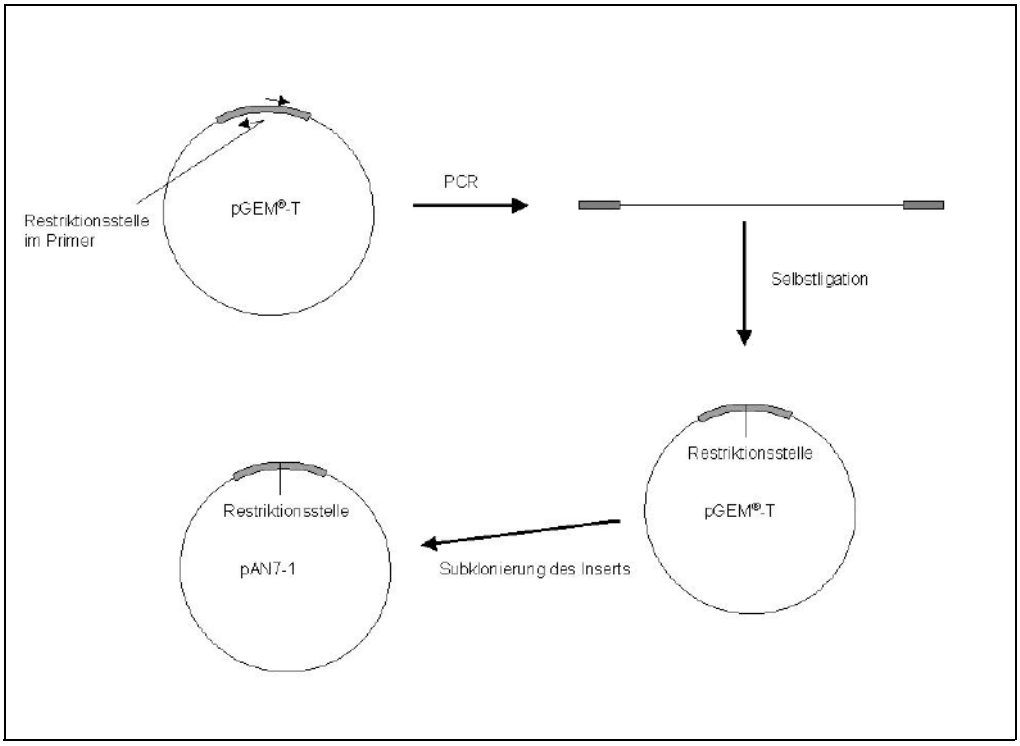


Abb. 5: Schematische Darstellung zur Erstellung eines K.O.-Vektors mittels Inverser PCR. Ausgehend vom Vektor pGEM®-T wurde eine PCR über das gesamte Plasmid durchgeführt. Einer der beiden Primer enthielt die Sequenz für eine neue Restriktionsschnittstelle. Beide Primer waren in ihrer Sequenz gegenüber der des Templates derart modifiziert, dass es zur Deletion einzelner Basen kam. Nach Selbstligation des PCR Produktes entstand wiederum der Vektor pGEM®-T mit der entsprechenden Restriktionsschnittstelle sowie je einer Basendeletion vor und hinter der Schnittstelle (hier nicht gezeigt). Das Insert wurde abschließend über eine Subklonierung in den K.O.-Vektor pAN7-1 ligiert.

2.2.5.8.5. Inverse PCR zur Identifizierung Fragment-flankierender Sequenzen

Die zweite in dieser Arbeit eingesetzte Inverse PCR diente zur Identifizierung der zu einem bekannten Sequenzabschnitt in der genomischen DNA benachbarten Bereiche, wodurch die Informationen über ein Gen vervollständigt werden konnten (siehe Abb. 6). Zunächst wurde eine Southern-Blot-Analyse mit der bekannten Gensequenz als Sonde durchgeführt. Anhand dieser Analyse wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die möglichst hochmolekulare Banden ergaben, also weit außerhalb der bekannten Sequenz schnitten. Mit diesen Enzymen wurden jeweils 3,5 µg genomische DNA von *F. graminearum* in einem 300 µl Reaktionsansatz verdaut. Nachfolgend wurde der vollständige Restriktionsansatz präzipitiert und die geschnittene DNA durch Ligation mit T4 DNA Ligase in einem 300 µl Reaktionsansatz für 48 h ligiert. Hierbei führte intramolekulare Ligation zu zirkulärer DNA. Anschließend folgte, ähnlich wie unter Material und Methoden 2.2.4.7.4. beschrieben, eine PCR-Reaktion mit Primern, die aus dem bekannten Fragment herausliefen. Diese Reaktion wurde mit dem Expand Long Template PCR System (Roche) in einem 50 µl Ansatz mit Puffer 3 und je Reaktion 300 ng DNA nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach dem folgenden Programm in einem *„Gra-*

dientencycler“ (mit der Möglichkeit zum Einstellen verschiedener Primer-anlagerungstemperaturen in einem PCR Durchgang):

Erstdenaturierung	5 min 94 °C	
Denaturierung	1 min 94 °C	30 Zyklen
Primeranlagerung	1 min 55 °C - 60 °C	
Strangverlängerung	8 min 68 °C	
Vollständige Strangverlängerung	20 min 68 °C	

Nach dieser ersten PCR wurde ein Teil des Reaktionsansatzes in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden der erwarteten Größen wurden aus dem Gel eluiert und für eine zweite PCR eingesetzt. In dieser zweiten PCR wurden *„nested“* Primer verwendet, die sich im Vergleich zu den ersten Primern in den amplifizierten Fragmenten weiter innen anlagerten (siehe Abb. 6) und so eine weitere spezifische Amplifikation erlaubten. Die zweite PCR erfolgte nach dem folgenden Programm:

Erstdenaturierung	5 min 94 °C	
Denaturierung	1 min 94 °C	30 Zyklen
Primeranlagerung	1 min 55 °C	
Strangverlängerung	8 min 68 °C	
Vollständige Strangverlängerung	20 min 68 °C	

Die Produkte der zweiten PCR wurden erneut elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Anschließend erfolgte die Ligation in den pCR®-XL-TOPO® Vektor nach Herstellerangaben. Nach der Transformation und der Amplifikation in *E. coli* konnte das Fragment sequenziert werden.

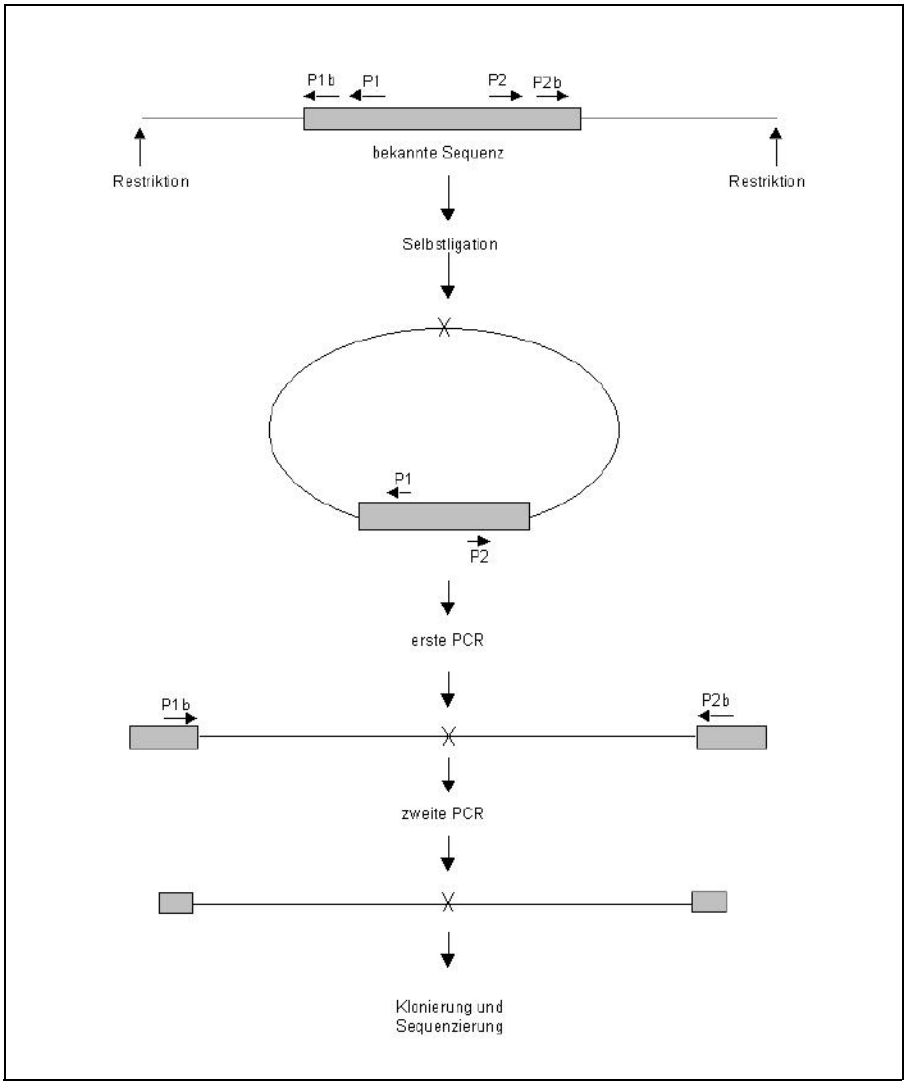


Abb. 6: Schema der Inversen PCR für die Identifizierung der flankierenden Bereiche zu einer bekannten Sequenz. P1 und P2: Primer der ersten PCR. P1b und P2b: „*nested*“ Primer der zweiten PCR.

2.2.5.8.7. Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR)

Ein weiteres Verfahren zur Charakterisierung der flankierenden Sequenzen zu einem bekannten Genabschnitt ist die TAIL-PCR (Liu und Whittier, 1995). Für diese Methode wurden drei aufeinanderfolgende PCRs mit der *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen oder Eppendorf) durchlaufen. Hierbei wurde jeweils einer von acht Zufallsprimern (AD1 bis AD9, vgl. Material und Methoden 2.1.4.) mit einem spezifischen Primer aus der bekannten Gensequenz kombiniert. In jeder PCR lagen die spezifischen Primer etwa 50 bp weiter innerhalb des amplifizierten Produktes als in der vorangegangen PCR („*nested*“ Primer, vgl. Abb. 7). Die primäre und die sekundäre PCR beinhalteten Zyklen niedrigstringenter Bedingungen (niedrige Primeranlagerungstemperatur), unter denen bevorzugt die AD-Primer bindeten. Diese Zyklen wechselten sich ab mit solchen unter hochstringenten Bedingungen (hohe Primeranlagerungstemperaturen), bei denen bevorzugt die spezifi-

schen Primer bindeten. Auf diese Weise wurden bevorzugt die gewünschten Fragmente gebildet. Der tertiäre Lauf diente schließlich der Anreicherung der spezifischen Fragmente. Durch die Staffelung der spezifischen Primer kam es zu einer Generierung flankierender Sequenzen, die in jeder Runde kleiner wurden, was ermöglichte, sie im Agarosegel zu identifizieren. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der zweiten und der dritten PCR konnten distinkte Banden detektiert werden, die sich um den Abstand der beiden „*nested*" Primer in ihrer Größe unterschieden. Die spezifischen Fragmente der dritten Runde wurden schließlich in den pGEM®-T Vektor ligiert und sequenziert. Der Ablauf der TAIL-PCR ist in Abb. 7 schematisch dargestellt. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze ist im folgenden aufgelistet.

	primäre PCR	**sekundäre PCR**	**tertiäre PCR**
PCR-Puffer	1x	1x	1x
$MgCl_2$	1,5 mM	1,5 mM	1,5 mM
dNTP Mix	0,2 mM pro dNTP	0,2 mM pro dNTP	0,2 mM pro dNTP
spez. Primer	10 pmol	10 pmol	40 pmol
AD Primer	100 pmol	70 pmol	280 pmol
Taq DNA Polymerase	1 U	1 U	4 U
Template	20 ng genomische DNA	1 µl einer 1:50 Verdünnung aus primärer PCR	1 µl einer 1:50 Verdünnung aus sekundärer PCR
H_2O	ad 50 µl	ad 50µl	ad 100µl

Die Temperaturbedingungen der TAIL-PCR Reaktionen sind im folgenden dargestellt:

1. PCR

Zyklen	Temperaturbedingungen
1	95°C, 2'
5	94°C, 60''; 62°C, 60''; 72°C, 2,5'
1	94°C, 60''; 25°C, 3';
	auf 72°C über 3'; 72°C 2,5'
15	94°C, 30''; 68°C, 60''; 72°C, 2,5'
	94°C, 30''; 68°C, 60''; 72°C, 2,5'
	94°C, 30''; 44°C, 60''; 72°C, 2,5'
1	72°C, 5'

2. PCR

Zyklen	Temperaturbedingungen
1	94°C, 2'
15	94°C, 30''; 64°C, 60''; 72°C, 2,5'
	94°C, 30''; 64°C, 60''; 72°C, 2,5'
	94°C, 30''; 44°C, 60''; 72°C, 2,5'
1	72°C, 5'

3. PCR

Zyklen	Temperaturbedingungen
1	94°C, 2'
30	94°C, 60''; 44°C, 60''; 72°C, 2,5'
1	72°C, 5'

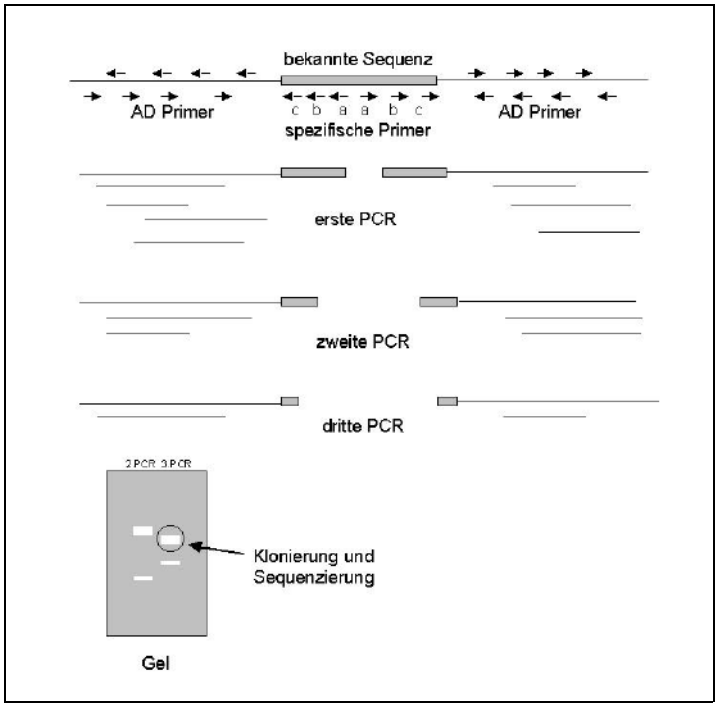


Abb. 7: Schematische Abbildung der TAIL-PCR. In einer ersten PCR werden die spezifischen Primer a mit jeweils einem AD Primer eingesetzt. In der folgenden PCR kommt es zum Einsatz der spezifischen Primer b mit den jeweiligen AD Primern (Template: PCR-Produkt der ersten PCR). In der dritten PCR erfolgt die Amplifikation des PCR-Produktes der zweiten PCR mit den spezifischen c Primern und den entsprechenden AD Primern. Die Produkte der zweiten und der dritten PCR werden im Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das angereicherte Produkt der dritten PCR wird kloniert und sequenziert.

2.2.5.8.8. PCR zur Identifizierung von K.O.-Mutanten

Neben der unter Material und Methoden 2.2.5.10. beschriebenen Southern-Blot-Analyse diente eine PCR-gestützte Analyse der Identifizierung von K.O.-Mutanten. Die Abb. 8 verdeutlicht das Prinzip dieses Screening-Verfahrens.

Pro Transformanden-DNA-Probe erfolgten drei PCR Reaktionen. Zunächst wurden die Primer EF und ER eingesetzt, die außerhalb des für die Transformation eingesetzten Fragments im Zielgen lagen. Mit diesen Primern wurde eine Standard-PCR durchgeführt. Im Falle einer nicht erfolgten Integration konnte ein für den Wildtyp charakteristisches Fragment amplifiziert werden. War die Integration des Vektors erfolgt, so musste ein Fragment der „Wildtyp-Größe“ zuzüglich der Länge des gesamten K.O.-Vektors amplifiziert werden. Durch die gewählten Bedingungen der PCR wurde ein Fragment dieser Länge jedoch nicht generiert. Die Amplifikation des kürzeren „Wildtyp-Fragments“ (im Falle einer nicht erfolgten Integration im Zielgen) konnte jedoch erfolgen. Für diesen Abschnitt der Analyse war es wichtig, dass die Primer nicht im Zielgenfragment des Vektors lagen, da es durch die Integration des Vektors zur Regenerierung des Zielgenfragments in zweifacher Kopie kam (vgl. Abb. 8). Primer, die im Zielgenfragment lägen, würden somit

sowohl im Wildtypzustand als auch im Zustand der Disruption zur Amplifikation eines „Wildtypfragmentes“ führen.

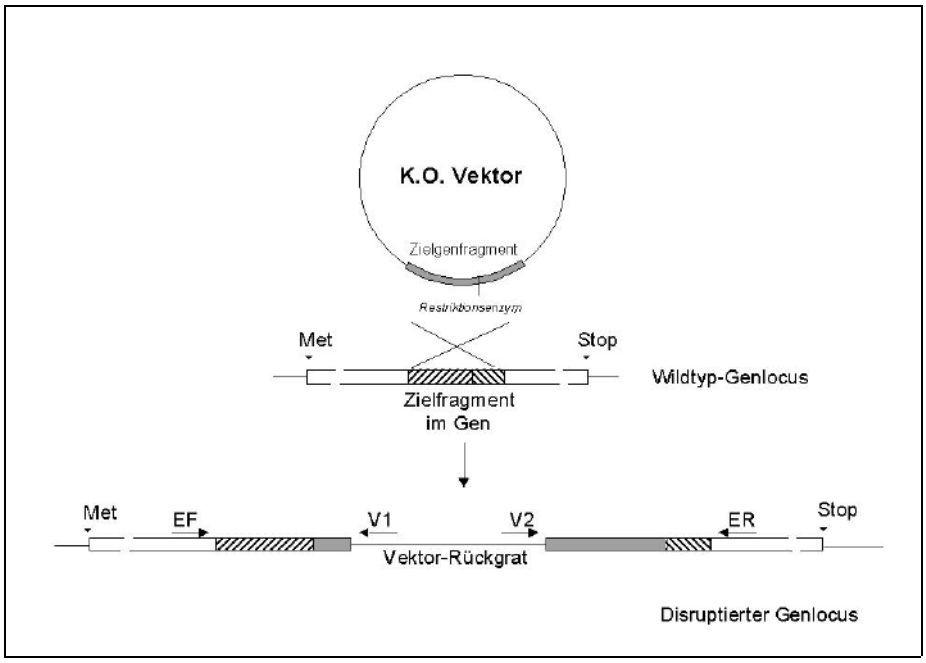


Abb. 8: Schema der homologen Rekombination mit anschließender Integration des K.O.-Vektors im Zielgen. Des weiteren sind die für ein PCR-Screening eingesetzten Primer dargestellt. EF: genspezifischer Vorwärts („forward“) Primer (im Gen außerhalb des Zielfragments); ER: genspezifischer Rückwärts („revers“) Primer (im Gen außerhalb des Zielfragments); V1 und V2: Vektorspezifische Primer; Met: Methionin des Translationsstartes des Gens; STOP: Stop-Codon der Translation.

Bei dem bisher beschriebenen Abschnitt des PCR-Screenings wurde die Integration durch ein negatives Ergebnis, also das nicht Vorhandensein eines Fragments, getestet. In einer zweiten und dritten PCR sollte dieses Ergebnis durch eine positive PCR bestätigt werden. Hierfür wurden die in der Abb. 8 dargestellten Primer V1 und V2 jeweils in Kombination mit einem der externen Primer für eine PCR eingesetzt. Mit diesen Primern konnte es nur dann zu einem Amplifikationsprodukt kommen, wenn die Integration am Zielort erfolgt war. War die Integration hingegen ektopisch oder gar nicht erfolgt, so kam es nicht zur Generierung eines Produktes.

2.2.5.8.9. RT-PCR

Die RT-PCR diente in der vorliegenden Arbeit zum einen der Expressionsanalyse verschiedener Gene während der Pflanzeninfektion. Zum anderen diente sie, in Verbindung mit der Subklonierung in *E. coli* und der anschließenden Sequenzierung, der Charakterisierung der hier untersuchten Gene auf cDNA Ebene. Die RT-PCR erfolgte unter den Standard-PCR-Bedingungen (Material und Methoden 2.2.5.7.1.) mit dem Unterschied, dass hier einzelsträngige cDNA als Template eingesetzt wurde (siehe Material und Methoden 2.2.5.6.). Um ausschließen zu können, dass entstehende PCR-Produkte ihren Ursprung in genomischer DNA (als Restkontamination im Ansatz) haben könnten, wurden

Kontroll-PCR-Reaktionen mit Primern durchgeführt, die einen Genabschnitt amplifizierten, der ein Intron enthält. Hierdurch war eine eindeutige Unterscheidung zwischen Produkten möglich, die der cDNA entstammten (ohne Intron, kleiner), und denen, die genomische DNA zum Ursprung hatten (mit Intron, größer). Als Standardkontrolle wurden Primer des β-Tubulingens von *F. graminearum* verwendet (FgBetaTubF und FgBetaTubR, freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch N. Jenczmionka). Durch die Verwendung dieser Primer konnte aus *F. graminearum* ein etwa 900 bp (cDNA) bzw. 950 bp (genomische DNA) großes Fragment amplifiziert werden. Ein weiterer Aspekt für die Auswahl dieses Gens war, dass es sich hierbei um ein Haushaltsgen handelt, welches konstitutiv exprimiert wird. Es war somit möglich, anhand dieser Kontroll PCR eine Aussage über die Quantität der eingesetzten cDNA zu treffen.

2.2.5.8.9. PCR zum Nachweis von *Fusarium graminearum*

Da sich die Fusarium Arten *F. graminearum* und *F. culmorum* morphologisch sehr ähnlich sind, sollte der in dieser Arbeit verwendete Stamm *Fg* 8/1 zur Sicherheit per PCR als *F. graminearum* bestätigt werden. Für diese Identifizierung wurden die Primerpaare Fg16F/Fg16R und Fc01F/Fc01R eingesetzt (Punkt 2.1.4.), die von Nicholson et al. (1998) für die Detektion von *F. graminearum* bzw. *F. culmorum* in Getreiden beschrieben wurden. Die PCR-Reaktionen erfolgten mit *Taq* Polymerase nach Herstellerangaben in Volumina von 50 µl nach folgendem Temperaturprofil. Als Template wurden 4 ng genomische DNA je Reaktion eingesetzt. Zu erwarten waren Fragmente von 0,4 kb Länge mit den Fg-Primern und keine Fragmente mit den Fc-Primern.

Erstdenaturierung	3 min 95 °C	
Denaturierung	30 sec 95 °C	5 Zyklen
Primeranlagerung	45 sec 65 °C	
Strangverlängerung	1 min 72 °C	
Denaturierung	30 sec 95 °C	5 Zyklen
Primeranlagerung	45 sec 64 °C	
Strangverlängerung	1 min 72 °C	
Denaturierung	30 sec 95 °C	15 Zyklen
Primeranlagerung	45 sec 62 °C	
Strangverlängerung	1 min 72 °C	
Vollständige Strangverlängerung	10 min 72 °C	

2.2.5.9. Sequenzierung

Für die Sequenzierung diente Plasmid-DNA als Template, die, wie unter Material und Methoden 2.2.5.4.1. beschrieben (NucleoSpin Plasmid Kit), isoliert wurde. Die Sequenzierung wurde von verschiedenen Servicelaboren durchgeführt.

2.2.5.10. Southern-Blot-Analysen

2.2.5.10.1. Transfer der DNA auf eine Nylonmembran

Für die Southern-Blot-Analyse (Southern, 1975) wurde genomische DNA von *F. graminearum* nach der Restriktion elektrophoretisch im Gel aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA, durch Inkubation des Gels für 2 x 5 min in 0,25 M HCl, depuriniert. Es folgte die Denaturierung durch 20 min Inkubation in Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und abschließend die Neutralisierung durch eine Inkubation für 2 x 15 min in Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl bei pH 7,5, 1 mM EDTA). Durch einen Kapillarblot wurde die DNA ÜN aus dem Gel auf eine geladene Nylonmembran (Hybond NX™, Amersham) transferiert.

Am nächsten Tag wurde die DNA mittels UV-Bestrahlung (1200 mJ x cm^{-1} im Stratalinker von Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

2.2.5.10.2. Hybridisierung und Detektion

Es wurde das Digoxigenin-(DIG)-System (Roche) verwendet und in Anlehnung an die Angaben des Herstellers verfahren. Die Membranen wurden zunächst bei 56 °C (niedrigstringent) bzw. bei 68 °C (hochstringent) für 4 h in der Prähybridisierungslösung (5 x SSC, 0,1 % Natriumlaurylsarcosin, 0,02 % SDS, 2 % Blockingreagenz) vorhybridisiert. Nach Zugabe der Sonde wurde über Nacht bei 56 °C bzw. 68 °C hybridisiert.

Die Membranen wurden nach der Hybridisierung zunächst bei RT zweimal für je 5 min in Waschlösung 1 (2 x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen. Dann erfolgte ein zweimaliges Waschen bei der Hybridisierungstemperatur für jeweils 20 min in Waschlösung 2 (auf Hybridisierungstemperatur vorgewärmt; 0,3 x SSC, 0,1 % SDS). Anschließend wurde für 5 min in Waschlösung 3 (0,1 M Maleinsäure, pH 7,5, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 0,3% Tween®20) gewaschen. Hierauf erfolgte eine 30 minütige Blockierung in Puffer 1 (0,1 M Maleinsäure, pH 7,5, 0,15 M NaCl, pH 7,5, 2 % Blockingreagenz). Dem Puffer 1 wurde anschließend der DIG-Antikörper („anti-digoxigenin Fab fragments“, 1:1000 verdünnt) zugesetzt, und es folgte eine 30 minütige Inkubation. Hiernach wurden die Membranen 2 mal 15 min in Waschlösung 3 gewaschen. Durch eine 5 minütige Inkubation in Puffer 2 (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl) wurde das alkalische Milieu für die alkalische Phosphatase am DIG-Antikörper hergestellt. Die Filter wurden dann mit dem Substrat CSPD® (1:100 in Puffer 2 verdünnt) für 10 min inkubiert und anschließend in Folienschläuche eingeschweißt. In einer Filmkassette wurden die Filter dann gegen Hyperfilm ECL (Amersham) für mindestens 20 min bei 37 °C exponiert. Nach dieser oder einer längeren Expositionszeit wurde der Film entwickelt.

2.2.5.10.3. Bakterienkolonie Hybridisierung

Eine weitere in dieser Arbeit eingesetzte Variante der Southern-Blot-Analyse war die Koloniehybridisierung, welche die parallele Untersuchung vieler Bakterientransformanden ermöglichte. Hierbei erfolgte der Transfer von zu untersuchender Plasmid-DNA - nach

Angaben von Amersham - direkt aus den transformierten Bakterien auf eine Nylonmembran (Hybond N™). Nach der Hybridisierung mit einer DIG-markierten Sonde und der anschließenden Detektion konnten die Kolonien identifiziert werden, welche Plasmid-DNA mit dem gesuchten Sequenzabschnitt beinhalteten.

2.2.5.11. Bearbeitung und Analyse von DNA- und Proteinsequenzen in silico

- Literaturrecherche (Pub Med): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
- Homologievergleich: Datenbank der BASF AG
- Alignments von DNA und Proteinsequenzen: „ClustalX“ (Thompson et al., 1997)
- Sequenzbearbeitung (Editierung, Translation, Restriktionsanalyse u.ä.): „Prophet“ (National Computing Resource for Life Science Research) sowie das Word Add-In „Molecular BioComputing Suite“ (MBCS, Muller, 2001)
- Strukturanalyse von Proteinsequenzen: „ANTHEPROT 2000 V 5.2.“ (Deleage, 1995 – 2002, Institut de Biologie et Chimie de Protéins, Lyon, France; verfügbar: http://antheprot-pbil.ibcp.fr)
- Plasmidkarten: „Clone Manager“ (Scientific & Educational Software)

2.2.6. Verfahren zur Analyse und Charakterisierung von *Fusarium graminearum* Transformanden

2.2.6.1. Infektion der Weizenähre mit Fusarium graminearum

Die für die Pflanzeninfektion verwendeten Weizensorten wurden bis zur Blüte kultiviert. Zum Zeitpunkt der Anthesis erfolgte die Inokulation mit *F. graminearum*. Hierfür wurden jeweils 10 µl einer Konidiensuspension (10^5 Konidien/ml) oder 10 µl H_2O (Kontrolle) zwischen das Palea und das Lemma einer Blüte eines Ährchens gesetzt (s. Abb. 9). Je Ähre wurden zwei gegenüberliegende Ährchen in der Ährenmitte inokuliert (modifiziert nach Pritsch et al., 2001). Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden und eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit für die Primärinfektion zu gewährleisten, wurden kleine Plastiktüten über die inokulierten Ähren gesteckt. Diese Tüten wurden 3 Tage über den Ähren belassen. Die Pflanzen wurden, mit dem Unterschied einer höheren relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90 %, unter den gleichen Bedingungen gehalten, wie bis zur Blüte. Die Auswertung des Versuchs erfolgte nach 3 bis 4 Wochen.

Abb. 9: Weizenährchen mit geöffneter Blüte. Der Zeigestock zeigt auf die inneren Blütenorgane die vom Lemma (links mit Grane) und dem Palea (rechts) eingeschlossen werden. (Quelle: „Wheat Field Hompage" der Universität von Kansas, USA)

2.2.6.2. Infektion von Weizen durch Fusarium graminearum am Blatt

Zusätzlich zu der im vorherigen Punkt beschriebenen Infektion der Ähre, sollte die Möglichkeit der Infektion auf dem Weizenblatt, als möglicher „Vortest", untersucht werden. In einen Rundfilter (∅ 90 mm, Schleicher & Schüll) wurden im Abstand von ca. 6 cm zwei parallele Schlitze geschnitten. Blattabschnitte von etwa 7 cm Länge wurden so im Filterpapier fixiert, dass die Blattoberseite nach oben zeigte. Das Filterpapier mit den Blattsegmenten wurde in eine mit 10 ml Leitungswasser gefüllte Petrischale gelegt. Anschließend wurde jeder Blattabschnitt mit 20 µl einer eingestellten Konidiensuspension (250 Konidien in Leitungswasser mit 0,01 % Tween®20) tropfenartig inokuliert. Die Schalen wurden 9 Tage in einer Phytokammer, unter den gleichen Bedingungen wie die Gesamtpflanzen, kultiviert.

2.2.6.3. Wachstumstest

2.2.6.3.1. Test von K.O.-Mutanten auf UV-Sensitivität

Um zu untersuchen, ob die Deletion bestimmter Gene einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Strahlung hatte, wurden K.O.-Mutanten in ihrem Wachstum unter UV Bestrahlung mit dem Wildtyp von *F. graminearum* verglichen.

- **Konidien**

Jeweils 50 bzw. 100 Konidien der Transformanden und des Wildtyps von *F. graminearum* wurden auf CM-Festplatten (Ø 60 mm) ausplattiert und mit UV Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt. Je Versuch erfolgte die Bestrahlung in Dosen von 0 bis 500.000 µJ/cm^2 (im Stratalinker von Stratagene, Heidelberg). Die Platten wurden ÜN bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde die Auskeimrate der Konidien bestimmt.

- **Myzel**

Des weiteren wurde die Sensitivität von Myzel gegenüber der UV Strahlung untersucht. CM-Festmedium Platten (Ø 90 mm) wurden mit Myzel-Agar-Blöckchen (Ø 6 mm) der Transformanden sowie des Wildtyps inokuliert und drei Tage bei 28°C inkubiert. An-

schließend erfolgte eine Bestrahlung von 0 bis 999900 µJ/cm^2 (254 nm), wobei ein Teil der Platten nur einmal bestrahlt wurde, der andere täglich.

2.2.6.3.2. Test von K.O.-Mutanten auf Temperatur-Sensitivität

Parallel zur UV-Sensitivität sollte das Wachstumsverhalten einiger K.O.-Transformanden bei verschiedenen Temperaturen mit dem des Wildtyps verglichen werden.

CM-Festmedium Platten (Ø 60 mm) wurden mit Myzel-Agar-Blöckchen (Ø 6 mm) der Transformanden sowie des Wildtyps inokuliert. Die Platten wurden bei 12 °C, 18 °C, 28 °C, 30 °C, 37 °C und 42 °C inkubiert und das Wachstum bestimmt.

2.2.6.3.3. Wachstum von K.O.-Mutanten auf verschiedenen Medien

In diesen Versuchen sollte das Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf CM-Medium, Czapek-Mangelmedium, Corn Meal Agar, Stärke-Agar und LB-Medium untersucht werden. Die Medium Platten (Ø 60 oder 90 mm) wurden mit Myzel-Agar-Blöckchen (Ø 6 mm) der Transformanden sowie des Wildtyps inokuliert. Die Platten wurden bei 28 °C inkubiert und das Wachstum bestimmt.

2.2.6.3.4. Wachstum von K.O.-Mutanten unter osmotischem Stress

In mehreren Versuchsreihen wurde der Wildtyp sowie Transformanden auf YPG-Fest-Medium mit verschiedenen Molaritäten an Sorbitol (0 bis 2 M) kultiviert. Hierdurch sollte das Verhalten der Mutanten in Hinsicht auf osmotischen Stress untersucht werden. Die Platten wurden mit Myzel-Agar-Blöckchen (Ø 6 mm) inokuliert und bei 28 °C inkubiert.

2.2.6.3.5. Wachstum von K.O.-Mutanten mit Glycerol als einzige C-Quelle

In diesem Versuch sollte getestet werden, ob *F. graminearum* nach der Disruption bestimmter Gene die Fähigkeit behalten hat, Glycerol als Kohlenstoffquelle zu nutzen. Das Medium Nitrogen Base (Difco), welches frei von Kohlenstoffquellen ist, wurde mit 2 % und 4 % Glycerol bzw. 2 % Glucose (Kontrolle) versehen. In 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 50 ml des Mediums mit 10^5 Konidien des Wildtyps sowie der Mutanten inokuliert. Die Kulturen wurden unter Schütteln (150 upm) bei 28 °C inkubiert und das Wachstum beobachtet.

2.2.6.3.6. Bestimmung der Konidienbildung von *Fusarium graminearum*

In drei parallelen Versuchen wurde die Konidienbildung des Wildtyps sowie verschiedener K.O.-Mutanten, wie beschrieben (Material und Methoden 2.2.2.1.1.), auf SNA Platten (Ø 60 mm) induziert. Nach 10 Tagen wurden die Konidien jeweils mit 2 ml H_2O von den Platten abgeschwemmt und ausgezählt. Die Werte wurden miteinander verglichen.

2.2.6.4. Untersuchung eines roten Pigments aus Fusarium graminearum

Der Wildtyp von *F. graminearum* bildet nach etwa 7 bis 10 Tagen auf CM Medium einen dunkelroten Farbstoff aus. Dieser Farbstoff sollte näher untersucht werden.

2.2.6.4.1. Extraktion eines roten Farbstoffs aus *Fusarium graminearum*

Fusarium graminearum wurde 10 bis 14 Tage auf CM Medium kultiviert. Nach vollständigem Bewuchs der Kulturplatte wurde das Myzel mit einem Objektträger von der Agaroberfläche abgekratzt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Gefäß wurde bis zur 0,5 ml Marke befüllt (ca. 400 mg Myzel, Frischgewicht). Anschließend wurden 650 µl Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) bzw. Chloroform (pH 6 bzw. pH 2) zugegeben. Nach der Zugabe von drei Spatelspitzen säuregewaschenen Glasperlen (Roth, Ø 100 bis 200 µm) wurde der Ansatz 5 min gevortext. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Als Vergleichsfarbstoff wurde ein Extrakt aus Rotkohl (*Brassica oeleracea var. capitata*) erstellt. Für diesen Extrakt wurde kleingeschnittenes Rotkohlblatt der gleichen Behandlung unterzogen wie das *Fusarium* Myzel.

2.2.6.4.2. Photometrische Charakterisierung des Farbstoffes aus *Fusarium graminearum*

Der gewonnene Farbstoff wurde photometrisch über ein Absorptionsspektrum von 190 bis 1000 nm charakterisiert. Absorptionsmaxima wurden bestimmt und verglichen.

2.2.6.4.3. Wirksamkeit des roten Farbstoffes aus *Fusarium graminearum* gegenüber anderen Organismen

Nach der Bestimmung der optischen Dichte bei 220 nm wurden die Extrakte des Wildtyps von *F. graminearum* sowie verschiedener K.O.-Mutanten mit Kaliumphosphatpuffer bzw. Chloroform auf dieselbe Konzentration photometrisch wirksamer Bestandteile eingestellt. Die Konzentrate der Extrakte wurden so gewählt, dass eine OD_{220} von 1/µl vorlag.

- **Hemmhoftests**

Die Hemmhoftests erfolgten gegen *B. subtilis*, *E. coli*, *M. luteus* und *C. albicans*. In einem Reagenzglas wurden 4 ml LB (Bakterien) bzw. YPG (*C. albicans*) mit 2 µl aus Glycerol-Dauerkulturen inokuliert und bei 37 °C (*C. albicans*, *E. coli* , *B. subtilis*) bzw. 28 °C (*M. luteus*) unter Schütteln ÜN inkubiert. Einhundert µl der ÜN Kulturen wurden zu je 3,5 ml flüssigen Agar (46 °C) gegeben. Nach gutem Durchmischen wurden LB bzw. YPG Platten mit diese Bakterien- bzw. Hefe-Suspensionen überschichtet. Nach Verfestigung des Agars erfolgte eine Testung der *Fusarium* Extrakte, die durch 3 µl/100 µl Chloroform (Kaliumphosphatpuffer-Extrakte) sterilisiert wurden, auf zwei Wegen:

1. Filterpapiertest: Runde Filterpapierblättchen (Ø 5 mm, Dicke etwa 1 mm) wurden mit 100 µl *Fusarium* Extrakt getränkt und getrocknet (Abdampfen des Lösungsmittels). Die Filterblättchen wurden anschließend auf die Kulturplatten aufgelegt. Nach einer ÜN Inkubation erfolgte die Bestimmung möglicher Hemmhöfe.
2. Lochtest: In die Kulturplatten wurden mit einem sterilen Korkbohrer Löcher von 6 mm Durchmesser gebohrt. Der Boden der Löcher wurde mit 50 µl flüssigem Agar abgedichtet. Die Löcher wurden anschließend mit 80 µl *Fusarium* Extrakt (nur Kaliumphosphatpuffer Extrakte) befüllt. Die Platten wurden dann bei 37 °C bzw. 28 °C ÜN inkubiert. Am folgenden Tag wurden mögliche Hemmhöfe in den Bakterien- bzw. Heferasen bestimmt.

Tab. 1: Für die Wachstumshemmversuche in Flüssig-Medium eingesetzte Organismen und deren Wachstumsbedingungen im Test. Temp.: Inkubationstemperatur; Inokulation aus: Angabe zum Inokulum der getesteten Kultur.

Organismus	Medium	Temp.	Inokulation aus
Escherichia coli	LB	37°C	ÜN Vorkultur
Bacillus subtilis	LB	37°C	ÜN Vorkultur
Micrococcus luteus	LB	28°C	ÜN Vorkultur
Pseudomonas aeroginosa	LB	28°C	ÜN Vorkultur
Candida albicans	YPG	37°C	ÜN Vorkultur
Candida parapsilosis	YPG	28°C	ÜN Vorkultur
Pichia pastoris	YPG	28°C	ÜN Vorkultur
Saccharomyces cerevisiae	YPG	28°C	ÜN Vorkultur
Geotrichum candidum	YPG	28°C	ÜN Vorkultur
Fusarium graminearum	CM	28°C	Myzel Vorkultur
Fusarium graminearum	CM	28°C	10^4 Konidien
Nectria haematococca	CM	28°C	10^4 Konidien
Pyrenophora teres	CM	28°C	Myzel Dauerkultur

- **Hemmwirkung in Flüssigkultur**

Neben den beschriebenen Hemmhoftests wurden Versuche in Flüssigkulturen durchgeführt. Für diese Versuche wurden die Bakterien *E. coli, M. luteus, B. subtilis* und *P. aeroginosa* und die hefeartigen Pilze *C. albicans, C. parapsilosis, P. pastoris, S. cerevisiae* und *G. candidum* sowie die filamentösen Pilze *F. graminearum*, *N. haematococca* und *P. teres* eingesetzt. Die Inokulation der 4 ml Testkulturen erfolgte mit 15 µl einer ÜN Kultur (OD_{595} ca. 3, Bakterien und Hefen) sowie mit 10^4 Konidien bzw.

100 µl einer Myzel Vorkultur (filamentöse Pilze). Zur Übersicht sind die Kulturbedingungen in Tab. 1 aufgeführt.

Der *Fusarium* Extrakt wurde durch Erhitzen für 10 min bei 99 °C und die Zugabe von 3 µl/100 µl Chloroform sterilisiert. Für die Hemmversuche wurden die zu testenden Kulturen mit jeweils 200 µl *Fusarium* Extrakt (in Kaliumphosphatpuffer) bzw. Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle) versetzt und ÜN (Bakterien und Hefen) bzw. für 2 Tage (filamentöse Pilze) unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Wachstum der Kulturen bestimmt. Hierfür wurde die OD_{595} (Bakterien und Hefen), bzw. das Trockengewicht (nach sieben Tagen Gefriertrocknung, filamentöse Pilze) bestimmt.

2.2.6.5. Untersuchung der Alkoholoxidase aus Fusarium graminearum

Nach der Disruption des Alkoholoxidase Gens (AOX) sollte die Aktivität des Enzyms untersucht werden.

2.2.6.5.1. Induktion der Alkoholoxidase in *Fusarium graminearum*

Zunächst wurden 50 ml Nitrogen Base (Difco) mit 2 % Methanol bzw. 2 % Glucose als einzige Kohlenstoffquelle versetzt und mit 10^5 Konidien des Wildtyps von *F. graminearum* und einer AOX-K.O.-Mutante inokuliert. Zur Kontrolle sollte das Wachstum in Nitrogenbase ohne Kohlenstoffquelle beobachtet werden.

Des weiteren wurde *F. graminearum* (WT und AOX-K.O.) parallel in zwei verschiedenen Medienzusammenstellungen kultiviert:

1. Nitrogen Base wurde mit 0,05 % Hefeextrakt und 1% Methanol bzw. Glucose versetzt. Je 50 ml wurden mit 10^5 Konidien inokuliert. Es folgte eine Inkubation für zwei Tage unter Schütteln bei 28 °C.
2. Nitrogen Base wurde mit 1 % Glucose versetzt. Nach Inokulation mit *F. graminearum* erfolgte die Kultur für zwei Tage bei 28 °C unter Schütteln. Das entstandene Myzel wurde filtriert und zweimal mit sterilem H_2O gewaschen. Anschließend wurde das Myzel in 50 ml Nitrogen Base mit 0,05 % Hefeextrakt und 1 % Methanol aufgenommen und die Inkubation für 8 bzw. 20 h fortgesetzt.

Das Myzel wurde über einen Büchnertrichter geerntet und in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren. Der Wildtyp und mehrere AOX-K.O.-Mutanten sowie einige ektopische Transformanden wurden durch RT-PCR und den nachfolgend beschriebenen AOX-Enzymassay getestet.

2.2.6.5.2. Erstellung eines Rohproteinextraktes aus *Fusarium graminearum*

Das Myzel wurde wie beschrieben geerntet. Im Anschluss wurden etwa 400 mg (Frischgewicht) des Myzels in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff konnten die Proben bei –70 °C gelagert oder sofort weiter bearbeitet werden. Das Myzel wurde mit 650 µl Kaliumphosphatpuffer (4°C, 50 mM, pH 7,4 mit 500 µM Phenylmethylsulphonyl Fluorid [PMSF]) versetzt und nach Zugabe von drei bis

vier Spatelspitzen Glasperlen (Roth Ø 100 bis 200 µm) bei 4 °C für 5 min gevortext. Nach Aufschluss des Myzels wurde der Ansatz für 10 min bei 4 °C und 14000 x g zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Der Proteinrohextrakt konnte für wenige Tage bei 4 °C oder für einige Wochen bei -20 °C gelagert werden. Im letzteren Fall nahm die Alkoholoxidase Aktivität allerdings um ca. 60 % ab.

2.2.6.5.3. Gesamtproteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem 'Protein Assay' der Firma Biometra nach dem von Bradford (1976) beschriebenen Verfahren bestimmt. Über eine Proteinstandardkurve mit BSA (bovine serum albumin) wurde die Proteinmenge in den Rohextrakten quantifiziert.

2.2.6.5.4. Alkoholoxidase-Assay

Die Alkoholoxidase-Aktivität wurde nach Van der Klei et al. (1990) über die Messung der Wasserstoffperoxid-Produktion in Kopplung mit einer Peroxidase-Reaktion und einem Indikatorfarbstoff bestimmt.

Die Alkoholoxidase katalysiert die Oxidation von Alkoholen zum entsprechenden Aldehyd und Wasserstoffperoxid (im Beispiel Methanol):

$$CH_3OH + O_2 \rightarrow CH_2O + H_2O_2$$

Unter Zugabe einer Peroxidase und des Farbstoffes ABTS (2,2´-azinobis-[3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure]) wird letzterer unter Reduktion des Wasserstoffperoxids zum stabilen, intensiv grüngefärbten ABTS-Radikalkation ($ABTS^{\cdot +}$) oxidiert. Die Bildung des $ABTS^{\cdot +}$ kann durch die Zunahme der Absorption bei 420 nm verfolgt werden.

Für die Versuchsdurchführung wurden 7,5 µg Gesamtprotein und 10 µl Peroxidase (Roche, 1000 U/ml in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7) mit einer ABTS Lösung (6 mM in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7) auf ein Endvolumen von 990 µl gebracht. Nach einer Inkubation für 30 min bei 37 °C wurde die Absorption bei 420 nm bestimmt. Nach Zugabe eines Alkohols (Endkonzentration 0,4 %) wurde die Inkubation bei 37 °C fortgesetzt. In Abständen von 60 min wurde die Absorption bei 420 nm gemessen, bis diese keine Änderung mehr zeigte. Abschließend wurde die Differenz zwischen der Messung vor Zugabe des Alkohols und der letzten Messung bestimmt. Anhand des molaren Extinktionskoeffizienten des ABTS-Radikalkations (43200 M^{-1} cm^{-1}) wurde die Umsetzung des H_2O_2 und damit die Oxidation des Alkohols bestimmt. Hierbei war zu beachten, dass 2 mol ABTS pro mol H_2O_2 oxidiert werden.

Bei den hier eingesetzten Alkoholen handelte es sich um Methanol, Ethanol, 1-Butanol, Isopropanol, Isoamylalkohol, Zimtalkohol, Benzylalkohol, Hydroxybenzylalkohol (Salicylalkohol) und Glycerol. Des weiteren wurde Essigsäure als Kontrollen eingesetzt.

3. Ergebnisse

Die Analyse des Pathosystems *Triticum aestivum* / *Fusarium graminearum* bietet auf genetischer Ebene zwei verschiedene Ansatzpunkte. Ein Möglichkeit besteht darin, die Genexpression während der Infektion auf Seiten des Weizens zu untersuchen, wie dies z.B. durch Kruger et al. (2001) durchgeführt wurde. Studien dieser Art geben Informationen über die Gene des Wirts, die bei Angriff des Pathogens vermehrt exprimiert werden und ermöglichen so eine Aussage über die Reaktion des infizierten Organismus.

Der zweite Ansatzpunkt besteht darin, die Gene zu analysieren, welche auf Seiten des Pathogens für die erfolgreiche Infektion des Wirts verantwortlich sind. Für diesen Ansatz gibt es wiederum zwei Möglichkeiten. Zum einen können die bei der Infektion hochregulierten Gene durch eine subtraktive Hybridisierung von cDNA-Banken angereichert und analysiert werden. Zum anderen kann die Gesamtheit aller exprimierten Gene des Pathogens betrachtet werden. Die erste Methode bietet den Vorteil, dass sich die Anzahl der zu untersuchenden Gene reduziert. Ein Nachteil der Methode ist jedoch, dass interessante Gene, die nur gering exprimiert oder herabreguliert sind, nicht berücksichtigt werden. Obwohl die zweite Methode, also das Betrachten aller exprimierten Gene, den Nachteil hat, dass die Menge dieser Gene extrem hoch ist, bietet sie jedoch den Vorteil, dass auch die schwach exprimierten Gene erfaßt werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt den Ausschnitt eines Projektes, in dem der Ansatz der Betrachtung aller exprimierten Gene verfolgt wurde. Durch ein in dieser Arbeit etabliertes, effizientes Transformationssystem ist es möglich, eine große Zahl zu untersuchender Gene in *F. graminearum* zu zerstören und den erzeugten Phänotyp des Pilzes, insbesondere in Hinsicht auf sein Verhalten bei der Infektion von Weizen, zu untersuchen.

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Etablierung eines Transformationssystems für *F. graminearum*. Des weiteren werden die Resultate für die Untersuchung von *F. graminearum* nach Zerstörung der Gene für ein Aquaporin, für eine Alkoholoxidase sowie für eine Polyketidsynthase aufgezeigt.

3.1. Etablierung eines Systems für die Transformation und Homologe Rekombination von *Fusarium graminearum*

3.1.2. Generierung von K.O.-Vektoren

Für die Etablierung des Transformationssystems von *F. graminearum* wurden in Hinsicht auf die homologe Rekombination und die damit einzusetzenden Vektoren zunächst zwei Strategien verfolgt. Zum einen sollte die Zielgensequenz im Vektor durch eine hph-Kassette unterbrochen werden. Durch Einsatz dieser Vektoren sollte die homologe Rekombination durch ein doppeltes „cross over“ erfolgen und die Zerstörung des Zielgens durch die Insertion der hph-Kassette stattfinden. Für die zweite Strategie sollte die Zielgensequenz in einem Vektor in Nachbarschaft zur hph-Kassette liegen. Hier sollte die homologe Rekombination über ein einzelnes „cross over“ vonstatten gehen. Die Zerstörung des Zielgens sollte als Folge der Insertion des gesamten Vektors erfolgen.

3.1.2.1. Vektoren mit der Hygromycin-Resistenz-Kassette in der Zielgensequenz (Replacement-Vektor)

Mit degenerierten Primern (DEG HOM I und DEG HOM II sowie DEGSacchDH1 und DEGSacchDH2), die zum einen auf den Sequenzen für ein Homoaconitase-Gen, und zum anderen auf den Sequenzen für ein Gen der Saccharopin-Dehydrogenase basierten, konnten aus der genomischen DNA von *F. graminearum* Fragmente einer Größe von 1757 bp (Homoaconitase) bzw. 1050 bp (Saccharopin-Dehydrogenase) amplifiziert werden. Nach der Ligation dieser Fragmente in den pGEM®-T-Vektor entstanden zunächst die Plasmide pGEM-T/HomoFgA8 und pGEM-T/SacFg-F4. Nach der Sequenzierung der Fragmente erfolgte ein Homologievergleich, wodurch diese den genannten Genen zugeordnet werden konnten (F.J. Maier, persönliche Mitteilung).

Ein drittes, durch Verwendung degenerierter Primer (AQP-fw und AQP-rev) gebildetes, 432 bp großes Fragment konnte nach der Ligation in den Vektor pGEM®-T und der anschließenden Sequenzierung als Teilsequenz eines Aquaporin-Gens identifiziert werden (pGEM-T/AQPFg-37). Auf die Sequenz dieses Gens wird in der vorliegenden Arbeit unter Ergebnisse 3.2.2. näher eingegangen.

Es wurden verschiedene Versuche unternommen, die Sequenzen für das Homoaconitase-Gen, das Saccharopin-Dehydrogenase-Gen sowie das Aquaporin-Gen aus *F. graminearum* durch eine hph-Kassette zu unterbrechen. Die genannten Sequenzen ließen sich sowohl in den pGEM®-T Vektor als auch in den pUC19 Vektor ligieren. Die erfolgreiche Ligation einer hph-Kassette konnte jedoch in keinem der unter Material und Methoden 2.1.3.3. aufgeführten Versuche erzielt werden. In allen genannten Fällen wurden die mit den ligierten Plasmiden transformierten Bakterien in einem hohen Durchsatz zunächst über die Analyse der aufgereinigten Plasmide der transformierten Bakterien und später mit einer gegen das Hygromycin-Resistenzgen gerichteten Sonde über die Bakterienkolo-

nie-Hybridisierung „gescreent“. Im ersten Fall wurden je Ligationsansatz 96 Kolonien getestet, im zweiten Ansatz jeweils fünf Transformationsplatten (Ø 94 mm) mit mittlerer Koloniezahl (500 bis 1000 pro Platte).

Als Ergänzung zu den hier angeführten Ergebnissen ist zu erwähnen, dass ähnliche Klonierungsversuche, in denen die hph-Kassette über ein Transposon-Vektor-System in die Zielsequenz eingeführt werden sollte, ebenfalls gescheitert sind (T. Lacour, pers.).

3.1.2.2. Vektoren mit der Hygromycin-Resistenz-Kassette in Nachbarschaft zur Zielgensequenz (Insertions-Vektor)

Im Gegensatz zu der unter Ergebnisse 3.1.2.1. genannten Strategie, gab es keine Probleme bei der Ligation der Zielsequenz in Vektoren, die bereits eine hph-Kassette enthielten. Nach dieser Vorgehensweise konnten die genannten Vektoren (pAN7-1- und pUC-min/VaHyg-Derivate) über Restriktions- und Ligationsschritte erstellt werden.

3.1.2.3. Polyketidsynthase K.O.-Vektoren

Für die Etablierung des Transformationssystems wurde zunächst der Vektor pAN7-1/PKSFg-59 (Abb. 10) eingesetzt. Dieser Vektor enthielt ein durch degenerierte Primer amplifiziertes, 835 bp großes Fragment (vgl. Abb. 53, Anhang). Dieses Fragment zeigte einen offenen Leserahmen. Die hieraus resultierende Aminosäuresequenz wies eine hohe Homologie zum Bereich der konservierten Region der β-Ketoacylsynthase-Domänen mehrerer PKS-Gene anderer Organismen auf. Innerhalb dieser PKS-Gensequenz konnte der Vektor durch das Enzym *Eco*47III linearisiert werden. Durch den Verdau entstanden zwei Enden in der Größe von 500 bzw. 335 bp.

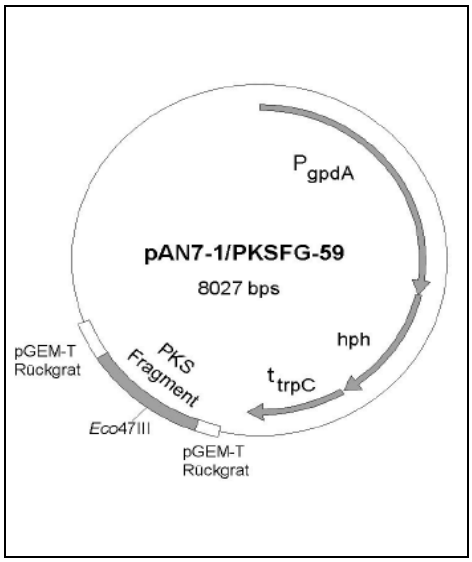


Abb. 10: Plasmidkarte des Vektors pAN7-1/PKSFg-59. ^{P}gpdA: gpd-Promotor aus *Aspergillus nidulans*, hph: Hygromycin B Phosphatase aus *Escherichia coli*, ^{t}trpC: Terminatorregion des trpC Gens aus *A. nidulans*, PKS-Fragment: 835 bp Fragment aus der β-Ketoacylsynthase Domäne des *PKS*-Gens von *F. graminearum*.

Des weiteren wurden die Vektoren pAN7-1/PKS100.1.12, pAN7-1/PKS200.1.20, pAN7-1/PKS300.1.16 und pAN7-1/PKS500.2.25 für die Etablierung des Transformationssystems eingesetzt. Diese Vektoren wurden auf Basis der in pAN7-1/PKSFg-59 enthaltenden Sequenz generiert (zur Position der Primer und der damit generierten Sequenzen siehe Abb. 53, Anhang). Sie enthielten somit gleichermaßen Sequenzbereiche aus der β-Ketoacylsynthase-Domäne und entsprechen im Aufbau dem in Abb. 10 abgebildeten Vektor pAN7-1/PKSFg-59. Diese Vektoren konnten ebenfalls durch das Enzym *Eco*47III linearisiert werden, wodurch es zu den in Tab. 2 dargestellten symmetrischen Enden kam. Wie aus der Tabelle zu erkennen ist, kam es durch die Restriktion zu relativ kurzen Enden. Die Transformation mit diesen Vektoren diente der Eingrenzung auf die mögliche Mindestgröße der zum Zielgen homologen Sequenzabschnitte.

Tab. 2: Sequenzabschnitte verschiedener Größe aus der β-Ketoacylsynthase Domäne der PKS aus *F. graminearum*. Links sind die entsprechenden Vektoren aufgeführt, in der Mitte die Gesamt-PKS-Fragmentlänge und rechts die entstehenden Enden nach der Restriktion mit dem Enzym *Eco*47III.

pAN7-1/PKS100.1.12	106 bp	53/53 bp
pAN7-1/PKS200.1.20	200 bp	103/97 bp
pAN7-1/PKS300.1.16	301 bp	148/153 bp
pAN7-1/PKS500.2.25	498 bp	249/249 bp

3.1.2. Etablierung der Transformation mit PKS-K.O.-Vektoren

Die Transformation erfolgte zunächst mit dem Vektor pAN7-1/PKSFg-59. Später wurden Versuche mit den in Tab. 2 aufgeführten PKS-K.O.-Vektoren hinzugezogen, um die für eine erfolgreiche Integration im Zielgen erforderliche Mindestlänge der homologen Enden abschätzen zu können. Unter Einbeziehung der unter Material und Methoden 2.2.4.1.5. genannten Variationen sind im folgenden die grundlegenden Ergebnisse der Transformationsetablierung unter Verwendung der PKS-K.O.-Vektoren aufgelistet. Darüber hinaus ist an dieser Stelle auf Material und Methoden 2.2.4.1. zu verweisen. Dort wurden die Gesamtergebnisse zu einer Methode zusammengefasst.

Es wird später noch auf die speziellen Ergebnisse hinsichtlich der Disruption des PKS Gens eingegangen werden.

- **Transformationsrate**

  Pro Transformation konnten bis zu 100 Transformanden regeneriert werden.

- **Eingesetzte Plasmidmenge**

  Nach Einsatz verschiedener Mengen an Plasmid-DNA (5 µg, 10 µg, 15 µg, 30 µg und 50 µg) konnte festgestellt werden, dass ≥ 30 µg die besten Resultate erbrachte. Der Einsatz von 50 µg brachte gegenüber 30 µg keine Änderung.

- **Konfiguration des eingesetzten Plasmids**

  Wurde die Plasmid DNA in linearisierter statt in zirkulärer Form eingesetzt, so konnten bis zu 20fach höhere Mengen an Transformanden regeneriert werden.

- **Rate der homologen Rekombination**

  Die Rate der homologen Rekombination betrug für das PKS-Gen 90 bis 100 %, bei Einsatz eines Vektors mit homologen Enden der Größe von 500 und 335 bp.

- **Mindestlänge der dem Zielgen homologen Enden**

  Beim Einsatz der Vektoren pAN7-1/PKS100.1.12, pAN7-1/PKS200.1.20, pAN7-1/PKS300.1.16 und pAN7-1/PKS500.2.25 konnte festgestellt werden, dass die homologen Enden mindestens 250 bp betragen müssen. Mit den ersten drei Vektoren (homologe Enden: 53/53 bp, 103/97 bp, 148/153 bp) konnten lediglich 13, 5 bzw. 1 Transformand(en) regeneriert werden, von denen keiner eine homologe Rekombination im Zielgen zeigte. Der vierte Vektor (homologe Enden: 249/249 bp) führte zur Regeneration von 12 Transformanden, wobei die Rate der homologen Rekombination im Zielgen 75 % betrug.

- **Kultivierung des zu protoplastierenden Myzels**

  Die Kultivierung der zu protoplastierenden Myzelkultur in CM-, PDB- oder YPG-Medium hatte keinen Einfluss auf die Transformierbarkeit oder Regeneration der Protoplasten sowie auf die Rate der homologen Rekombination.

- **Protoplastenmenge und Einfluss der verdauenden Enzyme**

  Die Ausbeute an Protoplasten betrug in der Regel etwa 0,8 x 10^8 pro Gramm eingesetztes Myzel. Wurde die Protoplastierung nur unter Einsatz von Driselase durchgeführt, kam es zu Schwankungen, die gegen Null gehen konnten. Die Kombination der Driselase mit Glucanase führte zu einem konstanten Protoplastierungsergebnis.

- **Protoplastierung aus Konidien ÜN Kultur**

  Erfolgte die Protoplastierung direkt aus dem Myzel einer mit Konidien beimpften ÜN YPG-Kultur, so lag die Zahl der Protoplasten bei etwa 0,4 x 10^8 pro Gramm zu verdauenden Materials. Hinzu kam, dass aus 6 x 10^6 Konidien ÜN lediglich 300 mg Myzel entstanden. Hieraus ließen sich 1,2 x 10^7 Protoplasten gewinnen. Diese Menge war nur ausreichend für maximal zwei Transformationen.

- **Medium der Protoplastierung**

  Es zeigte sich kein Unterschied in der Rate der Protoplastierung oder der Transformationsfähigkeit der Protoplasten, wenn der Zellwandabbau statt in 700 mM NaCl, in 1 M $MgSO_4$ erfolgte.

- **Eingesetztes Osmotikum**

  Die Transformierbarkeit wurde weder verbessert noch verschlechtert, wenn die Protoplasten, statt mit 700 mM NaCl als Osmotikum, in 2 M und 1 M Sorbitol gewaschen wurden.

- **Wirksame Hygromycinkonzentration im Überschichtungsagar**

  Wurde die wirksame Hygromycin B Endkonzentration im Überschichtungsmedium variiert, zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von 25 µg/ml bedingt wirksam war, um eine Selektion durchführen zu können. Neben den stabilen Transformanden, die aufgrund ihrer Größe weiter kultiviert wurden, wuchsen hierbei jedoch zahlreiche kleine Kolonien (Ø etwa ½ bis 1 mm) durch den Überschichtungsagar. Diese Tendenz nahm von 50 µg über 75 µg bis 100 µg/ml vollständig ab. Auch die Konzentrationen von 150 µg und 200 µg/ml führten zum Wachstum von Transformanden. Standardmäßig wurde eine wirksame Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt.
- **Wirksame Hygromycinkonzentration im Selektionsmedium**

  Parallel zur Wirksamkeitskonzentration des Hygromycins im Überschichtungsagar wurde diese im CM-Selektionsmedium bestimmt. Hier zeigte sich, dass der Wildtyp von *F. graminearum* bei einer Konzentration von 25 µg/ml noch ein sehr geringes Wachstum aufwies. Bereits bei 50 µg/ml zeigte der Wildtyp kein Wachstum mehr. Eine Transformande, die das hph-Gen trug, zeigte hingegen normales Wachstum bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 200 µg/ml.

3.2. Aquaporin aus *Fusarium graminearum*

3.2.1. Generierung eines K.O.-Vektors für die Disruption eines Aquaporin-Gens

Unter Einsatz der degenerierten Primer AQP-fw und AQP-rev wurde ein 432 bp großes Fragment erstellt, welches in den Vektor pGEM®-T ligiert, sequenziert und als Aquaporinfragment identifiziert wurde. Der hieraus entstandene Vektor wurde als pGEM-T/AQPFg-37 bezeichnet.

Ausgehend von diesem Vektor wurde unter Einsatz der Primer AQP37InvA und AQP37InvB eine Inverse PCR durchgeführt, über die eine Restriktionserkennungsstelle (*Eco*47III, Position nt 205 bis 210) in die Sequenz eingefügt wurde. Außerdem wurde durch die Inverse PCR jeweils eine Base vor und hinter der neu eingefügten Schnittstelle deletiert. Dadurch entsteht bei der später folgenden Transformation von *F. graminearum* eine Verschiebung im Leserahmen der rekombinierten DNA-Abschnitte. Diese Maßnahme sollte verhindern, dass sich das zu disruptierende Gen durch Insertion des die Zielgensequenz enthaltenden Vektors komplementieren und dieses zu einer intakten Proteinkopie führen konnte. Die Möglichkeit dieser Problematik ergibt sich insbesondere bei kurzen Genen, da hier ein Großteil des zu disruptierenden Gens als Zielgensequenz in dem K.O.-Vektor vorliegt. Nach der homologen Rekombination kann dies dazu führen, dass ein annähernd intaktes 5‘- oder 3‘-Ende des Gens entsteht (vgl. auch Abb. 8, Material und Me-

thoden 2.2.5.8.8.). Liegt in einem der intakten Abschnitte ein aktives Zentrum, so kann dies zu einem funktionellen Enzym führen.

Im vorliegenden Fall des Aquaporins (AQP) sollte aus der homologen Rekombination mit dem K.O.-Vektor eine Genkopie mit einer Deletion von 258 Nukleotiden (86 Aminosäuren) sowie eine zweite Kopie mit einer Deletion von 195 Nukleotiden (65 Aminosäuren) resultieren. Keine der beiden entstehenden Kopien sollten somit intakt sein, insbesondere, da die Proteine der bekannten Aquaporine in ihrer Funktion auf die korrekte Integration in einer Membran angewiesen sind und die genannten Deletionen zum Verlust einer bzw. zweier Transmebrandomänen in den entstehenden Genkopien führt. Um jedoch aufgrund der geringen Länge des Gens auszuschließen, dass ein Fusionsprotein funktionell erhalten bleibt, wurden die genannten Verschiebungen des Leserahmens eingefügt.

Die im Vektor pGEM-T/AQPFg-37 vorliegende Sequenz ist in der Abb. 47 des Anhangs dargestellt. Die für die Inverse PCR eingesetzten Primer sind eingezeichnet, die zu deletierenden Basen und die neu eingefügte Schnittstelle sind markiert. Der Bereich der homologen Region ist ferner in der Abb. 48 des Anhangs markiert, die ebenfalls die putativen Transmembrandomänen aufzeigt. In dieser Abbildung wird deutlich, welche Regionen durch die genannten Deletionen verloren gehen.

Nach der Inversen PCR erfolgte eine Subklonierung aus dem pGEM®-T Vektor in den pAN7-1 Vektor. Hierfür wurde das modifizierte Aquaporinfragment mit dem Enzym *Pvu*II aus dem pGEM®-T Vektor herausgeschnitten und in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert. Der hieraus entstandene K.O.-Vektor pAN7-1/AQP37-A7-62 ist in der Abb. 11 abgebildet. Für die Transformation wurde der Vektor mit Eco47III linearisiert, wodurch homologe Enden der Länge von 206 bp und 224 bp entstanden.

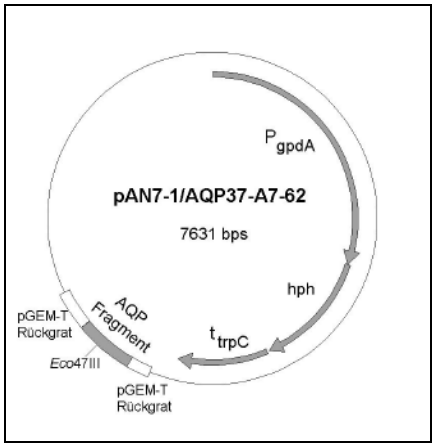


Abb. 11: Plasmidkarte des Vektors pAN7-1/AQP37-A7-62. ^{P}gpdA: gpd-Promotor aus *Aspergillus nidulans*, hph: Hygromycin B Phosphatase aus *Escherichia coli*, ^{t}trpC: Terminatorregion des trpC Gens aus *A. nidulans*, AQP Fragment: 430 bp großes modifiziertes Aquaporinfragment aus *F. graminearum*.

3.2.2. Vollständige Sequenz des *AQP*-Gens

Homologievergleiche zeigten, dass die angegebene Sequenz nur einen Teil des Aquaporin-Gens aus *F. graminearum* beinhaltete. In der Regel bestehen diese, einer großen Genfamilie angehörenden, Gene aus ca. 900 bp. Zur Vervollständigung des hier untersuchten Gens wurde daher eine TAIL-PCR mit den Primern SMTAIL1FAQP bis 3FAQP in Richtung des 5'-Bereichs sowie SMTAIL1RAQP bis 3RAQP in Richtung des 3'-Bereichs durchgeführt. Durch diese Reaktionen wurde ein Fragment in einer Gesamtlänge von 1837 bp generiert. Innerhalb dieser Sequenz konnte ein kompletter offener Leserahmen von 885 bp identifiziert werden. Ein den offenen Leserahmen beinhaltender Abschnitt des Gens wurde durch die Amplifikation mit verschiedenen Primern sowie eine anschließende Sequenzierung der PCR-Produkte nochmals verifiziert. In der Abb. 48 im Anhang wird die Translation dieses Leserahmens dargestellt. Außerdem sind die Bindungsstellen der TAIL-Primer sowie weiterer Primer markiert und bezeichnet.

Innerhalb des Leserahmens gibt es keine Verschiebung. Unter Berücksichtigung der durchschnittlichen Größe von Mitgliedern der Familie der membranintrinsischen Proteine (MIP) gibt es somit keinen Hinweis auf Intronsequenzen innerhalb des Gens. Der Vergleich der Sekundärstruktur des putativen Proteins mit weiteren Proteinen der genannten Familie zeigt jedoch einen Hinweis auf eine mögliche Intronstruktur.

In der Abb. 11 sind die Ergebnisse der mit dem Programm ANTHEPROT durchgeführten Analyse hinsichtlich transmembraner Regionen dargestellt. Das putative Protein, welches sich aus der vollständigen genomischen Nukleinsäuresequenz ergibt, weist sieben transmembrane Regionen und sechs Schleifen auf (A), von denen (a), (b) und (c) auf der „falschen" Seite der Membran liegen. Auch befindet sich der C-Terminus nicht auf „richtigen" Seite der Membran (vgl. Einleitung Abb. 4). Wird der Abschnitt der in der Abb. als (x) bezeichneten Schleife entfernt, so ergibt sich die für MIP typische Struktur mit sechs Transmembranregionen und fünf Schleifen (B). Der Abschnitt des sich aus diesem Zusammenhang ergebenen möglichen Introns ist in der Abb. 48 (Anhang) markiert. Ferner sind die putativen Regionen der Transmembrandomänen in der Abb. 48 markiert.

Ein Homologievergleich des AQP aus *F. graminearum* mit dem AQY1 aus *S. cerevisiae* ist im Anhang in Abb. 49 aufgezeigt. Zu diesem Aquaporin weist das Gen aus *F. graminearum* die höchste Homologie auf und zeigt außerdem signifikante Ähnlichkeiten zu weiteren Aquaporin-Genen (Daten nicht gezeigt), jedoch nicht zu sonstigen Genen. In der Abb. sind die konservierten MIP-typischen NPA-Motive hervorgehoben, die sich in den Schleifen (b) und (e) befinden. Des weiteren sind in der Abbildung vier auf die zweite NPA-Box folgende Aminosäuren markiert, die charakteristisch für Aquaporine sind. In Glyceroltransportern sind diese gegen andere Aminosäuren ausgetauscht (Lagrée et al., 1998; Lagrée et al., 1999), wobei insbesondere die Position drei und vier eine Rolle in der Selektivität der Pore gegenüber Wasser oder Glycerol spielt. Das Serin in Position 1 (nach der NPA-Box) ist entscheidend für die Tetramerbildung des funktionellen Proteins. Das hier beschriebene putative Protein aus *F. graminearum* unterscheidet sich lediglich in

der zweiten Aminosäure von den konservierten Resten, womit es sich aufgrund aller Sequenzinformationen hierbei um ein Aquaporin handeln dürfte.

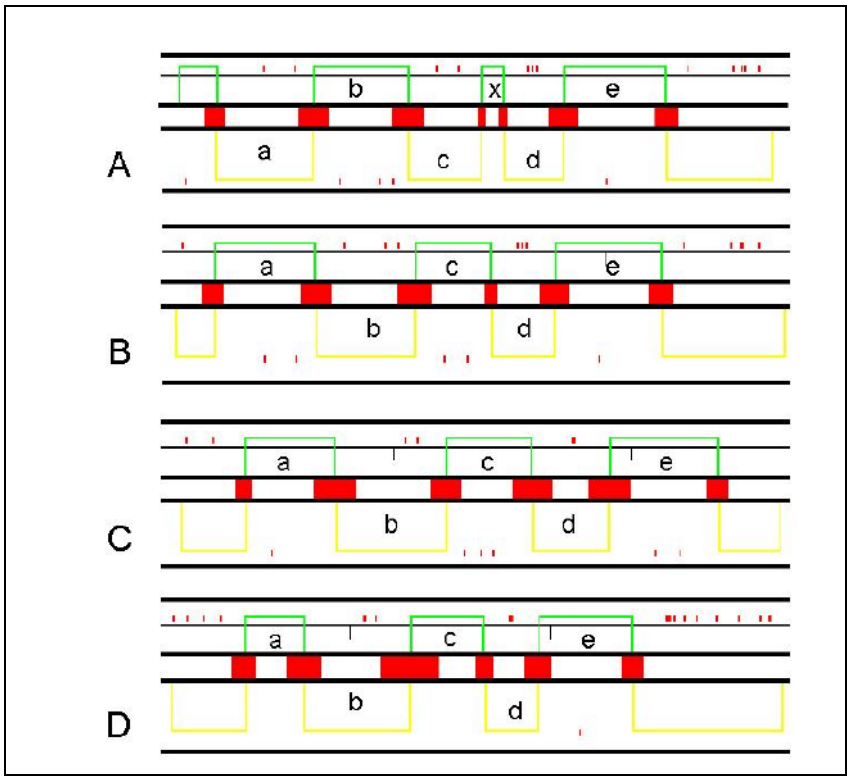


Abb. 11. Vergleich verschiedener MIP in Hinsicht auf ihre topologische Struktur. (A) Aquaporin aus *F. graminearum* , abgeleitet aus der gesamten genomischen Sequenz; (B) Aquaporin aus *F. graminearum* unter Deletion einer möglichen Intronstruktur, was zur Eliminierung der Schleife (x) führt (vgl. Text); (C) Tonoplast intrinsic protein (TIP) aus *Arabidopsis thaliana* (Hoefte et al., 1992); (D) AQP4 aus *Mus musculus* (Ma et al., 1996).
Transmembrandomänen: rot; extrazelluläre Schleifen (a, c und e): grün; cytoplasmatische Schleifen (b und d): gelb.

3.2.3. Disruption des AQP-Gens von *Fusarium graminearum*

Durch eine Transformation mit dem Vektor pAN7-1/AQP37-A7-62, der mit dem Enzym *Eco*47III linearisiert wurde, konnten 36 Transformanden generiert werden. Von diesen wurden 10 nach einer Konidienvereinzelung in einer PCR-Reaktion auf die Integration des K.O.-Vektors im Zielgen hin untersucht. Mit den Primerkombinationen AQP3‘a und AQP5‘a sollten sowohl der Wildtypzustand (inklusive Transformanden mit transienter Expression des *hph*-Gens) als auch ektopische Ereignisse nachgewiesen werden. Diese Primer binden außerhalb des Zielfragments im AQP-Gen und führen zu einem 498 bp großen Fragment im Wildtyp bzw. zu einem 7.7 kb großen Fragment im Falle einer erfolgten Integration des Vektors. Unter den hier gewählten Standard-PCR-Bedingungen sollte die Amplifikation des größeren Fragments ausgeschlossen sein. Für den Nachweis der erfolgreichen Integration im Zielgen wurde die Primerkombination AQP3‘a und M13/pUC Reverse gewählt. Letzterer bindet im pAN7-1 Vektor und generiert mit ersteren ein 660 bp großes Fragment.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis der PCR-Reaktionen. Acht der getesteten 10 Transformanden zeigen die K.O.-spezifische Bande. Die zwei übrigen zeigen die Wildtypbande. Trotz der Konidienvereinzelung, durch die eine homokaryotische Kultur erreicht werden sollte, zeigen fünf der acht K.O.-Mutanten zusätzlich die Wildtypbande. Hierbei ist das Signal in

einem Fall ebenso intensiv wie das der K.O.-spezifischen Banden (172.7.1.). In vier Fällen ist es deutlich schwächer (172.1.1., 172.2.1., 172.6.1. und 172.8.1.). In drei Fällen (172.5.1., 172.9.1. und 172.15.1.) war nur die K.O.-spezifische Bande detektierbar. Mit diesen Mutanten wurden die weiteren Versuche dieser Arbeit durchgeführt.

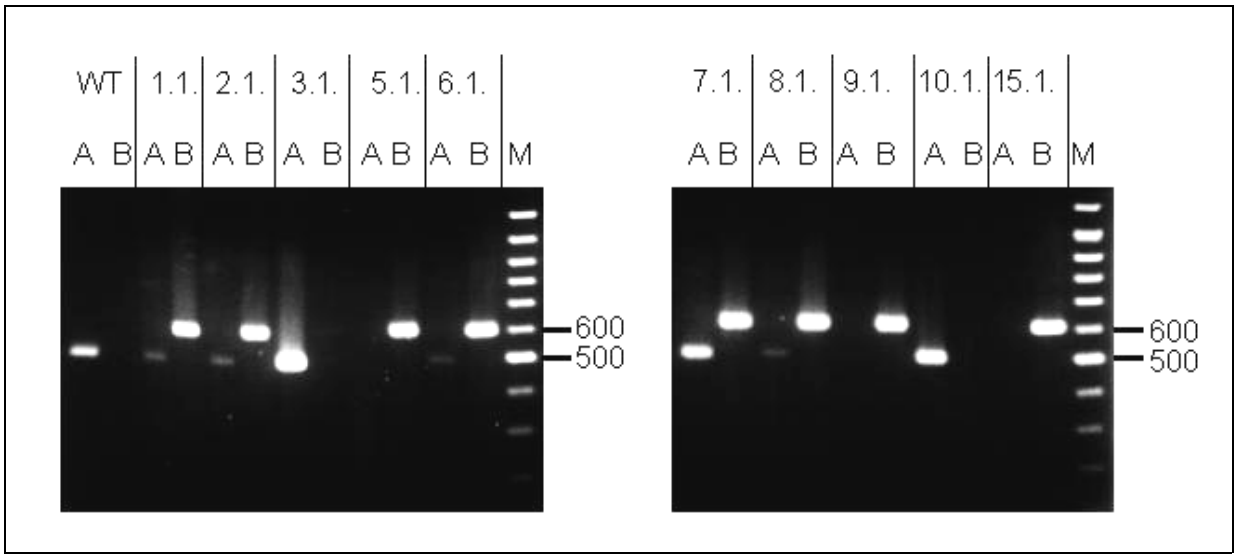


Abb. 12: PCR für die Identifizierung der AQP-K.O.-Mutanten. (A) PCR mit den Primern AQP3‘a und AQP5‘a („Wildtypbande“); (B) PCR mit den Primern AQP3‘a M13/pUC Reverse („K.O.-Bande“). Beladung der Spuren: WT: Wildtyp-PCR-Produkte; 1.1. bis 15.1.: Transformanden-PCR-Produkte (172.1.1. bis 172.15.1.); M: Größenstandard. Jeweils rechts von den Gelbildern sind die Molekulargrößen in bp angegeben.

3.2.4. Untersuchung der AQP-K.O.-Mutanten

3.2.4.1. Wachstumsverhalten

Die untersuchten AQP-K.O.-Mutanten zeigten auf den unter Ergebnisse 3.4.3.4. beschriebenen Medien das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp. Da Aquaporine eine Rolle in der Osmoregulation spielen können, sollte außerdem das Wachstum der Mutanten unter osmotischem Stress mit dem des Wildtyps verglichen werden. Für diese Analyse wurden die Transformanden sowie der Wildtyp von *F. graminearum* auf YPG-Platten kultiviert, denen Sorbitol in den Molaritäten von 0 bis 2 M zugesetzt wurde. Nach der Inokulation mit einem Myzel-Agar-Blöckchen erfolgte das Wachstum bei 28 °C für fünf Tage.

Die getesteten AQP-K.O.-Mutanten zeigten keinen Wachstumsunterschied gegenüber dem Wildtyp (Abb. 13). In allen Fällen zeigt sich eine leichte Wachstumssteigerung ab 0,5 M Sorbitol, wohingegen es ab 1,5 M Sorbitol zu einem Wachstumsrückgang kommt. Bei 2 M Sorbitol reduzierte sich das Wachstum schließlich bei allen getesteten Klonen um ca. 50 % gegenüber der höchsten Wachstumsrate.

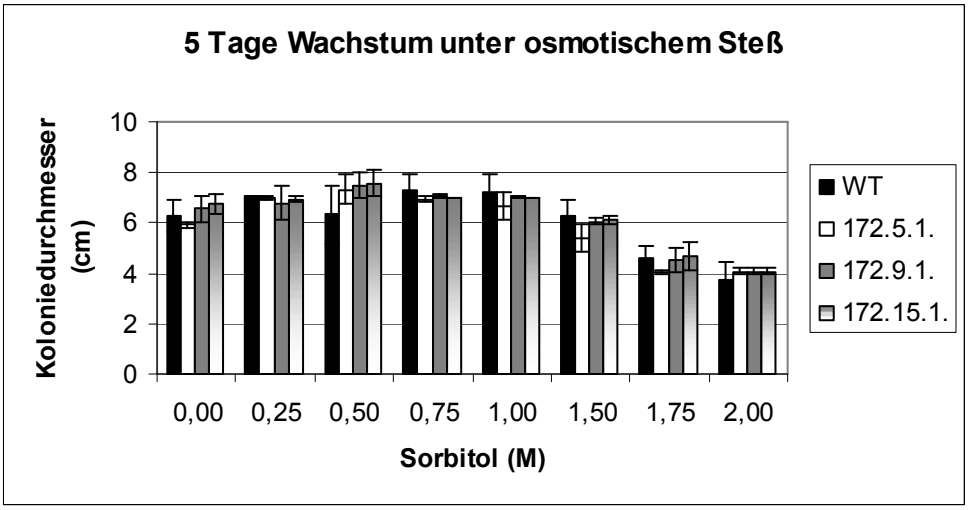


Abb. 13: Wachstum des Wildtyps (WT) und dreier AQP-K.O.-Mutanten (172.5.1. bis 172.15.1.) unter osmotischem Stress. Es ist jeweils das Wachstum (Koloniedurchmesser in cm) nach fünf Tagen bei unterschiedlichen Sorbitol-Molaritäten aufgetragen.

Unter Mitgliedern der MIP Familie, zu denen die Aquaporine zählen, sind außerdem Glyceroltransporter oder Wasser-Glyceroltransporter (Aquaglyceroporine) bekannt. Obwohl bestimmte konservierte Sequenzregionen im vorliegenden Fall für ein Aquaporin sprechen, sollte in einem weiteren Versuch eine mögliche Veränderung der Fähigkeit zur Glycerolaufnahme bei den AQP-K.O.-Mutanten untersucht werden.

In diesem Versuch wurden die verschiedenen Klone in Nitrogen Base mit Glycerol oder Glucose (Kontrolle) als einzige Kohlenstoffquelle kultiviert. Als weitere Kontrolle diente eine Kultur ohne Kohlenstoffquelle. Das Wachstum erfolgte bei 28 °C unter Schütteln in 50 ml Kulturen, die mit je 10^5 Konidien inokuliert wurden. Nach sechs Tagen wurde das Wachstum der Kulturen optisch abgeschätzt und mit Werten von 0 bis 7 belegt (Abb. 14).

Weder der Wildtyp noch die Transformanden wachsen ohne Kohlenstoffquelle. Mit Glucose als Kohlenstoffquelle zeigt sich ein sehr starkes Wachstum in allen vier Fällen. Die Gabe von 2 % Glycerol führt nur zu geringem Wachstum in Einzelfällen. Aus dem Zusatz von 4 % Glycerol resultierte ein deutliches Wachstum, welches jedoch hinter dem mit Glucose zurückblieb. Zusammenfassend zeigt sich bei der Gabe von Glucose oder Glycerol als einzige Kohlenstoffquelle jeweils kein Unterschied im Wachstum der vier Stämme.

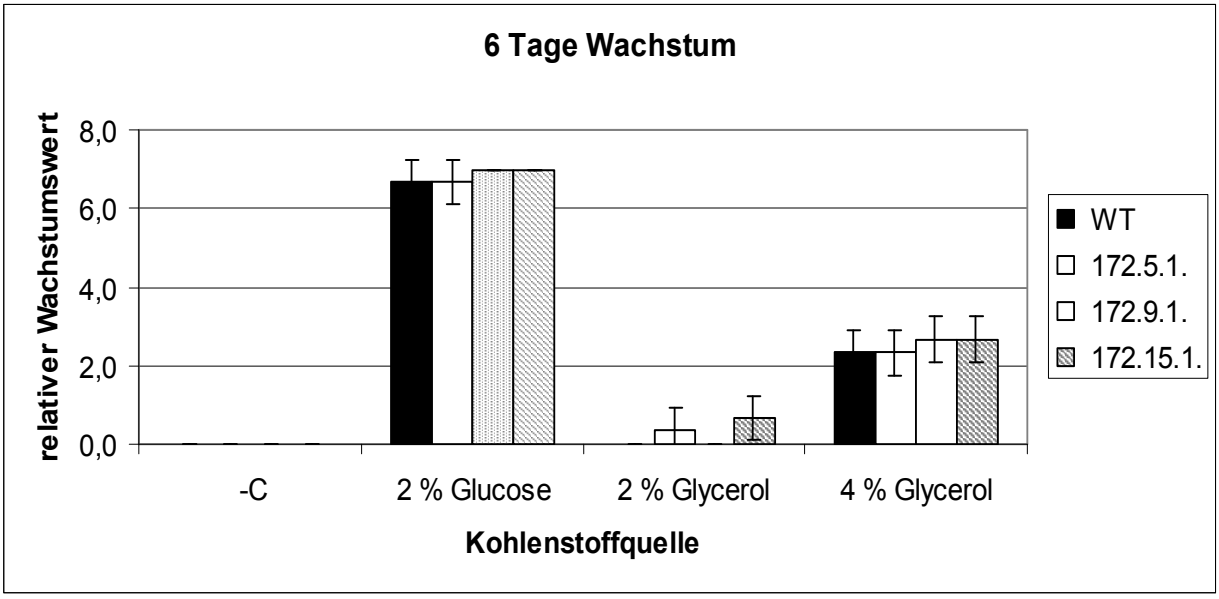


Abb. 14: Kultivierung mit Glycerol bzw. Glucose als alleinige Kohlenstoffquelle. WT: Wildtyp von F. graminearum; 172.5.1. bis 172.15.1.: AQP-K.O.-Mutanten. Die Kultivierung erfolgte für sechs Tage unter Zugabe verschiedener Kohlenstoffquellen. Anschließend wurde das Wachstum optisch abgeschätzt. Die sich daraus ergebenden relativen Werte von 0 bis 7 sind grafisch dargestellt. -C: keine Kohlenstoffquelle.

3.2.4.2. Bestimmung der Konidienbildung und -keimung

Um den Einfluss der Disruption des AQP-Gens auf die Quantität und Keimungsfähigkeit der Konidien zu bestimmen, wurde die Konidienbildung des Wildtyps sowie der AQP-K.O.-Mutante 172.5.1. auf SNA Platten (Ø 60 mm) induziert. Nach 10 Tagen wurden die Konidien jeweils mit 2 ml H_2O von den Platten abgeschwemmt und ausgezählt. In drei parallelen Ansätzen ergab sich hierbei eine durchschnittliche Konidienzahl von 6,6 x 10^5/ml für den Wildtyp und 6,3 x 10^5/ml für die PKS-K.O.-Mutante. Ein signifikanter Unterschied war somit nicht zu erkennen. Für die Bestimmung der Keimung wurden jeweils 30 Konidien der AQP-K.O.-Mutante und des Wildtyps auf CM-Medium ausgebracht. Von den Wildtyp-Konidien keimten 27 von den K.O.-Konidien 28 aus. Hierbei gab es keinen signifikanten Unterschied in der Geschwindigkeit der Keimung.

3.2.4.3. Infektion von Weizen

Die folgende Abb. 15 zeigt das Ergebnis eines Infektionsversuches von Weizen, der nach 25 Tagen ausgewertet wurde. Sowohl der Wildtyp als auch die drei getesteten AQP-K.O.-Mutanten zeigen ein ausgeprägtes Schadbild an der Weizenähre. Die Disruption des AQP-Gens scheint somit keinen Einfluss auf die Pathogenität von *F. graminearum* zu haben.

Abb. 15: Ähreninfektionsversuche mit *F. graminearum* nach 25 Tagen. Je Ähre wurden zwei Ährchen mit je 1000 Konidien inokuliert. Die Ähren wurden 3 Tage eingetütet, um eine hohe relative Luftfeuchtigkeit während der Primärinfektion zu gewährleisten. Anschließend wurden die Pflanzen unter Aufzuchtbedingungen (Punkt 2.2.1.) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90 % gehalten. WT: Wildtyp von *F. graminearum*; K: Wasserkontrolle; 172.5.1., 172.9.1. und 172.15.1.: AQP-K.O.-Mutanten

3.3. Die Alkoholoxidase von *Fusarium graminearum*

3.3.1. Sequenz für die Generierung des AOX-K.O.-Vektors

Durch eine Suche in der vorliegenden cDNA-Bank wurde ein EST-Klon ausgewählt (4320, Abb. 50, Anhang), der eine hohe Homologie zu dem 3'-Bereich eines Gens der Alkoholoxidase (AOX) aus *Cladosporium fulvum* (dort als Virulenzfaktor identifiziert, Segers et al., 2001) aufwies. Mit den spezifischen Primern ANK530AOX und ANK531AOX, die eine *Not*I bzw. eine *Asc*I Erkennungsstelle tragen, wurde aus dem cDNA Klon ein 559 bp großes Fragment amplifiziert. Nach Verdau mit den genannten Enzymen entstand ein 539 bp großes Fragment, das in den mit *Not*I und *Asc*I linearisierten Vektor pUCmin/VaHyg einligiert wurde (Abb. 16). Für die Transformation von *F. graminearum* konnte der K.O.-Vektor mit dem Enzym *Xho*I linearisiert werden, wobei zwei Enden der Länge von 199 und 340 bp entstanden.

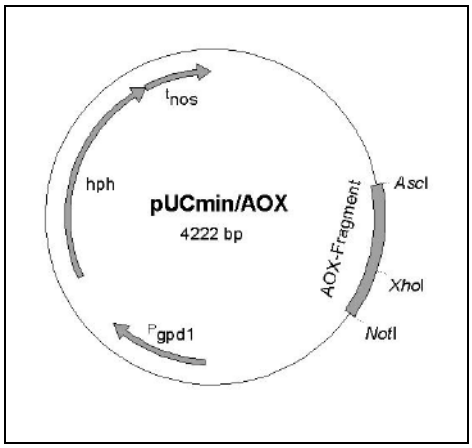


Abb. 16: Plasmidkarte des Vektors pUCmin/AOX. ^{P}gpd1: Promotor des gpd-Gens aus *C. heterostrophus,* hph: Hygromycin B Phosphatase aus *Escherichia coli*, ^{t}nos: Terminatorregion des Nopalin-Synthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

3.3.2. Vollständige Sequenz des *AOX*-Gens

In der vorliegenden cDNA-Bank konnte eine weitere EST-Sequenz (8238) identifiziert werden, die ebenfalls eine hohe Homologie zu der genannten Sequenz aus *C. fulvum* aufwies. Die Homologie zeigte sich hier im 5'-Bereich des genannten Gens. Es konnte daher angenommen werden, dass diese zweite EST-Sequenz den 5'-Bereich des Gens aus *F. graminearum* repräsentierte. Aufgrund dieser Annahme wurde ein Primer (AOXF1) von dieser zweiten Sequenz abgeleitet, der in Kombination mit dem von der Sequenz 4320 abgeleiteten Primer AOXR1 für eine PCR mit genomischer DNA eingesetzt wurde.
Mit diesen Primern konnte ein 2031bp großes Fragment amplifiziert werden, welches eine Homologie zu dem AOX-Gen aus *C. fulvum* aufwies. Der Homologievergleich zeigte jedoch, dass die Gensequenz aus *F. graminearum* nicht vollständig war. Zur Vervollständigung der Sequenz wurde daher mit den spezifischen Primern AOXT1a-b sowie AOXT2a-b eine TAIL-PCR durchgeführt. Diese führte zu einem Fragment der Länge von 3942 bp. Innerhalb dieser Sequenz konnte ein Abschnitt der Länge von 2436 bp identifiziert werden, der mehrere offene Leserahmen sowie putative Intronsequenzen aufwies.
Die Zusammengehörigkeit der beiden EST-Sequenzen sollte ebenfalls auf cDNA-Ebene verifiziert werden. Hierfür sollte mittels der Primer AOXINF1 und AOXINR1 die Lücke zwischen den beiden Sequenzen überbrückt werden. Im Rahmen dieses Versuches stellte sich heraus, dass das AOX-Gen in einer *Fusarium*-Kultur in CM-Medium nicht exprimiert wird. Erst mit der cDNA aus mit *F. graminearum* infizierten Weizenähren konnte ein Fragment amplifiziert werden, welches sich nach der Sequenzierung als „Mittelteil" des *AOX*-Gens identifizieren ließ.
Nach diesem Ergebnis wurde das cDNA-Fragment 8238 komplett sequenziert, wodurch ein 2282 bp langes Fragment erhalten wurde (Sequenz hier nicht gezeigt). Hier konnte ein offener Leserahmen von 2034 bp (Start- bis Stop-Codon) identifiziert werden.
Die Translation der Nukleinsäuresequenz in das putative Protein der AOX zeigt Abb. 51 (Anhang). Es ist die gesamte genomische Sequenz abgebildet. Die Aminosäuresequenz ist an den Intronbereichen, die sich aus dem Vergleich mit der cDNA ergeben, unterbrochen. In der Abbildung sind die mögliche TATA-Box, das Start-Codon, das Stop-Codon, die Polyadenylierungsstelle sowie die acht Intronbereiche des Genes markiert. Die für die meisten eukaryotischen Gene konservierte Region des Polyadenylierungssignals (AATAAA) konnte nicht identifiziert werden. Statt dessen findet sich eine ähnliche Basenabfolge, mit der Sequenz ATTAAT, 22 bp stromaufwärts von der Polyadenylierungsstelle.
In der Abb. 52 (Anhang) ist die putative Proteinstruktur der AOX aus *F. graminearum* im Vergleich zu der AOX aus *C. fulvum* aufgezeigt. Es sind verschiedene konservierte Regionen der AOX gekennzeichnet. Diese Regionen werden in der Abb. 17 unter Vergleich mit weiteren Alkoholoxidasesequenzen nochmals dargestellt. Es handelt sich hierbei um eine mögliche Flavin-adenin-dinucleotid (FAD)-bindende Stelle eines ADP-bindenden β-α-Motivs (Wierenga et al., 1986; Cavener 1992), eine mögliche N-Terminale Peroxisomenzielsequenz (Nishimura et al., 1996 und Flynn et al., 1998), das konservierte Gluco-

se-Methanol-Cholin (GMC)-Oxidoreduktase Muster (Cavener, 1992; Mizuguchi et al., 1998) sowie eine C-terminale Peroxisomenzielsequenz (Gould et al., 1989; De Hoop und Ab, 1992; Nishimura et al., 1996; Waterham et al., 1997).

FAD-bindende Stelle eines ADP-bindenden β-α-β-Motivs

angegebenes konserviertes Motiv:
[K/R/H/S/T/Q/N/D][A/I/L/V/M/C]-X-[A/I/L/V/M/C]-X-G-X-G-X(2)-G-X(3)-[A/I/L/V/M/C]-X(2)-[A/I/L/V/M/C]-X(5-9)-[A/I/L/V/M/C]-X- [A/I/L/V/M/C]-X-[D/E]

```
FgAOX DIIVCGGGSCGCVVAGRLANLD-HNLKVLLIE
CfAOX DIIVCGGGSCGCVVAGRLANLD-HKLQVMLIE
CbAOX DVIVCGGGSTGCVIAGRLANVD-ENLKVLLIE
HpAOX DIIVVGGGSTGCCIAGRLANLDDQNLTVALIE
PpAOX DILVLGGGSSGSCIAGRLANLD-HSLKVGLIE
      *::* **** *. :******:* ..* * ***
```

N-terminale Peroxisomenzielsequenz

angegebene konservierte Motive:
RL-X5-HL sowie R-X6-[H/K/Q][L/A]

```
FgAOX RLANLD-HNL
CfAOX RLANLD-HKL
CbAOX RLANVD-ENL
HpAOX RLANLDDQNL
PpAOX RLANLD-HSL
      ****:* ..*
```

GMC-Oxidoreduktase Muster

angegebenes konserviertes Motiv:
[G/S]-[P/S/T/A]-X(2)-[S/T]-P-X-[L/I/V/M](2)-X(2)-S-G-[L/I/V/M]-G

```
FgAOX GTLSSPLILQRSGIG
CfAOX GTLSSPLILQRSGIG
CbAOX GTVSSPMVLQRSGIG
HpAOX GTISSPLVLQRSGIG
PpAOX GTISSPLVLQRSGFG
      **:***::*****:*
```

C-terminale Peroxisomenzielsequenz

angegebenes konserviertes Motiv:
[S/T/A/G/C/N/P]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y]

```
FgAOX HRL
CfAOX ARL
CbAOX ARY
HpAOX ARF
PpAOX ARF
       *
```

Abb. 17: Alignments konservierter Regionen der Alkoholoxidase verschiedener Organismen. FgAOX: AOX von *F. graminearum* (diese Arbeit); CfAOX: AOX von *C. fulvum* (Segers et al., 2001); CbAOX: AOX von *Candida boidinii* (EMBL Datenbank-Nr. M81702); HpAOX: AOX von *Hansenula polymorpha* (EMBL Datenbank-Nr. A11156); PpAOX: AOX von *Pichia pastoris* (EMBL Datenbank-Nr. XO2646). Zeichen in der Consensusreihe: *, identische Aminosäuren in allen Sequenzen des Alignments; :, konservierte Substituenten; ., semikonservierte Substituenten.

In der Abb. 17 sind die verschiedenen, für die Gruppe der Alkoholoxidasen typischen, konservierten Regionen aufgeführt. Der Vergleich der Sequenzen verschiedener Alkoholoxidasen zeigt, dass sie geringfügig von den in der Literatur angegebenen konservierten Bereichen abweichen. Die AOX aus *P. pastoris* differiert an der vorletzten Stelle des GMC-Oxidoreduktase Musters. Die angegebenen konservierten Bereiche des N-terminalen Peroxisomensignals weichen minimal von den hier angegebenen Sequenzen ab und überschneiden sich mit der konservierten Region des ADP bindenden β-α-β-Motivs. Auch das C-terminale Peroxisomen-Ziel-Tripeptid weicht im Falle der AOX aus *F. graminearum* in der ersten Aminosäure von der angegebenen konservierten Se-

quenz ab, wobei Birdsey und Danpure (1998) jedoch zeigten, dass eben dieses Tripeptid (HRL) am C-Terminus der Glyoxylat-Aminotransferase aus *Cavia porcellus* als Zielsequenz für den Transport in Peroxisomen fungiert.

3.3.3. Disruption des *AOX*-Gens von *Fusarium graminearum*

Durch die Transformation von *F. graminearum* mit dem durch *Xho*I linearisierten Vektor pUCmin/AOX konnten 38 Transformanden generiert werden. Von diesen wurden 10 nach einer Konidienvereinzelung in der Southern-Blot-Analyse in Hinsicht auf eine legitime Integration des Vektors im Zielgen untersucht. Für die Hybridisierung wurde das mit den Primern ANK530AOX und ANK531AOX amplifizierte, 689 bp große genomische AOX-Fragment eingesetzt (Abb. 50, Anhang), welches durch eine PCR mit DIG-dUTPs für die Detektion markiert wurde. Wie in der Abb. 18 zu erkennen ist, konnte lediglich ein Transformand (Nr. 184.7.2.) identifiziert werden, der nach dem Ereignis der homologen Rekombination eine Disruption im Zielgen aufwies. Hier erhöhte sich die Molekulargröße der detektierten DNA um die Größe des integrierten Vektors. Im Autoradiogramm ließ sich dies durch den Verlust der Wildtypbande sowie das Erscheinen einer der homologen Rekombination spezifischen Bande nachweisen. Die weiteren 9 getesteten Transformanden zeigten die Wildtypbande und eine zusätzliche Bande, die jeweils aus der ektopischen Rekombination resultierte.

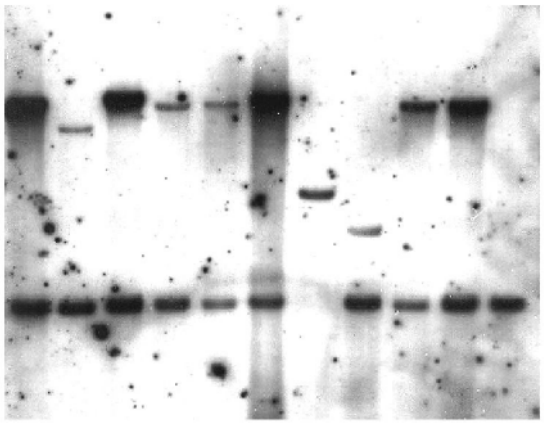


Abb. 18: Southern-Blot-Analyse der DNA nach der Transformation von *F. graminearum* mit dem Vektor pUCmin/AOX (mit *Xho*I linearisiert). Die genomische DNA wurde mit *Sal*I verdaut. Je Spur wurden 7 µg DNA aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igen Agarose Gel. Die Hybridisierung erfolgte mit einem 689 bp großen genomischen Teilfragment der AOX aus *F. graminearum*. Rechts im Bild sind die ungefähren Molekulargrößen in kb angegeben. 1.1. bis 10.1.: DNA der Transformanden 184.1.1. bis 184.10.1.; WT: DNA des Wildtyps von *F. graminearum*.

Für die Identifizierung weiterer K.O.-Mutanten erfolgte die unter Material und Methoden 2.5.5.8.8. beschriebene PCR-gestützte Analyse der übrigen 28 Transformanden. Als EF-Primer diente ANK568AOX, als ER-Primer AOX-V-Stop. Das mit diesen Primern generierte „Wildtyp-Fragment“ hatte eine Länge von 1123 bp. Bei Integration des Vektors mußte ein Fragment der angegebenen Länge zuzüglich der Länge des gesamten K.O.-Vektors (4222 bp) amplifiziert werden, welches unter den gewählten PCR-Bedingungen jedoch nicht amplifiziert wurde. Im Falle einer homologen Rekombination kam es daher nicht zur Generierung eines Produktes.

Zur Amplifikation der „K.O.-Fragmente“ dienten die Primer Lac92 (als V2-Primer) und Lac93 (als V1-Primer), die jeweils in Kombination mit einem der genannten externen Primer eingesetzt wurden. Die Kombination des Primers ANK568AOX mit dem Primer Lac93 sollte in den K.O.-Transformanden zu einem Fragment der Größe von 787 bp führen, die Kombination der Primer AOX-V-Stop und Lac92 zu einem Produkt der Größe von 1297 bp.

Die folgende Abb. 19 zeigt das Ergebnis der PCRs. Die Transformanden 184.7.2. (1), 184.14.1. (5), 184.16.1. (7), 184.23.1. (13), 184.34.1 (24), 184.37.1. (27) und 184.39.1. (29) zeigen keine Bande in der PCR mit den externen Primern (A). Der Wildtyp sowie die übrigen Transformanden weisen ein Amplifikationsprodukt auf. In der PCR mit den externen Primern in Kombination mit den vektorspezifischen Primern Lac92 bzw. Lac93 zeigen die angeführten Transformanden jeweils eine Bande. Der Wildtyp von *F. graminearum* zeigt hier keine Bande. Die genannten Transformanden konnten somit als K.O.-Mutanten identifiziert werden.

Eine Auffälligkeit zeigt sich in den Größen der „K.O.-spezifischen Banden“ (Abb. 19 [B]). Entgegen der Fragmentgröße der „Wildtypbande“ (A), die sich einheitlich zeigt, differieren die Fragmente der „K.O.-spezifischen Banden“ deutlich. Insbesondere bei der Primerkombination AOX-V-Stop und Lac92 zeigen sich Fragmente, die kürzer und länger sind als das erwartete Amplifikationsprodukt ([B] unten).

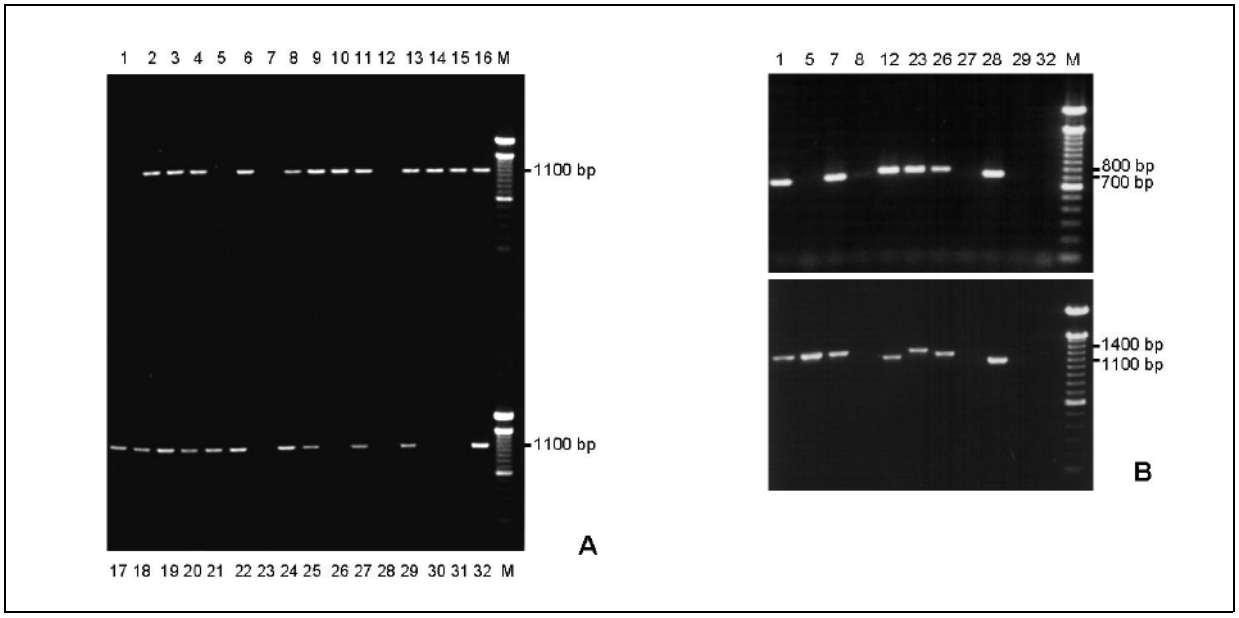


Abb. 19: PCR für die Identifizierung weiterer AOX-K.O.-Mutanten. (A) PCR mit den Primern ANK568AOX und AOX-V-Stop („Wildtypbande“). (B) PCR mit den Primern ANK568AOX und Lac93 (oben) sowie mit den Primern AOX-V-Stop und Lac92 (unten) („K.O. Bande“). Beladung der Spuren: 1 bis 30: Transformanden-PCR-Produkte (184.7.2. bis 184.40.1.); 31 und 32: Produkte einer PCR ohne Template (Kontrolle); 33: Wildtyp-PCR-Produkte.

3.3.4. Untersuchung der AOX-K.O.-Mutanten

3.3.4.1. RT-PCR und Alkoholoxidase-Assay zur Charakterisierung der Transkription und der Translation des AOX-Gens

Nach der Disruption des *AOX*-Gens sollte deren Auswirkung auf der Transkriptionsebene und auf der Translationsebene untersucht werden. Für diese Analyse musste die AOX in *F. graminearum* induziert werden, da vorangegangene Versuche der RT-PCR zeigten, dass es sich hier nicht um ein konstitutiv exprimiertes Gen handelt.

Der Wildtyp von *F. graminearum* sowie die AOX-K.O.-Mutante 184.7.2. wurden zunächst mit Methanol als einzige Kohlenstoffquelle kultiviert. Diese Art der Kultur führte weder beim Wildtyp noch bei der Mutante zu einem Wachstum. Das Wachstum sowie die Induktion konnten jedoch erfolgreich mit zwei Kultivierungsbedingungen erreicht werden, die unter Material und Methoden 2.2.6.5.1. beschrieben sind. Ein Wachstum erfolgte in Nitrogen Base mit Hefeextrakt und Methanol, wobei nur wenig Biomasse entstand. Zu einer hohen Produktion an Myzel führte das Wachstum in Nitrogen Base mit Glucose und einer anschließenden Kultur in Nitrogen Base mit Hefeextrakt und Methanol.

- **RT-PCR**

Die folgende Abb. 20 zeigt die Expression des Gens in den unter Ergebnisse 3.3.3. identifizierten Mutanten sowie im Wildtyp. Für die hierfür durchgeführte RT-PCR wurden ebenfalls Primer eingesetzt, die außerhalb der Zielgensequenz und im K.O.-Vektor binden (vgl. auch Abb. 8). Im Gegensatz zum Primer ANK568AOX wurde hier jedoch der Primer AOX-START eingesetzt. Als Kontrolle für die Qualität sowie die Quantität der eingesetzten mRNA bzw. cDNA wurde eine PCR mit den Primern NJ7 und NJ8 durchgeführt. Diese Primer binden in einem unter Standardkulturbedingungen konstitutiv exprimierten *MAP-Kinase*-Gen aus *F. graminearum.* In allen 11 getesteten Proben zeigt sich hierbei eine gleichmäßige Intensität der im Gel detektierten Fragmente (Abb. 19 [A]). Des weiteren ist in allen drei Teilen der Abb. zu erkennen, dass die PCR Größenunterschiede zwischen genomischer DNA und cDNA aufweist. Dieses resultiert aus dem Vorhandensein von Intronsequenzen.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der PCR mit genomischer DNA (Ergebnisse 3.3.3.) weisen die Proben der dort als K.O.-Mutanten identifizierten Transformanden 184.7.2. (1), 184.16.1. (2), 184.23.1. (4), 184.37.1. (7) und 184.39.1. (9) keine „Wildtypbande“ auf (B). Die Proben des Wildtyps und vier weiterer getesteter Transformanden weisen diese „Wildtypbande“ auf. Umgekehrt verhält es sich in den PCR Reaktionen, die eine „K.O.-spezifische Bande“ generieren sollten (C). Hier weisen die genannten K.O.-Mutanten eine Bande auf; die anderen Transformanden und der Wildtyp nicht. Für die Kontrolle wurde hier die genomische DNA einer ebenfalls als K.O.-Mutante identifizierten Transformande (184.34.1.) eingesetzt.

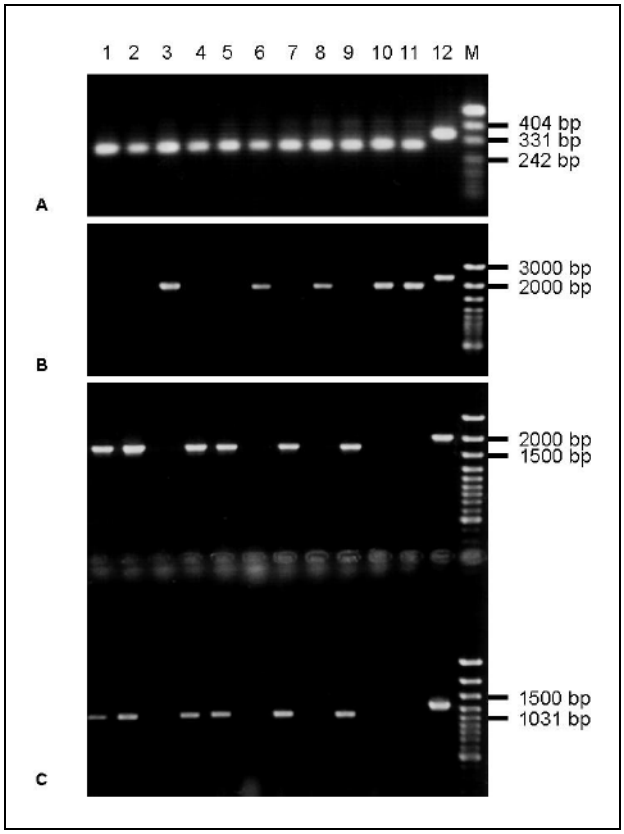


Abb. 20: RT-PCR Reaktionen der unter Ergebnisse 3.3.3. identifizierten AOX-K.O.-Mutanten. (A) Kontroll-PCR: Für die Reaktion wurden die Primer NJ7 und NJ8 eingesetzt, die in einem MAP-Kinase-Gen von *F. graminearum* binden. (B) Die PCR wurde mit den beiden Primern AOX-START und AOX-V-STOP durchgeführt, die außerhalb des Zielgenfragments binden und unter den hier gewählten Bedingungen nur im Wildtypzustand ein Fragment generieren. (C) Die PCR wurde mit den Primern AOX-START und Lac93 (oben) bzw. AOX-V-STOP und Lac92 (unten) durchgeführt. Der Einsatz dieser Primer führt nur dann zu einem Amplifikationsprodukt, wenn es zu einer Integration des Vektors im Zielgen gekommen ist und diese Sequenz Bestandteil des Transkripts ist. 1: 184.7.2. (cDNA); 2: 184.16.1. (cDNA); 3: 184.17.1 (cDNA); 4: 184.23.1. (cDNA); 5: 184.34.1 (cDNA); 6: 184.36.1. (cDNA); 7: 184.37.1. (cDNA); 8: 184.38.1. (cDNA); 9: 184.39.1 (cDNA); 10: 184.40.1. (cDNA); 11: Wildtyp (cDNA); 12: genomische DNA des Wildtyps (A) und (B) bzw. der K.O.-Mutante 184.34.1 (C); M: Marker. Jeweils rechts in den Darstellungen sind die Molekülgrößen angegeben.

- **Enzymassay**

Trotz Integration des Vektors, kam es zur Transkription von Fragmenten des *AOX*-Gens. Mit einem spezifischen Enzymassay sollte daher untersucht werden, ob die Aktivität des Enzyms gehemmt war.

Nach der Induktion mit Methanol wurde ein Rohproteinextrakt aus Myzel von *F. graminearum* erstellt. Aus jeweils 400 mg Myzel (Frischgewicht) konnten hierbei ca. 450 µg Gesamtprotein in einer durchschnittlichen Konzentration von 0,9 µg/µl gewonnen werden.

In einem Vorversuch wurde zunächst nur der Wildtyp von *F. graminearum* auf seine Alkoholoxidase-Aktivität hin untersucht (Abb. 21).

Die Kultur in Nitrogen Base mit Glucose als einzige Kohlenstoffquelle führte nicht zur Induktion der Alkoholoxidase. Wurde *F. graminearum* hingegen in Nitrogen Base mit einem geringen Zusatz von Hefeextrakt und Methanol als einzige Kohlenstoffquelle kultiviert, so kam es zu einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität. Die Kultivierung in Nitrogen Base mit einem Zusatz an Hefeextrakt, ohne Methanol, führte nicht zur Induktion der Alkoholoxidase. Erfolgte eine Vorkultur in Nitrogen Base mit Glucose als Kohlenstoffquelle und erst durch Überführung in ein methanolhaltiges C-Mangelmedium die anschließende Induktion der Alkoholoxidase, so stieg die Enzymaktivität nach 20 h um ein weiteres an.

Für die weiteren Versuche des Enzymassays wurden zunächst die Rohproteinextrakte der K.O.-Mutanten (184.7.2., 184.16.1., 184.23.1., 184.37.1. und 184.39.1.) sowie der Transformanden mit ektopischer Integration des Vektors (184.17.1., 184.36.1., 184.38.1.,

184.40.1.) und des Wildtyps eingesetzt. Zusätzlich wurde jeweils eine Kontrolle ohne Rohproteinextrakt durchgeführt. Da die Lagerung der Rohproteinextrakte bei -20 °C zu einer Einbuße der Aktivität führte, erfolgte die Durchführung mit jeweils frisch hergestellten Proteinextrakten.

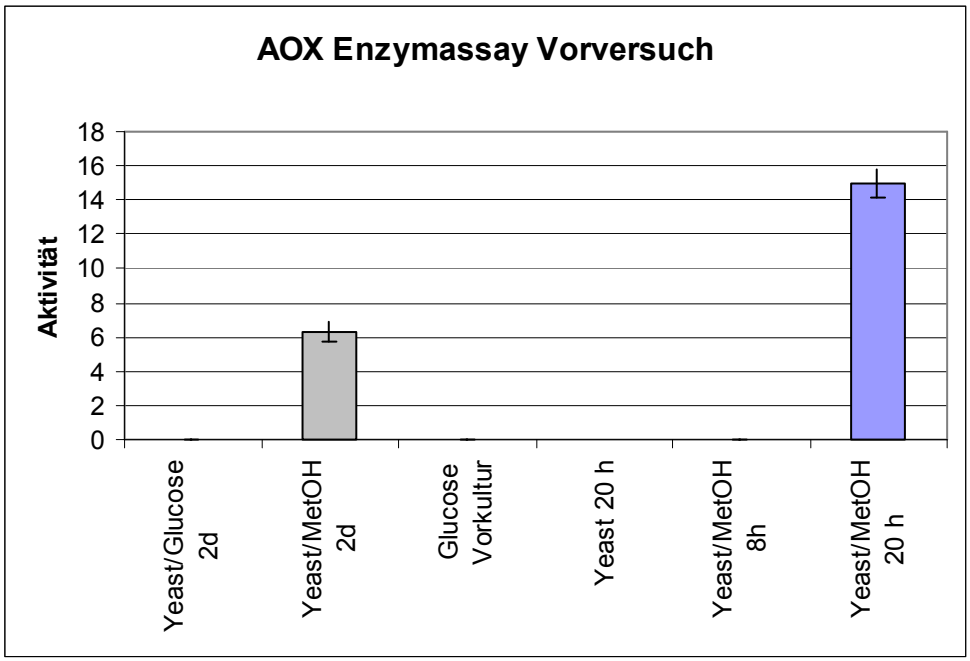


Abb. 21: Enzymaktivtäten verschiedener Rohproteinextrakte von *F. graminearum* gegen das Substrat Methanol. Aktivität: Umsatz an Methanol [µM] pro mg Gesamtprotein pro min. Yeast/Glucose 2d: *F. graminearum* wurde in Nitrogen Base mit 0,05 % Hefeextrakt und 1 % Glucose für zwei Tage kultiviert; Yeast/MetOH 2d: *F. graminearum* wurde in Nitrogen Base mit 0,05 % Hefeextrakt und 1% Methanol für zwei Tage kultiviert. Glucose Vorkultur: *F. graminearum* wurde in Nitrogen Base mit 1 % Glucose für 2 Tage kultiviert; Yeast 20 h: Nach der Kultivierung in Nitrogen Base mit 1 % Glucose wurde das Myzel von *F. graminearum* zweimal mit H_2O gewaschen und für 20 Stunden in Nitrogen Base mit 0,05 % Hefeextrakt kultiviert; Yeast/MetOH 8 h: Nach der Kultivierung in Nitrogen Base mit 1 % Glucose wurde das Myzel von *F. graminearum* zweimal mit H_2O gewaschen und für 8 Stunden in Nitrogen Base mit 0,05 % Hefeextrakt und 1 % Methanol kultiviert; Yeast/MetOH 20 h: Nach der Kultivierung in Nitrogen Base mit 1 % Glucose wurde das Myzel von *F. graminearum* zweimal mit H_2O gewaschen und für 20 Stunden in Nitrogen Base mit 0,05 % Hefeextrakt und 1 % Methanol kultiviert.

Der Wildtyp sowie die Transformanden 184.17.1., 184.36.1., 184.38.1. und 184.40.1. weisen eine AOX-Aktivität (angegeben in Umsatz des Alkohols in µM pro mg Gesamtprotein) gegenüber Methanol als Substrat auf (Abb. 22). Die als K.O.-Mutanten identifizierten Transformanden sowie die Kontrolle ohne Proteinextrakt zeigen keinerlei Aktivität.

Weitere Versuche wurden mit dem Wildtyp sowie mit den Transformanden 184.7.2. (K.O.-Mutante), 184.17.1. (ektopische Integration, Kontrolle) und 184.36.1. (ektopische Integration, Kontrolle) durchgeführt. In diesen Versuchen wurde die Aktivität der Alkoholoxidase gegen die Alkohole Methanol, Ethanol, Propanol, Butanol, Isoamylakohol, Benzylakohol, Zimtalkohol, Salicylalkohol und Glycerol sowie das ebenfalls eine OH-Gruppe

tragende Substrat Essigsäure untersucht, um die Spezifität der AOX aus *F. graminearum* näher zu charakterisieren.

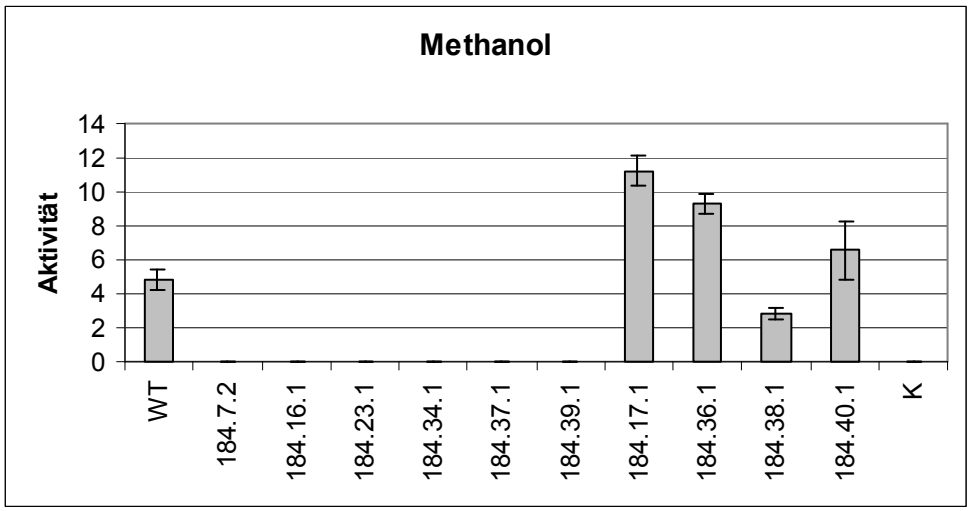


Abb. 22: Aktivität der Alkoholoxidase in den Rohproteinextrakten des Wildtyps und verschiedener Transformanden von *F. graminearum* gegenüber dem Alkohol Methanol. Aktivität: Umsatz an Methanol [µM] pro mg Gesamtprotein pro min. WT: Wildtyp; 184.7.2 bis 184.40.1: Transformanden; K: Kontrolle ohne Proteinextrakt.

Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Abb. 24 dargestellt. Ein sehr hoher Umsatz des Substrates war mit den Alkoholen Methanol und Ethanol für den Wildtyp und die ektopischen Mutanten detektierbar (vgl. auch Tab. 3). Auch mit den Alkoholen Propanol und Butanol zeigten die Proteinextrakte des Wildtyps und der beiden ektopischen Mutanten eine messbare AOX-Aktivität. Für Isoamylalkohol war nur eine sehr geringe Aktivität der beiden ektopischen Mutanten detektierbar. Im Falle des Benzylalkohols dürfte ein anderes Enzym für die detektierbare Reaktion verantwortlich sein, da hier alle getesteten Proteinextrakte, auch die der K.O.-Mutanten, deutliche Werte zeigten. Zimtalkohol sowie Salicylalkohol wurden unter den gewählten Bedingungen nicht umgesetzt.

Essigsäure, als Nichtalkohol, wurde in allen Proben umgesetzt, wobei auch hier der Umsatz mit dem Wildtyp-Proteinextrakt am geringsten war. Glycerol wurde nur geringfügig durch die Extrakte der ektopischen Mutanten umgesetzt.

Die Abb. 23 zeigt die Ergebnisse einiger in den Diagrammen der Abb. 24 dargestellten Versuche in der Farbreaktion. Hierbei sind die Farbreaktionen nach Abschluß des Experiments zu sehen, wobei die Differenz der Absorption vor Zugabe des Substrates zu der Endabsorption für die Bestimmung der Aktivität berücksichtigt wurde. Zu beachten ist, dass es in einigen Fällen bei einer nicht vorhandenen Aktivität im Verlauf des Experiments zu einem Abbau der detektierbaren ABTS-Kationen kam. Die in diesen Fällen erhaltenen negativen Endwerte wurden als Null angenommen (Bsp. Abb. 23 [A]: 184.16.1. und 184.23.1.).

Tab. 3: In der Tabelle sind die Werte der im Text beschriebenen Versuche der AOX-Aktivitäts-Tests aufgelistet. Die Werte sind des weiteren in der Abb. 24 grafisch dargestellt (Ausnahme: Spalte „ohne Substrat"). K.O.: AOX-K.O.-Mutante (184.7.2); Ektop A: Ektopische Mutante (184.17.1); Ektop B: Ektopische Mutante (184.36.1)

	umgesetztes Substrat [µM] pro mg Protein pro min										
Probe	**Methanol**	**Ethanol**	**Propanol**	**Butanol**	**Isoamyl-alkohol**	**Benzyl-alkohol**	**Zimt-alkohol**	**Salicyl-alkohol**	**Glycerol**	**Essig-säure**	**ohne Substrat**
Wildtyp	87,5	118,5	3,3	15,5	0,2	13,8	0,0	0,0	0,4	14,3	0,0
K.O.	0,6	0,4	0,6	0,5	0,2	13,1	0,0	0,0	0,1	32,5	0,5
Ektop A	161,8	265,4	12,9	23,3	5,4	15,4	0,0	0,5	4,4	34,5	0,4
Ektop B	78,0	165,0	6,3	20,6	2,7	16,0	0,0	0,1	3,7	38,9	0,1
Kontrolle	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

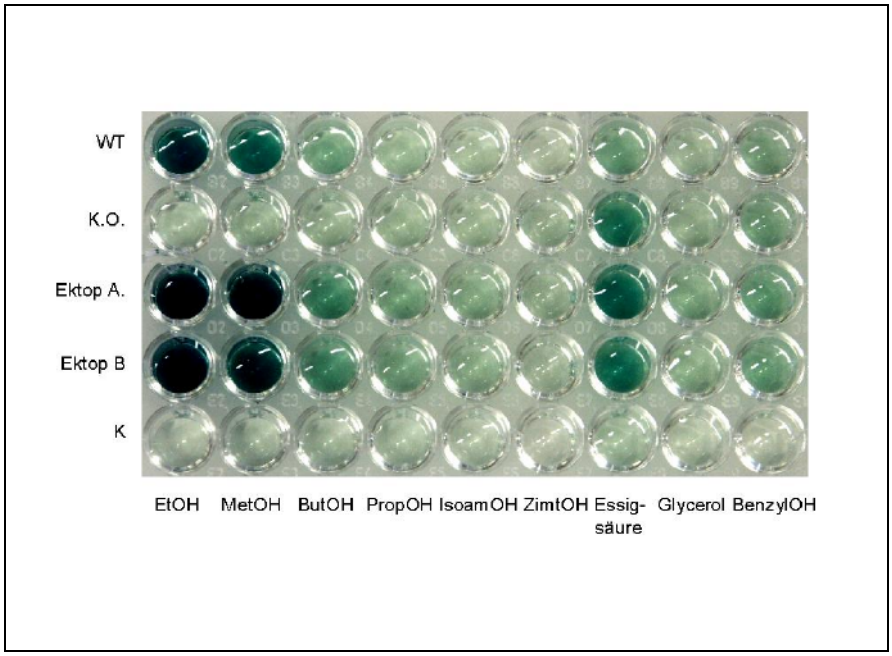


Abb. 23: AOX-Assays in seiner Farbreaktion nach Ende der jeweiligen Versuche. WT: Wildtyp; K.O.: 184.7.2.; Ektop A: 184.17.1; Ektop B: 184.36.1; K: Kontrolle (keine Proteinextrakt); EtOH: Ethanol; MetOH: Methanol; ButOH: Butanol; PropOH: Propanol; IsoamOH: Isoamylalkohol; ZimtOH: Zimtalkohol; BenzylOH: Benzylalkohol.

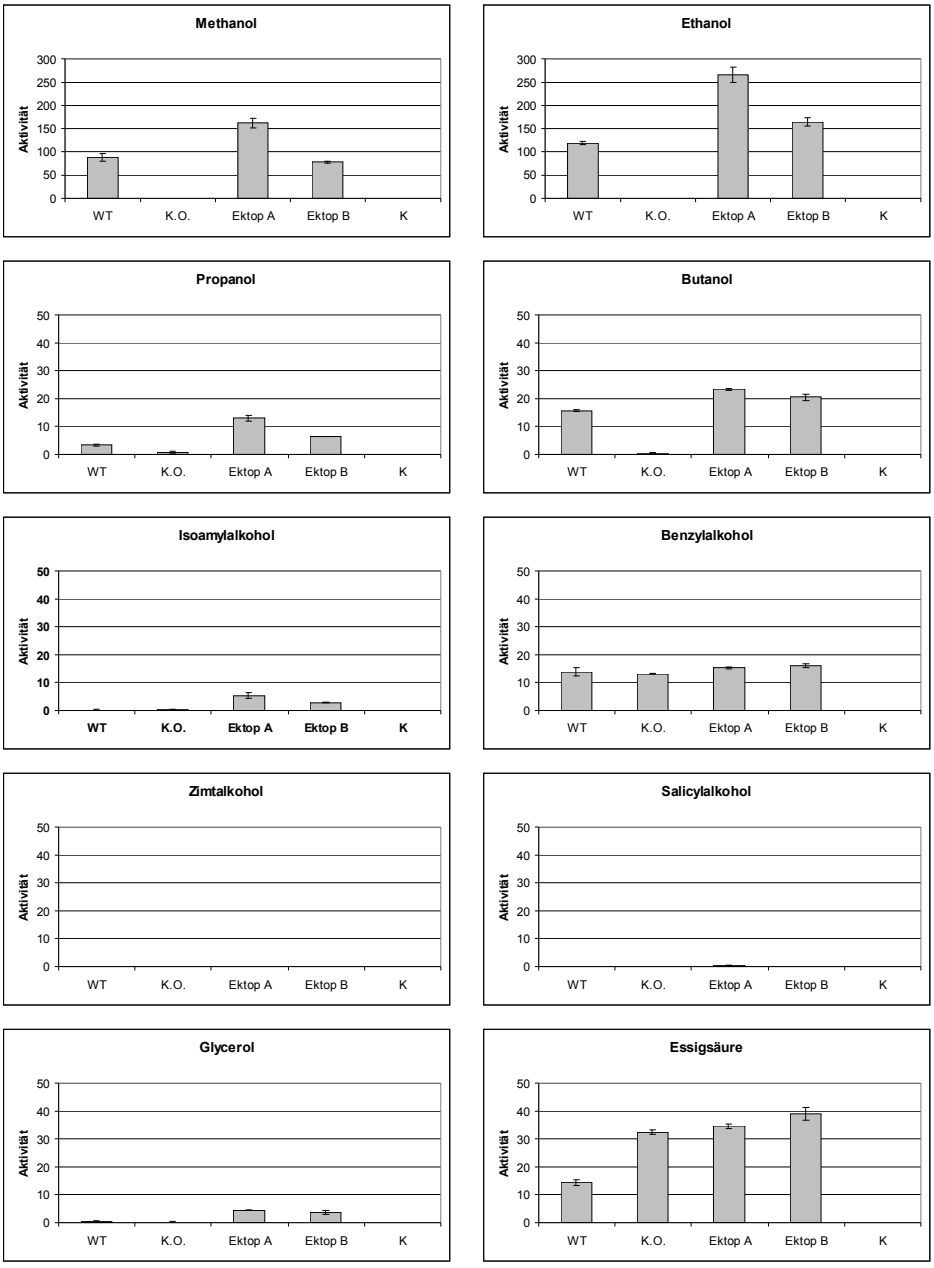


Abb. 24: Enzymaktivität der Rohproteinextrakte von *F. graminearum* gegenüber verschiedenen Substrate. WT: Wildtyp; K.O.: AOX K.O.-Mutante (184.7.2); Ektop A: Ektopische Mutante (184.17.1); Ektop B: Ektopische Mutante (184.36.1); K: Kontrolle ohne Proteinextrakt. Aktivität: Umsatz an Substrat [µM] pro mg Gesamtprotein pro min.

3.3.4.2. Wachstumsverhalten

Die im AOX-Gen disruptierten Mutanten verhielten sich im Wachstum auf verschiedenen Medien (YPG-Medium, CM-Medium, Czapek-Medium, YG-Medium, Corn Meal Agar und LB-Medium, vgl. Ergebnisse 3.4.3.4.) wie der Wildtyp von *F. graminearum*. Auch das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen (12 °C bis 42 °C) war vergleichbar mit dem des Wildtyps (vgl. auch Ergebnisse 3.4.3.6.).

3.3.4.3. Analyse des AOX-Gens von Fusarium graminearum während der Weizeninfektion

3.3.4.3.1. RT-PCR

Mit der unter Ergebnisse 3.2.3.9.3. beschriebenen cDNA, der eine Infektion von Weizenähren für 4 h, 12 h, 24 h, 48 h und 7 d zugrunde lag, wurde die zuvor beschriebene Kontroll-PCR mit den Primern FgBetaTubF und FgBetaTubR sowie eine PCR zur Expressionsstudie des AOX-Gens mit den Primern AOXINF1 und AOXINR1 durchgeführt.

Abb. 25 zeigt im unteren Bild das Ergebnis der RT-PCR mit den Tubulin-Primern, wobei in der zweiten Spur von rechts das Amplifikationsprodukt der genomischen DNA aufgetragen ist. In den Spuren links davon wurden die Produkte der cDNA aufgetrennt. Im oberen Bild der Abb. 25 sind in gleicher Reihenfolge die Amplifikationsprodukte dargestellt, die unter Einsatz der Primer AOXINF1 und AOXINR1 generiert wurden. Diese Primer führten zu einem Fragment der Größe von 732 bp (genomische DNA) bzw. 683 bp (cDNA). Der geringe Längenunterschied zwischen den Produkten der genomischen DNA und der cDNA zeigt, dass es sich in den ersten Spuren um cDNA und nicht um Kontaminationen von genomischer DNA handelt. Weitere Versuche mittels RT-PCR zeigten, dass der früheste Zeitpunkt der Expression des AOX-Gens bei 48 h lag (Daten hier nicht gezeigt). Der Nachweis des β-Tubulin-Fragments erfolgte hingegen bereits nach 12 h (vgl. Abb. 37, Ergebnisse 3.4.3.8.3.).

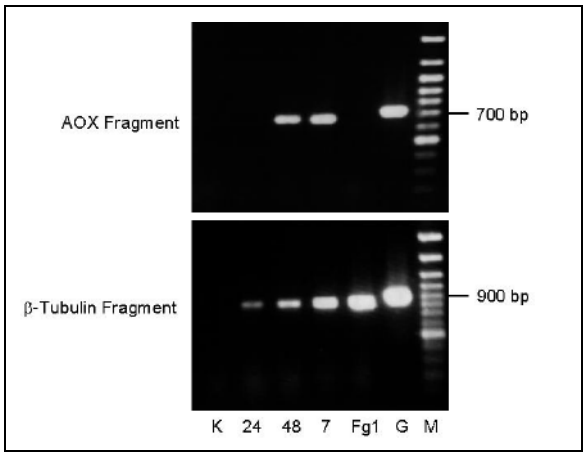


Abb. 25: RT-PCR mit cDNA, welche aus infiziertem Gewebe resultiert. Im oberen Gelbild sind die PCR-Produkte aufgetragen, die mit den Primern AOXINF1 und AOXINR1 amplifiziert wurden. Im unteren Gelbild sind die Produkte einer PCR aufgetragen, die mit den Primern FgBet-TubF und FgBetaTubR durchgeführt wurde. K: Wasserkontrolle (nicht infizierte Ähre); 24: Infektion nach 24 h; 48: Infektion nach 48 h; 7: Infektion nach 7 d; Fg1: CM-Kultur von *F. graminearum;* G: genomische DNA von *F. graminearum*; M: DNA Längenstandard.

3.3.4.3.2. Infektion von Weizen

Abb. 26 zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Infektionsversuchen, die nach 25 (A) bzw. nach 20 Tagen (B) ausgewertet wurden. Es ist zu erkennen, dass es sowohl beim Wildtyp als auch bei den AOX-K.O.-Mutanten sowie den ektopischen Transformanden zu einer Ausbreitung der Infektion vom Inokulationspunkt aus gekommen ist. Die Disruption des AOX-Gens scheint somit keine Auswirkung auf die Pathogenität des Pilzes zu haben. In der Teilabbildung B hat sich das Schadbild der Infektion, die sogenannte Taubährigkeit, noch nicht über die gesamte Ähre ausgebreitet. In der Teilabbildung A sind die Ähren komplett betroffen.

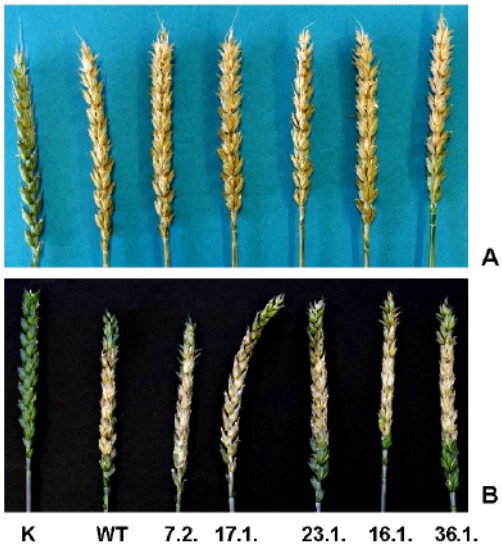


Abb. 26: Ähreninfektionsversuche mit *F. graminearum*. (A) Infektion nach 25 Tagen. (B) Infektion nach 20 Tagen. Je Ähre wurden zwei Ährchen mit je 1000 Konidien inokuliert. Die Ähren wurden 3 Tage eingetütet, um eine hohe relative Luftfeuchtigkeit während der Primärinfektion zu gewährleisten. Anschließend wurden die Pflanzen unter Aufzuchtbedingungen (Punkt 2.2.1.) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90 % gehalten. WT: Wildtyp von *F. graminearum*; K: Wasserkontrolle; 7.2.: 184.7.2. (AOX-K.O.-Mutante); 17.1.: 184.17.1. (ektopische AOX Transformande); 23.1.: 184.23.1. (AOX-K.O.-Mutante); 16.1.: 184.16.1. (AOX-K.O.-Mutante); 36.1.: 184.36.1. (ektopische AOX Transformande).

3.4. Die Polyketidsynthase von *Fusarium graminearum*

3.4.1. Sequenz für die Generierung der PKS-K.O.-Vektoren

Mit den degenerierten Primern LC1 und LC2c wurde ein 835 bp großes Fragment aus genomischer DNA von *F. graminearum* amplifiziert in den Vektor pGEM®-T ligiert und sequenziert (Abb. 53 im Anhang). Hierdurch entstand der Vektor pGEM-T/PKSFg-59. Durch die Restriktion mit *Pvu*II, für welches vor und hinter der Klonierungsstelle von pGEM®-T jeweils eine Erkennungsstelle liegt, wurde ein 1271 bp großes Fragment aus dem Vektor herausgeschnitten. Dieses Fragment wurde dann in den mit *Ehe*I linearisierten pAN7-1 Vektor ligiert. Es entstand der in Abb. 10 gezeigte Vektor pAN7-1/PKSFg-59. In der Abb. 53 sind, neben den Primern LC1 und LC2c, die für die Generierung der K.O.-Vektoren

pAN7-1/PKS100.1.12, pAN7-1/PKS200.1.20, pAN7-1/PKS300.1.16 und pAN7-1/PKS500.2.25 eingesetzten Primer dargestellt.

Der in dieser Sequenz liegende offene Leserahmen zeigt eine signifikante Homologie zu den β-Ketoacylsynthase-Domänen der PKS-Gene anderer Organismen. Die putative Aminosäuresequenz und ihre Homologie zu weiteren PKS-Genen wird in der Abb. 54 des Anhangs dargestellt.

3.4.2. Vollständige Sequenz des *PKS*-Gens

Durch eine Inverse PCR mit den Primern iPKS1 bis 2b sowie drei sich anschließende Durchgänge der TAIL-PCR (einmal in Richtung des 5‘-Bereichs, zweimal in Richtung des 3‘-Bereichs) mit den Primern FJM-tail-AD1 bis -9 und tailPKS1c bis -2h konnte die genomische Sequenz, die das PKS-Gen aus *F. graminearum* beinhaltet, bis auf 6727 bp erweitert werden.

Die Suche nach Homologien in der vorliegenden cDNA-Bank führte zu einem Fragment, welches über 396 bp zum 3‘-Bereich der genomischen DNA zu 100 % identisch war. Nach der kompletten Sequenzierung des die EST-Sequenz enthaltenden Inserts konnte das vollständige 3‘-Ende der cDNA, bis zum Poly(A)Schwanz, abgeleitet werden. Basierend auf dieser cDNA-Sequenz wurde der entsprechende Bereich der genomischen DNA durch die BASF AG mit den Primern Lac 197 und Lac 198 amplifiziert und sequenziert.

Die erhaltene Sequenz des PKS-Gens betrug, inklusive des nichttranslatierten 5‘- und 3‘-Bereichs, 7342 bp. Der Bereich der codierenden Sequenz wies eine Länge von 6478 bp auf.

Basierend auf den Sequenzinformationen über die genomische DNA wurden, unter Einsatz der RT-PCR mit den Primerkombinationen PKS-V-Start und PKS R 600 sowie PKS-N-Stop und PKS F 600 (siehe auch Abb. 55 des Anhangs), aus der cDNA von *F. graminearum* zwei Fragmente der Länge von 1915 bp und 4864 bp amplifiziert. Diese einander überlappenden Fragmente konnten abschließend zu einem 6296 bp großen Contig verknüpft werden (hier nicht gezeigt).

Das Gesamtfragment der genomischen DNA sowie die von der cDNA abgeleitete Translation in das putative Protein der PKS ist in der Abb. 55 des Anhangs dargestellt. In der Abbildung sind die mögliche TATA-Box, das Start-Codon, das Stop-Codon, ein mögliches Polyadenylierungssignal und die Polyadenylierungsstelle sowie die Intronbereiche des Genes (abgeleitet aus der cDNA-Sequenz) markiert. Des weiteren sind die konservierten Bereiche der bereits aufgeführten β-Ketoacylsynthase-Domäne sowie einer Acetyltransferase-Domäne, einer Acylträgerprotein-Domäne und einer Thioesterase-Domäne gekennzeichnet. Die genannten Domänen sind charakteristisch für pilzliche Polyketidsynthasen (Mayorga und Timberlake, 1992; Koshla et al., 1999; Lal et al., 2000; Feng et al., 2001; Linnemannstöns et al., 2002) und werden in Abb. 27 nochmals dargestellt. Ferner zeigt

die Abb. 55 auch die für die Vervollständigung der Sequenz verwendeten Primer der Inversen PCR (iPKS1 bis –2b) und der TAIL-PCR (tailPKS1c bis –2h) sowie die Primer Lac 197 und Lac 198. Auch die Bindungsstellen der für die RT-PCR genutzten Primer (PKS-V-Start und PKS R 600 sowie PKS-N-Stop und PKS F 600) sind hier gekennzeichnet. Das ursprüngliche PKS Fragment mit einer Länge von 835 bp (genomische DNA) ist markiert.

Die anfängliche Amplifikation eines Fragments mit den Primern LC1 und LC2c sollte nach Bingle et al. (1999) zu PKS-Genen des wA-Typs (nach dem *wA*-Gen aus *Aspergillus nidulans*, Mayorga und Timberlake, 1992) führen, die generell in die Biosynthesewege von Pigmenten und Aflatoxinen involviert sind. Wie weiter unten beschrieben wird, führte die Disruption des PKS-Gens in *F. graminearum* zum Verlust eines roten Pigments. Das in *F. graminearum* identifizierte Gen wurde deshalb zunächst mit dem *wA*-Gen aus *A. nidulans* verglichen. Des weiteren erfolgte ein Homologievergleich mit einem für die Melanin-Biosynthese von *Wangiella dermatitidis* verantwortlichen PKS-Gen (*WdPKS1*, Feng et al., 2001). Das Ergebnis eines Homologievergleiches dieser Gene mit einem Teil der PKS-Sequenz aus *F. graminearum* ist bereits in Abb. 54 dargestellt. Nachdem, neben dem offensichtlichen Pigmentverlust der PKS-K.O.-Mutante, auch ein Defizit in der antimikrobiellen Wirkung gegen verschiedene Bakterien und Pilze (siehe Ergebnisse 3.4.3.9.3.) festgestellt wurde, fand auch der Vergleich mit einem für die Bikaverin-Synthese verantwortlichen PKS-Gen aus *Gibberella fujikuroi* statt (*pks4*, Linnemannstöns et al., 2002). Ein Alignment der gesamten PKS-Sequenz aus *F. graminearum* mit den genannten Genen zeigt die Abb. 55 des Anhangs.

3.4.3. Disruption des *PKS*-Gens von *Fusarium graminearum*

3.4.3.1. Linearisierter Vektor

Nach der beschriebenen Methode der Transformation erfolgte unter Einsatz des mit *Eco*47III linearisierten Vektors pAN7-1/PKSFg-59 die Integration des K.O.-Vektors im Zielgen. Hierbei konnten bis zu 100 Transformanden generiert werden. Von insgesamt über 400 erzeugten Transformanden wurden 34 Klone nach Vereinzelung der Konidien in der Southern-Blot-Analyse getestet. Diese 34 Transformanden wurden zunächst zufällig ausgewählt. In der folgenden Abb. 28 ist exemplarisch das Autoradiogramm einer Southern-Blot-Analyse mit 15 der 34 Transformanden dargestellt. Nach der Hybridisierung der DNA mit einer Sonde, die der 835 bp großen Sequenz aus dem Vektor pGEM-T/PKSFg-59 entspricht, ist zu erkennen, dass es bei allen hier analysierten Transformanden zur Integration des K.O.-Vektors gekommen ist. Durch die Integration im Zielgen vergrößert sich die Molekülmasse des detektierten *Nru*I-Fragments um die Größe des Vektors pAN7-1 (6756 bp). Die Molekülgröße wurde anhand eines nicht DIG-markierten DNA Längenstandards unter Vergleich des Autoradiogramms und des hier nicht gezeigten Agarosegels vorgenommen. Kam es zur Einzelintegration, so erhöhte sich die Molekülgröße von ca. 2500 bp beim Wildtyp auf ca. 9500 bp bei den Transformanden. Bei einer Mehrfachin-

tegration des Vektors, wozu es ebenfalls in wenigen Fällen kam (Spur 11, 14 und 15), erhöhte sich die Molekülgröße um ein weiteres. Aufgrund der geringeren Auftrennung im hochmolekularen Bereich ist der Unterschied zwischen einer Einzel- und einer Mehrfachintegration nicht so gravierend wie zwischen dem Wildtypzustand und der Einzelintegration.

β-Ketoacylsynthase Domäne (enthält das DXAC Motiv des aktiven Zentrums)	*F. graminearum*	RLNYFFKFSGPSASV**DTAC**SSSLVGLHLA
	G. fujikuroi	RVNYFFKFTGPSIAV**DTAC**SSSLAAINLA
	W. dermatidis	RINYFFKFSGPXFSV**DTAC**SSSLAAMNVA
	A. nidulans	RINYYFKFSGPSVSV**DTAC**SSSLAAIHLA
		*:**:***:** :*********.::::*
Acyltransferase Domäne (enthält das GXSXG Motiv des aktiven Zentrums)	*F. graminearum*	GVEPGFVL**GHSLG**HYA
	G. fujikuroi	GITPQYVI**GHSLG**EYA
	W. dermatidis	GIQPSVVI**GHSLG**EYA
	A. nidulans	GITPSFVL**GHSLG**DFA
		*: * *:*****.:*
Acylträgerprotein Domäne (enthält das Motiv GXDS des aktiven Zentrums)	*F. graminearum*	DDELDFADH**GVDS**LLSLTIT
	G. fujikuroi	DT-TLLADL**GVDS**LMSLTIL
	W. dermatidis	DD-IQWADM**GVDS**LMSLTIS
	A. nidulans	DD-LVFADY**GVDS**LLSLTVT
		* ** *****:***:
Thioesterase Domäne (für dies Domäne ist kein aktiver Rest beschrieben)	*F. graminearum*	ILRRKPQGPYNLGGWSAGG
	G. fujikuroi	VRRRQPQGPYHLAGWSAGG
	W. dermatidis	IRRRQPTGPYNLGGWSQAG
	A. nidulans	VLXRQPNGPYILXGWSASG
		: *:* *** * *** .*

Abb. 27: Alignments der möglichen aktiven Domänen der PKS von *F. graminearum* mit denen weiterer Polyketidsynthasen des Typs I. Die konservierten Aminosäuren, die für die Enzymaktivitäten wichtig sind, wurden durch Fettbuchstaben markiert (nach Feng et al. 2001). Zeichen in der Consensusreihe: *, identische Aminosäuren in allen Sequenzen des Alignments; :, konservierte Substituenten; ., semikonservierte Substituenten.

Weitere (nicht gezeigte) Southern-Blot-Analysen bestätigten das in dieser Untersuchung erzielte Ergebnis. Die legitime homologe Rekombination im Zielgen erfolgte hierbei zu annähernd 100 %. Eine illegitime Rekombination außerhalb des Zielgens (ektopische Integration) fand nicht statt. Es kam lediglich in sehr geringen Einzelfällen zur Weiterkultivierung „falsch positiver“ Transformanden, bei denen keine Integration des Vektors im Genom erfolgte. In diesen Transformanden kam es wahrscheinlich zu einer transienten Expression des *hph*-Gens.

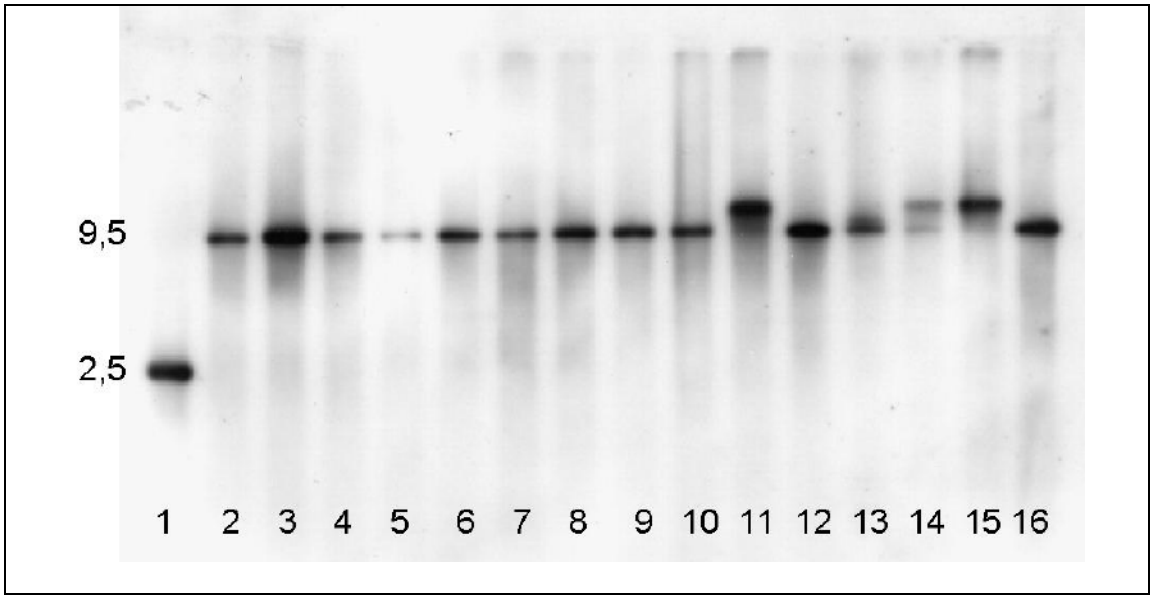


Abb. 28: Autoradiogramm einer Southern-Blot-Analyse nach der Transformation von *F. graminearum* mit dem Vektor pAN7-1/PKSFg-59 (linearisiert). Die genomische DNA wurde mit *Nru*I verdaut. Je Spur wurden 7 µg DNA aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem 1 %igem Agarose Gel. Die Hybridisierung erfolgte mit dem in Abb. XYZ dargestellten 835 bp großen Teilfragment der PKS aus *F. graminearum*. Spur 1: Wildtyp DNA von *F. graminearum* , Spur 2 bis 16: DNA von zufällig ausgewählten Transformanden (2: 21.2.G.; 3: 21.6.; 4: 30.1.; 5: 30.2.G.; 6: 31.1.A.; 7: 31.9.G.; 8: 31.10.; 9: 31.12.S.; 10: 31.17.G.; 11: 31.20.G.; 12: 32.1.G.; 13: 32.10.G.; 14: 32.11.S.; 15: 32.19.G.; 16: 32.36.) Links im Bild sind die ungefähren Molekulargrößen in kb angegeben.

3.4.3.2. Zirkulärer Vektor

Im Vergleich zur Transformation mit einem linearisierten Vektor wurde pAN7-1/PKSFg-59 auch ungeschnitten für die Transformation eingesetzt. Hierbei konnten maximal fünf Transformanden je Transformation regeneriert werden. Es erfolgte die Southern-Blot-Analyse von vier Transformanden (Abbildung nicht gezeigt). Diese zeigte, dass es in drei Fällen zur Einzelintegration des Vektors im Zielgen gekommen ist. In einem Fall erfolgte eine ektopische Rekombination.

Die Auswahl, der in dieser Southern-Blot-Analyse untersuchten Transformanden, erfolgte nicht zufällig. Wie im nächsten Punkt näher beschrieben, resultierte aus der erfolgreichen Disruption des PKS-Gens der Verlust eines Pigments. Die Auswahl erfolgte somit nach der Farbe der *Fusarium*-Kultur. Die K.O.-Transformanden hatten eine weiße bis hellbeige Färbung auf CM-Medium; die Transformande mit der ektopischen Integration, wie auch der Wildtypstamm, zeigten eine dunkelrote Färbung (vgl. auch Abb. 29).

Zusammenfassend ist zu erkennen, dass es beim Einsatz des zirkulären Vektors zu einer niedrigeren Transformationsrate kommt. Die homologe Integration im Zielgen liegt jedoch auch hier mit 75 % der getesteten Transformanden sehr hoch. Auch die nicht in der Southern-Blot Analyse untersuchten zwei Transformanden waren weiß, was zu einer Rate der homologen Integration im Zielgen von 83 % führt.

3.4.3.3. Verlust der Pigmentierung auf CM-Medium

Die Disruption des *PKS*-Gens führt zu einem Verlust der roten Pigmentierung von *F. graminearum* (Abb. 29). Diese Beobachtung bestätigte den Hinweis von Bingle et al. (1999), dass die mit den LC1/LC2c amplifizierten Fragmente Genen der PKS des wA-Typs entstammen, die häufig in der Pigment-Biosynthese eine Rolle spielen.

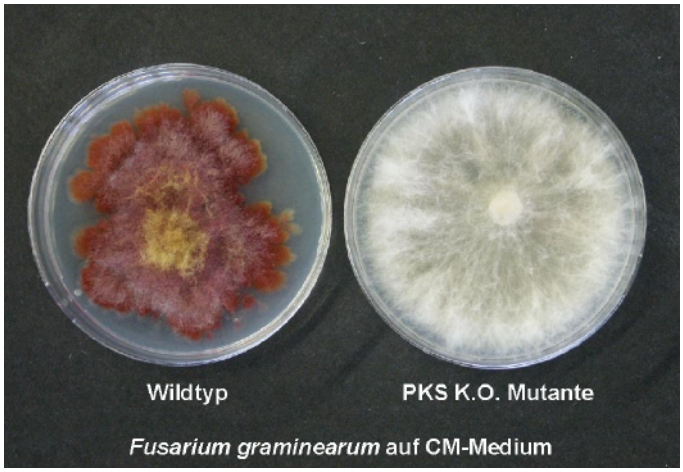


Abb. 29: *Fusarium graminearum* wurde sieben Tage bei 28 °C auf CM-Festmedium kultiviert. Links der Wildtyp, rechts eine Transformande, die im PKS-Gen disruptiert ist (31.1.A.).

Der deutliche Verlust des Pigments machte die Transformation mit dem PKS-K.O.-Vektor zu einer idealen Positivkontrolle, da die erfolgreiche Disruption des Gens sehr leicht optisch, ohne den Einsatz aufwendigerer molekularbiologischer Detektionsmethoden, zu erkennen war. Im Laufe der Etablierung des Transformationssystems wurden über 400 PKS-Transformanden erzeugt. Von diesen wurden 38 in der Southern-Blot-Analyse getestet. Bei den dort untersuchten weißen Transformanden war immer eine legitime Einzelintegration des K.O.-Vektors im Zielgen erfolgt. Waren die Kolonien rot, so handelte es sich um Transformanden mit vermutlich transienter Expression des *hph*-Gens oder ektopischer Integration außerhalb des Zielgens. Aufgrund dieser Beobachtungen wurden weitere 175 Transformanden, die nach Einsatz des linearisierten Vektors generiert wurden, auf ihre Einfärbung hin untersucht. Von den ausgewerteten 175 Transformanden zeigten 156 auf CM-Medium eine helle und 19 eine dunkelrote Färbung. Diese Verteilung entsprach einer Rate von 89 % an homologer Rekombination im Zielgen. Sollte sich die Beobachtung aus den Southern-Blot-Analysen bestätigen, dass es bei Einsatz des linearisierten Vektors pAN7-1/PKSFg-59 nicht zu ektopischen Integrationen kommt, so würde die Rate der legitimen homologen Integration bei 100 % liegen. Dieser Aspekt wurde jedoch nicht weiter verfolgt, da eine Rate von 89 % für das mit dieser Arbeit verknüpfte Projekt als hinreichend hoch erachtet wurde.

3.4.3.4. Pigmentierung und Wachstum

Der Mangel einer Pigmentierung auf CM-Medium schien mit einer Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit der PKS-K.O.-Mutante einherzugehen. Um dies zu untersuchen, wurden beide Stämme (Wildtyp und Mutante) auf weiteren Medien kultiviert, da aufgefallen war, dass es sowohl auf CM-Medium (Abb. 29) als auch auf YPG-Medium zur starken Ausprägung der Pigmentierung kam (Abb. 30 A). Die Kultivierung auf Stärke-Agar zeigte hingegen nur eine leichte Pigmentierung (Abb. 30 B). Wurde *F. graminearum* auf YG-Medium kultiviert, zeigte sich keine Pigmentierung (Abb. 30 C).

Der Wildtyp von *F. graminearum* zeigte auf YPG-Medium, ähnlich wie auf CM-Medium, unter Bildung des roten Pigments einen Wachstumsnachteil gegenüber der hellen PKS-K.O.-Mutanten. In diesem Fall wuchs der Wildtyp zeitverzögert, jedoch ebenfalls bis zum Plattenrand. Auf CM-Medium erreichte der Wildtyp den Plattenrand nicht (Abb. 29). Auf Stärke-Agar war der Unterschied im Wachstum kaum sichtbar, auch die Pigmentierung des Wildtyps war nicht so sehr ausgeprägt, wie auf CM-Medium. Auf YG-Medium zeigte sich, bei gleichzeitiger Nichtbildung von Pigmenten, kein Unterschied mehr.

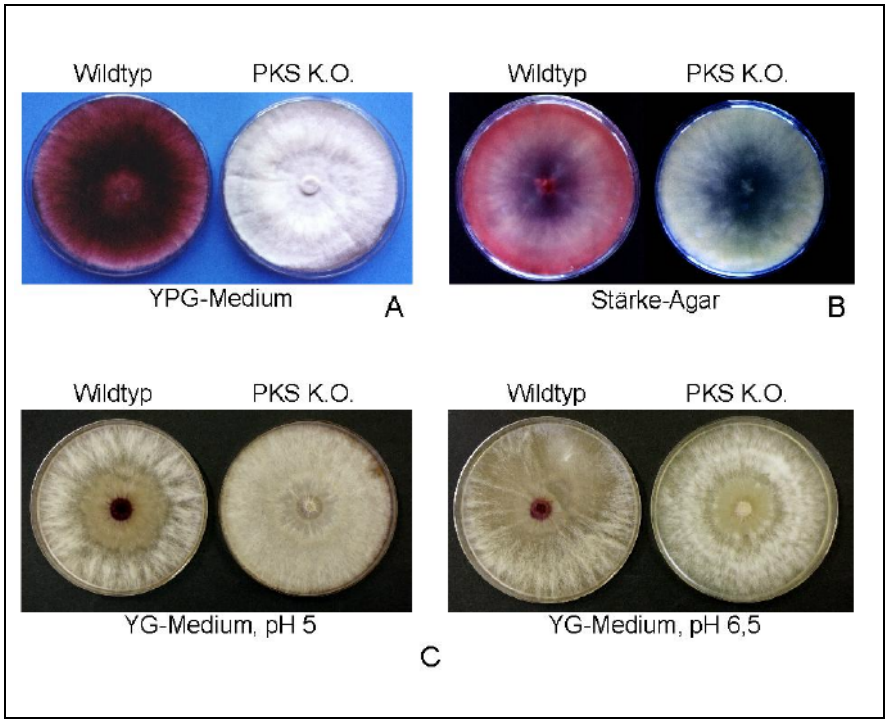


Abb. 30: *Fusarium graminearum* wurde für sieben Tage bei 28 °C auf Festmedium kultiviert. (A) YPG-Medium, (B) Stärke-Agar, (C) YG-Medium (links pH 5, rechts pH 6,5)

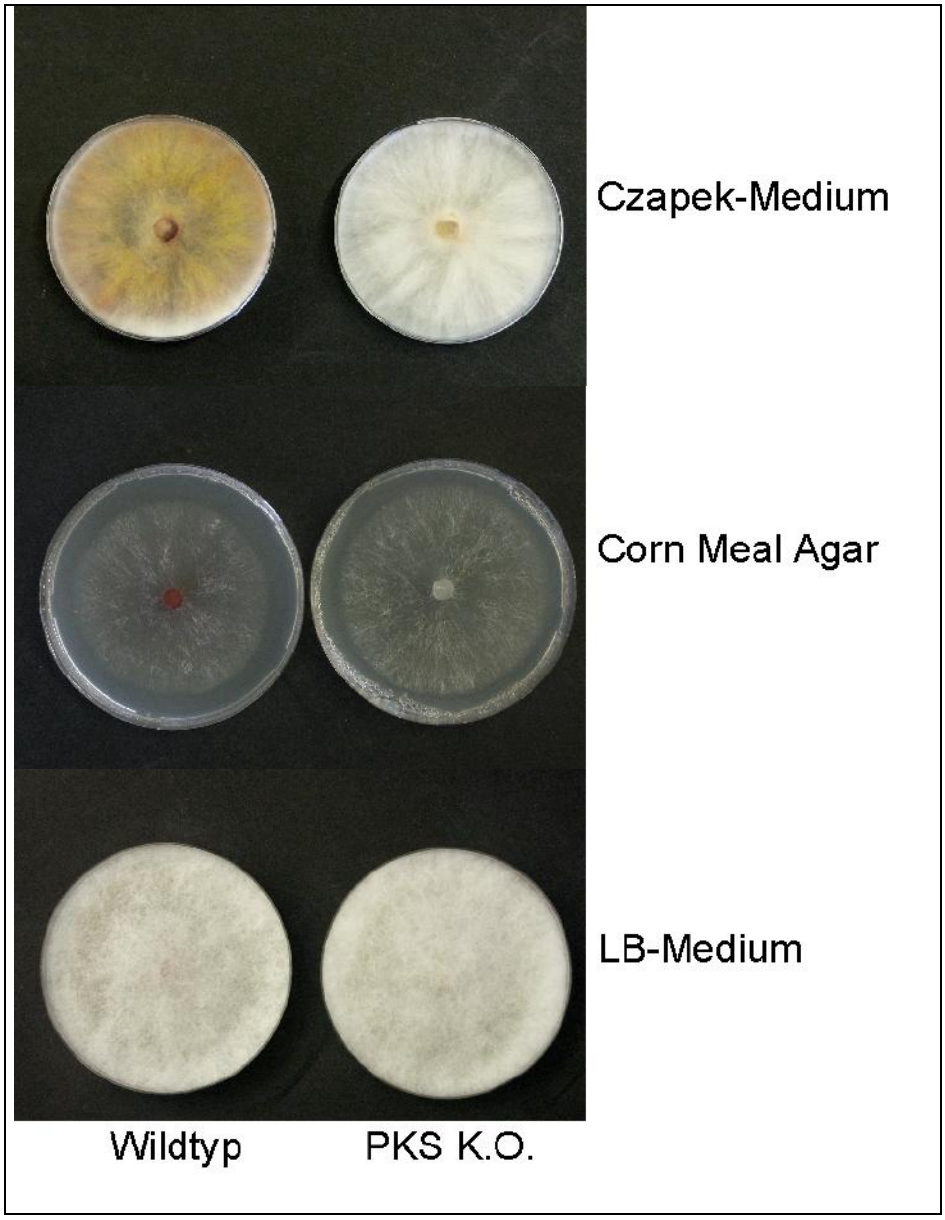


Abb. 31: *Fusarium graminearum* wurde für sieben Tage auf verschiedenen Medien bei 28 °C kultiviert. Links: Wildtyp, rechts: PKS-K.O.-Mutante

Um den Unterschied hinsichtlich des vegetativen Wachstums und der Pigmentbildung spezifizierter zu analysieren, wurde *F. graminearum* auf weiteren Medien kultiviert. Der Wildtyp zeigte hierbei nur eine geringe Pigmentbildung auf dem Czapek-Minimalmedium. Auf Corn Meal Agar und auf LB-Medium kam es nicht mehr zur Pigmentbildung (Abb. 31). Die Wachstumsgeschwindigkeit (gemessen als Durchmesser der Kolonie) differierte in keinem der Fälle zwischen dem Wildtyp und der PKS-K.O.-Mutante.

In Abb. 32 ist die Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps, einer im Alkoholoxidase-Gen disruptierten Mutante (AOX-K.O., Kontrolle) und einer im *PKS*-Gen disruptierten Mutante auf den genannten Medien (Ausnahme: Stärke-Agar) dargestellt. Der Wachstumsverlauf der Myzelkolonie bei 28 °C wurde hierbei jeweils über drei Tage dokumentiert. Die getes-

tete PKS-K.O.-Mutante (31.1.A) zeigt auf YPG-Medium und auf CM-Medium einen Wachstumsvorteil. Zur Verifizierung dieses Resultats wurden weitere fünf PKS-K.O.-Mutanten (31.10.A, 31.20.G.A, 32.19.G.A, 32.11.S und 32.36.) im Wachstum auf CM-Medium mit dem Wildtyp verglichen (Daten nicht gezeigt). Zeigte der Wildtyp von *F. graminearum* keine rote Pigmentierung (Czapek-Medium, YG-Medium, Corn Meal Agar und LB-Medium), glich sich die Wachstumsgeschwindigkeit des Wildtyps sowie der AOX-K.O.-Mutante der Geschwindigkeit der PKS-K.O.-Mutante an.

3.4.3.5. Möglichen Schutzfunktion des Pigments gegen UV-Bestrahlung

- **Konidien**

In zwei unabhängigen Versuchen wurden Konidien auf CM-Platten ausgebracht und mit UV-Licht (254 nm) verschiedener Dosen bestrahlt. Zunächst erfolgte eine Bestrahlung von 50 Konidien je Platte mit 0 bis 100000 µJ/cm^2 (Abb. 33 A). Hierbei zeigte sich die Tendenz eines Auskeimungsvorteiles des Wildtyps ab 50.000 µJ/cm^2. Im zweiten Versuch (mit 100 Konidien je Platte) erfolgte eine Ausdehnung im Bereich zwischen 5000 und 100.000 µJ/cm^2 sowie eine weitere Differenzierung im unteren Bereich (Abb. 33 [B]). Die leichte Tendenz des Wachtumsvorteils bei Wildtyp ist auch hier, im Bereich von 2.000 bis 700.000 µJ/cm^2, zu erkennen. Insgesamt erreicht die Auskeimrate der Konidien vom Wildtyp und von der PKS-K.O.-Mutante maximal 60 % und liegt im Durchschnitt bei ca. 40 bis 50 %.

- **Myzel**

In weiteren Versuchen wurde das Wachstumsverhalten des Wildtyps und der PKS-K.O.-Mutante nach Bestrahlung von Myzel mit UV-Licht untersucht. Hierfür wurden CM-Festmedium-Platten (Ø 90 mm) mit Myzel-Agar-Blöckchen (Ø 6 mm) der Transformande 31.1.A sowie des Wildtyps inokuliert und drei Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine UV-Bestrahlung von 0 bis 999.900 µJ/cm^2, wobei ein Teil der Platten nur einmal bestrahlt wurde, der andere täglich.

In der Abb. 34 wurde das Koloniewachstum (Durchmesser in mm) nach sieben Tagen gegen die jeweilige Strahlendosis aufgetragen. Hierbei wurde das Wachstum unter Bestrahlung in Relation gesetzt zu dem Wachstum ohne Bestrahlung (100 %). Die Dokumentation erfolgte über sieben Tage.

Sowohl die einmalige als auch die wiederholte UV-Bestrahlung führte zu einer Hemmung des Wachstums des Wildtyps und der PKS-K.O.-Mutante. Der Vergleich der beiden Diagramme (A) und (B) zeigt, dass die einmalige Bestrahlung insgesamt zu einem geringeren Wachstumsrückgang führt. Interessanterweise führt die tägliche Bestrahlung bei 500.000 und 999.900 µJ/cm^2 zu einem geringeren Wachstumsrückgang als die tägliche Bestrahlung bei 500 bis 100.000 µJ/cm^2. In beiden Fällen zeigt der Wildtyp bei

einer Bestrahlung von 500 und 1.000 µJ/cm^2 einen stärkeren Wachstumsrückgang als die PKS-K.O.-Transformande.

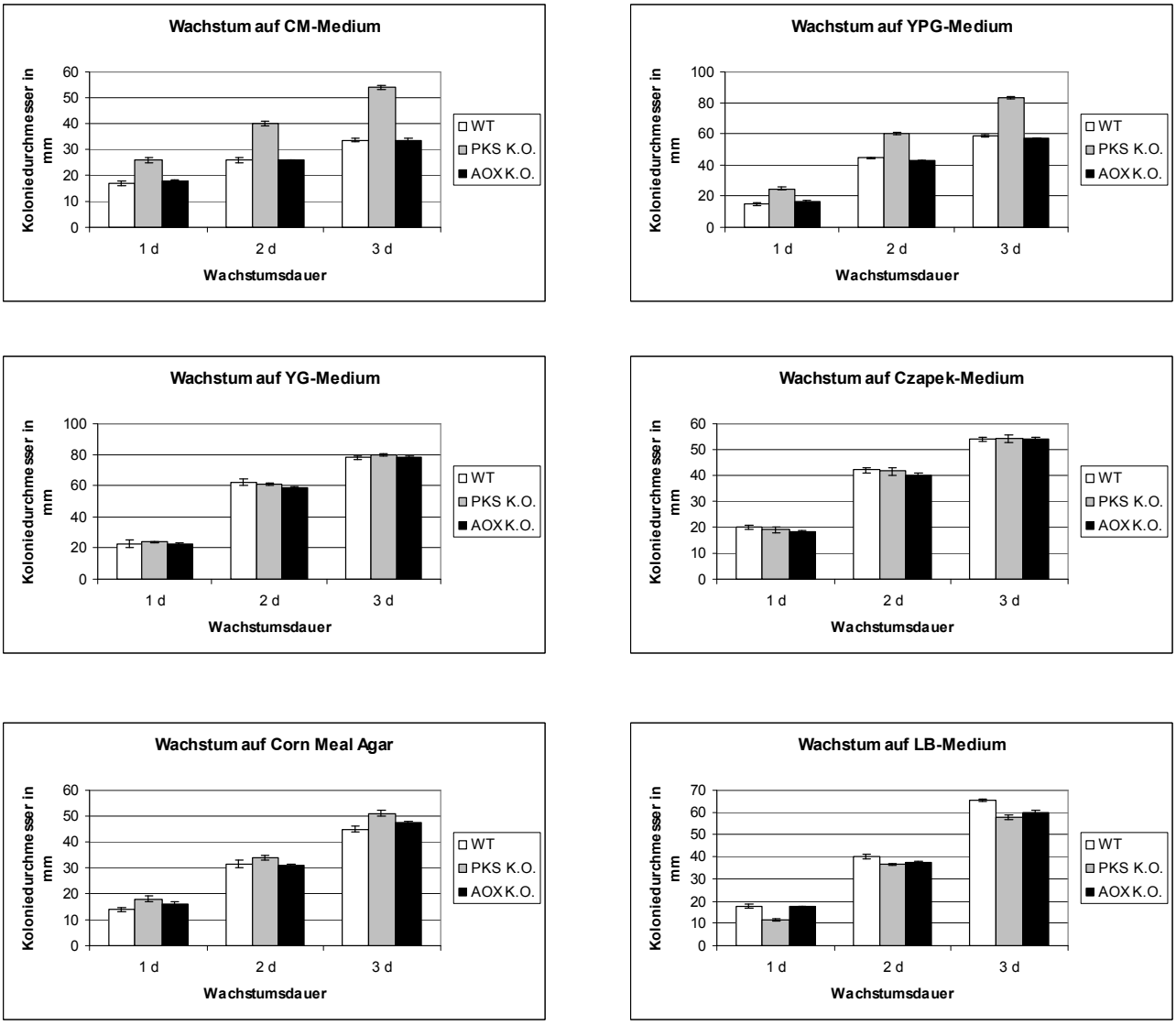
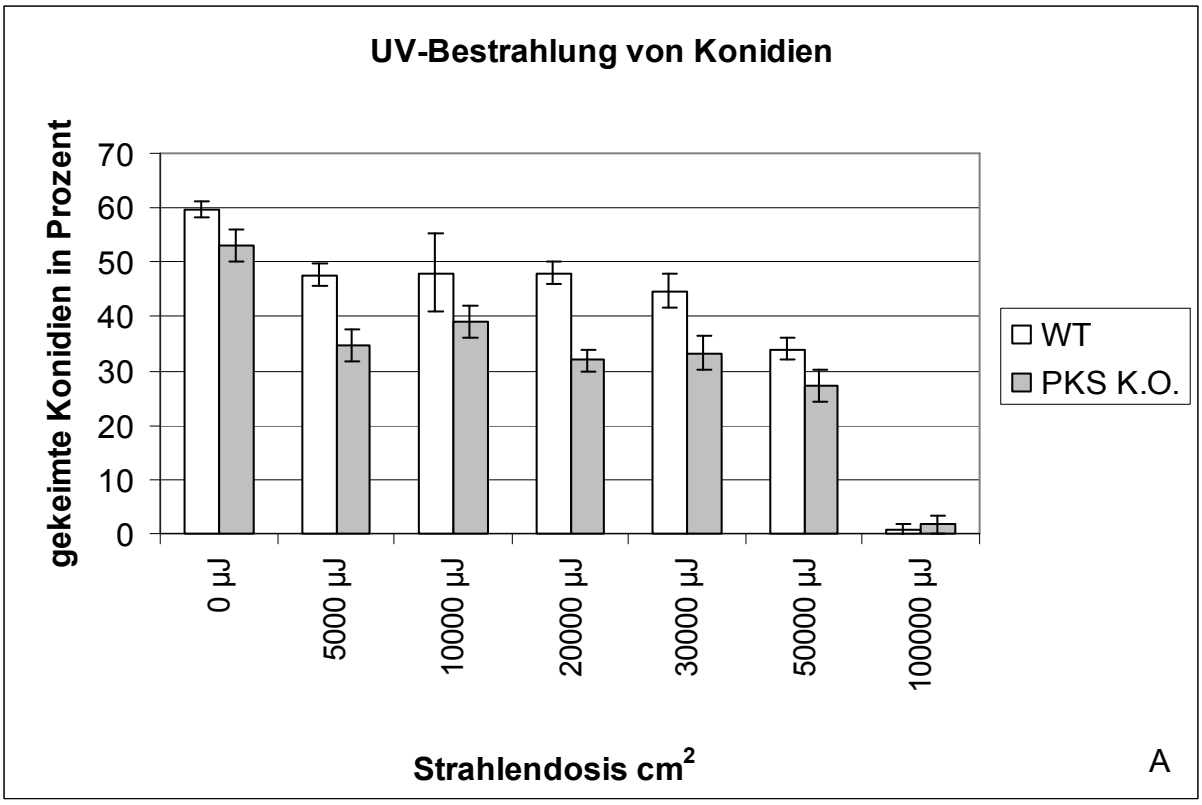


Abb. 32: Das Wachstum von *Fusarium graminearum* (Wildtyp, PKS-K.O.-Mutante und Alkoholoxidase-K.O.-Mutante [AOX, Kontrolle]) auf verschiedenen Medien. In den Grafiken ist jeweils der durchschnittliche Koloniedurchmesser (in mm) aus drei Versuchen gegen die Wachstumsdauer in Tagen (d) aufgetragen.



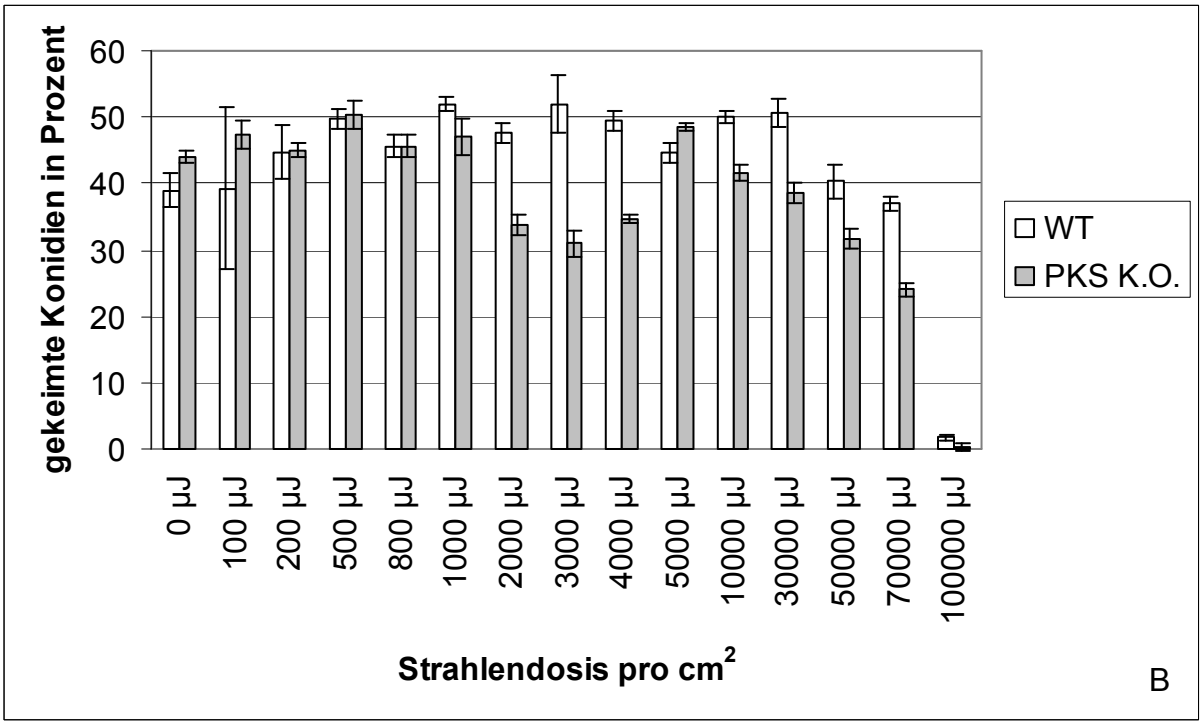
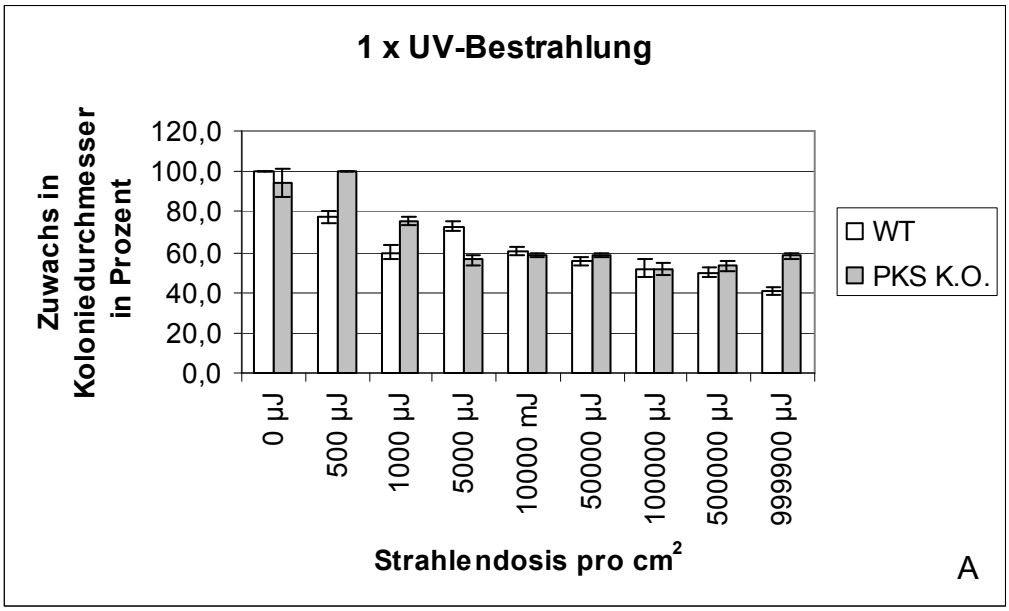


Abb. 33.: In grafischen Darstellungen sind hier die Auskeimraten der Konidien des Wildtyps von *F. graminearum* sowie einer PKS-K.O.-Mutante dargestellt. (A): Je Drei CM-Platten wurden mit 50 Konidien beimpft, mit 0 bis 100.000 µJ/cm^2 bestrahlt und bei 28 °C inkubiert. (B): Je drei CM-Platten wurden mit 100 Konidien beimpft, mit 0 bis 100.000 µJ/cm^2 bestrahlt und bei 28 °C inkubiert.



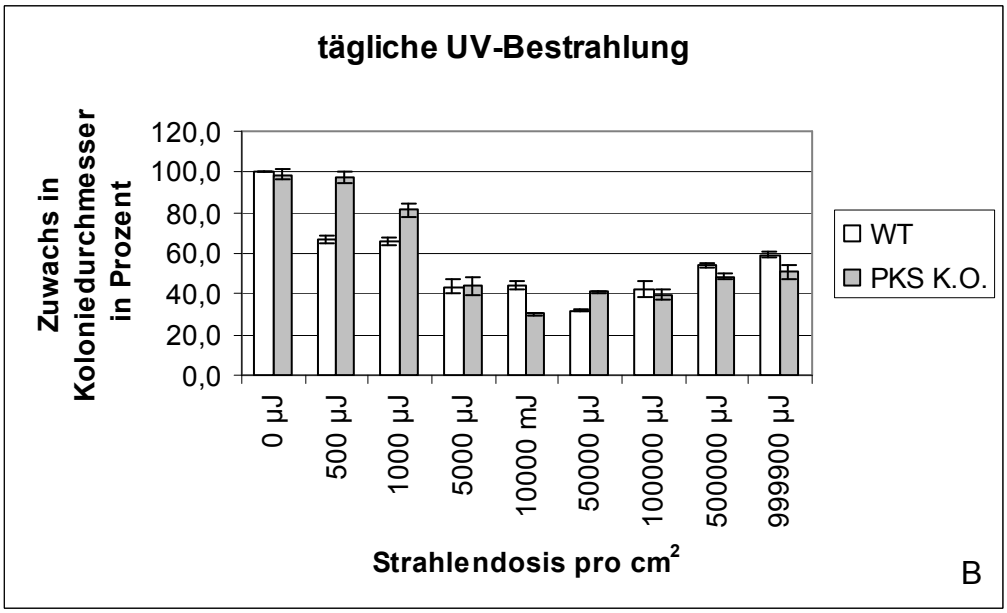


Abb. 34: Wachstumsverhalten des Wildtyps und einer PKS-K.O.-Mutante nach Bestrahlung des Myzels. Der durchschnittliche Zuwachs im Durchmesser (von je drei Platten) ist jeweils in Prozent angegeben, wobei der Zuwachs ohne UV-Bestrahlung als 100 Prozent angenommen wurde. (A): Es erfolgte eine UV-Bestrahlung nach drei Tagen. (B): Die UV-Bestrahlung erfolgte nach dem dritten, vierten, fünften und sechsten Tag. Es wurde jeweils das Wachstum nach der Bestrahlung aufgetragen.

3.4.3.6. Wachstum unter verschiedenen Temperaturbedingungen

Um zu untersuchen, ob der Verlust des roten Pigments eine Zunahme oder eine Abnahme der Temperatursensitivität von *F. graminearum* zur Folge hatte, wurde das Wachstum bei verschiedenen Temperaturen bestimmt. Hierfür wurden CM-Platten (Ø 60 mm) mit Myzel-Agarblöckchen (Ø 6 mm) des Wildtyps und der im PKS-Gen disruptierten Mutante 31.1.A sowie der im AOX-Gen disruptierten Mutante 184.7.2 (Kontrolle) inokuliert. Die Platten wurden bei 12 °C, 18 °C, 28 °C, 30 °C, 37 °C und 42 °C inkubiert. Das Wachstum (Koloniedurchmesser) wurde über vier Tage dokumentiert.

In der Abb. 35 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Das Wachstum des Wildtyps und der Mutanten ist bei 12 °C sehr gering (A und E), steigt bei 18 °C an (B und E) und verzeichnet bei 28 °C die höchsten Raten (C und E). Bei 30 °C fällt die Wachstumsrate gegenüber 28 °C drastisch ab (D und E) und stagniert schließlich nach vier Tagen. Bei 37 °C und 42 °C kam es zu keinerlei Wachstum (E).

Die PKS-K.O.-Mutante zeigt den bereits unter Ergebnisse 3.4.3.4. erläuterten Wachstumsvorteil (vgl. auch Abb. 32). Deutlich zu erkennen ist dieser Wachstumsvorteil bei 18 °C und bei 28 °C.

Unter Vergleich der Wachstumsraten bei 12 °C und 18 °C zeigt sich, dass der Wachstumsvorteil der PKS-K.O.-Mutante bei sonst vergleichbaren Wachstumsraten bei niedriger Temperatur zurückgeht (Abb. 35 A und B).

Eine Inkubation bei 30 °C ergab kaum noch einen Wachstumsvorteil der PKS-K.O.-Mutante gegenüber dem Wildtyp und der AOX-K.O.-Mutante. Allerdings zeigte sich hier insgesamt nur ein mäßiges Wachstum, welches nach 4 Tagen vollständig stagnierte und dort vergleichbar war, mit dem bei 18 °C und 28 °C nach einem Tag, wo es ebenfalls noch keinen deutlichen Vorteil der PKS-K.O.-Mutante gab.

3.4.3.7. Bestimmung der Konidienbildung

Um den Einfluss der Disruption des PKS-Gens auf die Quantität der Konidien zu bestimmen, wurde die Konidienbildung des Wildtyps sowie der PKS-K.O.-Mutante 31.1.A auf SNA Platten (Ø 60 mm) induziert. Nach 10 Tagen wurden die Konidien jeweils mit 2 ml H_2O von den Platten abgeschwemmt und ausgezählt. In drei parallelen Ansätzen ergab sich hierbei eine durchschnittliche Konidienzahl von 6,6 x 10^5/ml für den Wildtyp und 7,1 x 10^5/ml für die PKS-K.O.-Mutante. Ein signifikanter Unterschied war somit nicht zu erkennen.

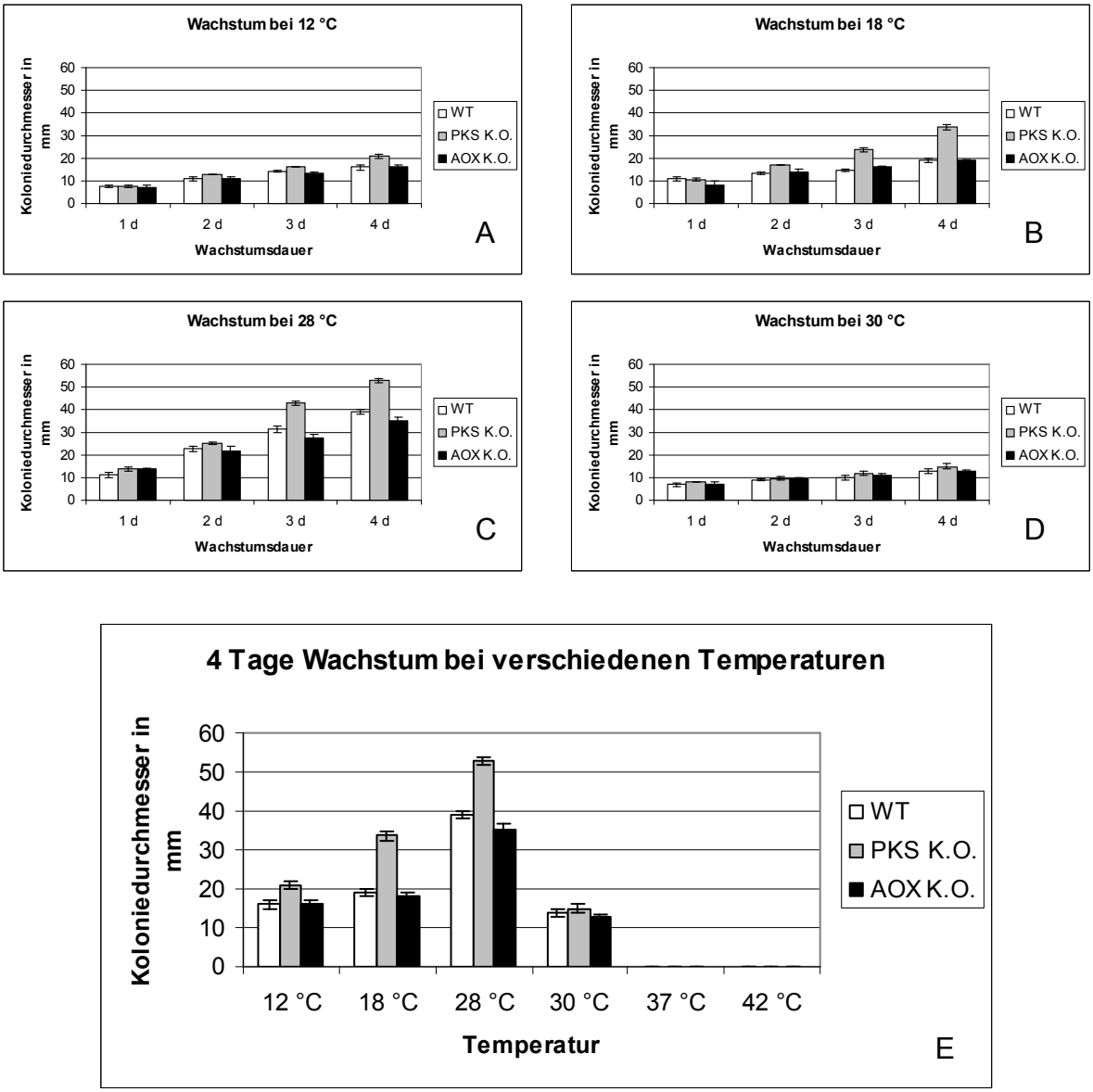


Abb. 35: Wachstum von *Fusarium graminearum* (Wildtyp, PKS-K.O.-Mutante und Alkoholoxidase-K.O.-Mutante [AOX, Kontrolle]) auf CM-Medium bei verschiedenen Temperaturen. In den Grafiken ist jeweils der durchschnittliche Kolonidurchmesser (in mm) aus drei Versuchen gegen die Wachstumsdauer in Tagen (A bis D) bzw. die Inkubationstemperatur (E) aufgetragen.

Abb. 36: Ähreninfektionsversuche mit *F. graminearum*. (A) Infektion nach 18 Tagen. (B) Infektion nach 25 Tagen. Je Ähre wurden zwei Ährchen mit je 1000 Konidien inokuliert. Die Ähren wurden 3 Tage eingetütet, um eine hohe relative Luftfeuchtigkeit während der Primärinfektion zu gewährleisten. Anschließend wurden die Pflanzen unter Aufzuchtbedingungen (Punkt 2.2.1.) bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 bis 90 % gehalten. WT: Wildtyp von *F. graminearum*; K: Wasserkontrolle; 31.1.A., 31.10.1., 32.11.S.A, 32.19.G.A.: PKS-K.O.-Mutanten von *F. graminearum*.

3.4.3.8. Untersuchung der PKS-K.O.-Mutanten von Fusarium graminearum während der Weizeninfektion

3.4.3.8.1. Weizenähreninfektion

An der Ähre der Sommerweizensorte *Nandu* wurde eine Infektion durchgeführt. Die Inokulation erfolgte an jeweils zwei Ährchen pro Ähre mit 1000 Konidien (in 10 µl H_2O) des Wildtyps von *F. graminearum* (Fg 8/1) bzw. der PKS-K.O.-Mutanten 31.1.A., 21.10.1., 32.11.S.A. und 32.19.G.A. Für die Kontrolle wurde reines H_2O in die Blüte gegeben.

Die Abb. 36 zeigt das Ergebnis von zwei unabhängigen Infektionsversuchen, die nach 18 (A) bzw. nach 25 Tagen (B) ausgewertet wurden. Sowohl beim Wildtyp als auch bei den PKS-K.O.-Mutanten ist es zu einer Ausbreitung der Infektion vom Inokulationspunkt aus gekommen. In der Teilabbildung A hat sich das Schadbild der Infektion, die sogenannte Ährentaubheit, noch nicht über die gesamte Ähre ausgebreitet. In der Teilabbildung B sind die Ähren komplett betroffen.

3.4.3.8.2. Weizenblattinfektion

Zusätzlich zu der Infektion der Ähre, sollte die Möglichkeit der Infektion auf dem Weizenblatt, als möglicher „Vortest“, untersucht werden. Wie sich in diesem Versuch mit Blättern der Sommerweizensorte *Nandu* und der Winterweizensorte *Florida* zeigte, war die Blattinfektion durch das Ährenpathogen *F. graminearum* jedoch nicht durchführbar. Weder der Wildtyp noch die hier eingesetzten PKS-K.O.-Mutanten 31.1.A. und 31.10.1. zeigten ein Schadbild auf dem Blatt.

3.4.3.8.3. RT-PCR

Aus infizierte Ähren, die zu den Zeitpunkten 4 h, 12 h, 24 h, 48 h und 7 d geerntet wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert. Zusätzlich erfolgte die RNA-Isolierung aus nichtinfiziertem Gewebe sowie aus dem Myzel einer *Fusarium* Kultur in CM-Medium.

Nach Synthese der cDNA aus der Gesamt-RNA erfolgte eine Kontroll-PCR mit den Primern FgBetaTubF und FgBetaTubR. Mit diesen Primern lässt sich ein Fragment des Gens *ß-Tubulin* aus *F. graminearum* spezifisch amplifizieren. Erfolgt die PCR mit genomischer DNA als Template, so zeigt dieses Produkt gegenüber dem Amplifikat, welches sich aus der PCR mit cDNA ergibt, ein verändertes Laufverhalten. Dieses resultiert aus dem Vorhandensein eines kurzen Introns (ca. 50 bp) in dem amplifizierten Teilfragment der genomischen Sequenz.

Abbildung 37 zeigt im unteren Bild das Ergebnis der RT-PCR mit den genannten Tubulin-Primern. In der zweiten Spur von rechts ist das Amplifikationsprodukt der genomischen DNA aufgetragen, in den Spuren links davon die Produkte der cDNA. Deutlich zu erkennen ist der leichte Längenunterschied zwischen den Produkten der genomischen DNA

und der cDNA, der beweist, dass es sich in den ersten Spuren um cDNA handelt und nicht um Kontaminationen von genomischer DNA. Des weiteren ist in dieser Abb. zu erkennen, dass die Detektion des β-Tubulin-Genfragments erst ab einem Zeitpunkt von 12 h möglich war. Nach 4 h lag der Anteil der Fusarien-RNA in der Gesamt-RNA, unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen, für das konstitutiv exprimierte *ß-Tubulin*-Gen unterhalb der Nachweisgrenze.

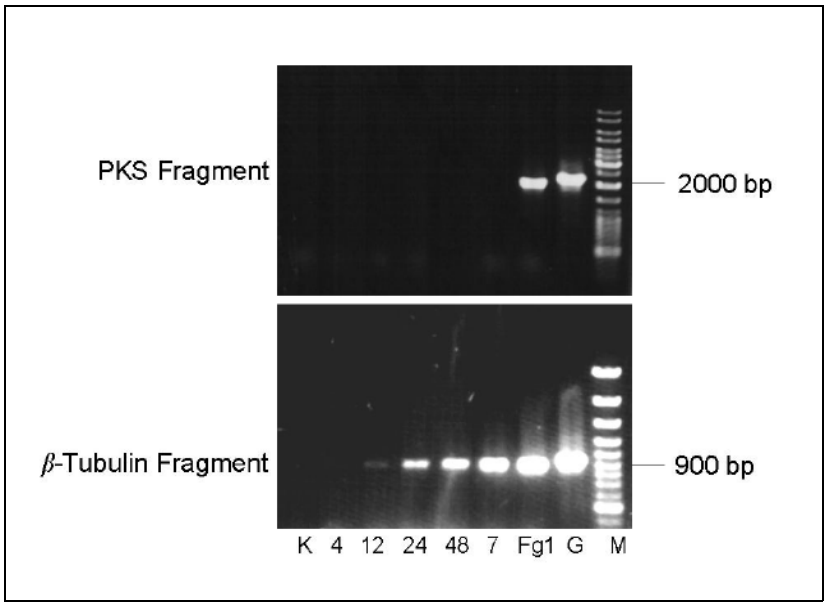


Abb. 37: RT-PCR mit cDNA, die aus infiziertem Gewebe resultierte. Im oberen Gelbild sind die Produkte aus einer PCR aufgetragen, die mit den Primern PKS-V-Start und PKS R 600 amplifiziert wurden. Im unteren Gelbild sind die Produkte einer PCR aufgetragen, die mit den Primern FgBetaTubF und FgBetaTubR durchgeführt wurde. K: Wasserkontrolle (nicht infizierte Ähre); 4: Infektion nach 4 h; 12: Infektion nach 12 h; 24: Infektion nach 24 h; 48: Infektion nach 48 h; 7: Infektion nach 7 d; Fg1: CM-Kultur von *F. graminearum;* G: genomische DNA von *F. graminearum*; M: DNA Längenstandard.

Das obere Teilbild der Abb. 37 zeigt das Ergebnis einer RT-PCR mit den Primern PKS-V-Start und PKS R 600. Mit diesen Primern wird ein 1914 bp großes Fragment aus der cDNA von *F. graminearum* amplifiziert. Wird die genomische DNA als Template eingesetzt, so wird ein 2126 bp großes Fragment gebildet. In Spur G (genomische DNA als Template der PCR) zeigt sich ein größeres Fragment als in der Spur Fg1 (cDNA als Template). Dies weist nach, dass keine genomische DNA in den zu untersuchenden Proben vorlag. Das in dieser Arbeit analysierte PKS-Gen konnte in den Proben der ersten sieben Tage einer Infektion nicht detektiert werden.

3.4.3.9. Untersuchung eines roten Pigments von Fusarium graminearum

Der rote Farbstoff ließ sich mit Chloroform, als organisches Lösungsmittel, und mit Kaliumphosphatpuffer, als anorganisches Lösungsmittel, aus *F. graminearum* gewinnen. Hierbei ergab sich mit Chloroform (pH 6) eine rote Lösung, mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7) eine rote Suspension (Abb. 38).

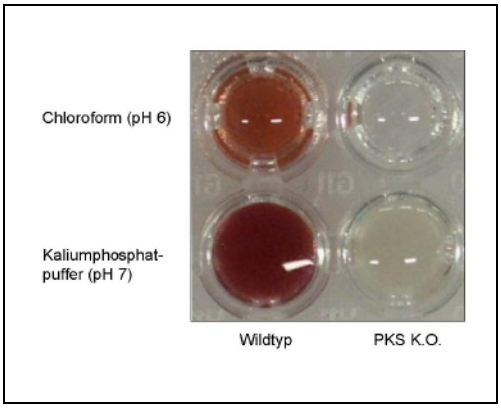


Abb. 38: Farbstoffextrakt bzw. Farbstoffsuspension aus *F. graminearum*. Oben: Farbstoffextrakt gewonnen mit Chloroform (pH 6), unten: Farbstoffsuspension gewonnen mit Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7). Links jeweils der Farbstoff aus dem Wildtyp, rechts aus der PKS-K.O.-Mutante.

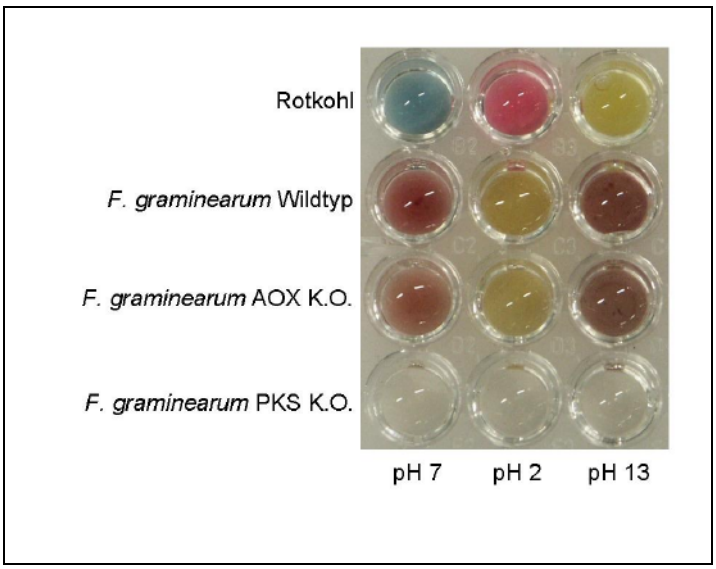


Abb. 39: PH-abhängige Farbverschiebung der wässrigen Farbsuspensionen aus *F. graminearum* im Vergleich zu einem Farbextrakt aus Rotkohlblättern (oben). Die Extrakte des Wildtyps und einer AOX-K.O.-Mutante (Kontrolle) erscheinen im sauren Bereich gelb, im alkalischen Bereich dunkelbraun. Der Extrakt aus der PKS-K.O.-Mutante weist keinerlei Färbung auf. Die Ansäuerung erfolgte mit HCl, der alkalische pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH erzeugt.

3.4.3.9.1. Einfluss des pH-Wertes auf den Farbstoff von *Fusarium graminearum*

Bei dem aus *F. graminearum* isolierten Farbstoff handelt es sich um ein rotes bis rotbraunes Pigment. Versuche zeigten, dass diese Färbung pH abhängig war. Unter Ansäuerung mit HCl veränderte sich die Farbe des Pigments in den gelben Bereich. Eine Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich, durch Zugabe von NaOH, bewirkte ein

dunkles Braun. Dieses Phänomen wird in Abb. 39 dargestellt, wobei dort im Vergleich die Farbverschiebung eines pflanzlichen Anthocyans (Rotkohlextrakt) aufgezeigt wird. Neben der pH-abhängigen Farbgebung konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass das Pigment aus *F. graminearum* keine Ähnlichkeit mit dem Pflanzenfarbstoff aufweist. Letzteres ließ sich als Extrakt in der wässrigen Pufferlösung herstellen und bildete nicht, wie bei *F. graminearum,* eine Suspension.

Die gleichen Farbverschiebungen ergaben sich im Chloroformextrakt (Daten nicht gezeigt).

3.4.3.9.2. Absorptionsspektren des Farbstoffs von *Fusarium graminearum*

Die Messung der Absorption in einem Photometer zeigte, dass der aus *F. graminearum* isolierte Farbstoff ein charakteristisches Spektrum aufweist. Dieses Spektrum konnte durch Ansäuerung verändert werden (Abb. 40). Die Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich führte nicht zu einer Änderung des Spektrums. Das Spektrum eines Chloroformextraktes zeigt bei pH 6 (roter Extrakt) zwei Absorptionsmaxima im Bereich von 380 und 520 nm (Abb. 40 A). Bei Ansäuerung des Extrakts auf einen pH-Wert von 2 (gelber Extrakt) erhöht sich das Maximum bei 380 nm, das Maximum bei 520 nm flacht ab (Abb. 40 C). Ähnliche Spektren sind mit den Kaliumphosphatpuffer-Extrakten zu erkennen. Bei einem pH-Wert von 7 (roter Extrakt) wird ein sehr hohes Maximum bei 520 nm deutlich (Abb. 40 B). Auch bei 380 nm zeigt sich ein hoher Wert, der sich jedoch nicht so deutlich als Peak abzeichnet wie im Chloroformextrakt.

Durch Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich (gelber Extrakt) flacht auch hier der Peak bei 520 nm deutlich ab, und es bildet sich eine leichte Erhöhung bei ca. 380 nm (Abb. 40 D). Die Extrakte der PKS-K.O.-Mutante zeigen keinerlei Absorptionsmaxima (Abb. 40 E und F). Die angesäuerten Extrakte sind in der Abb. nicht gezeigt, da sich keine Unterschiede im Spektrum zeigten. Die Kaliumphosphatpuffersuspension weist deutlich einen insgesamt höheren Hintergrund an photometrisch wirksamen Bestandteilen auf (Abb. 40 F) als der Chloroformextrakt (Abb. 40 E). Dies ist auch bei den Extrakten aus dem Wildtyp zu erwarten.

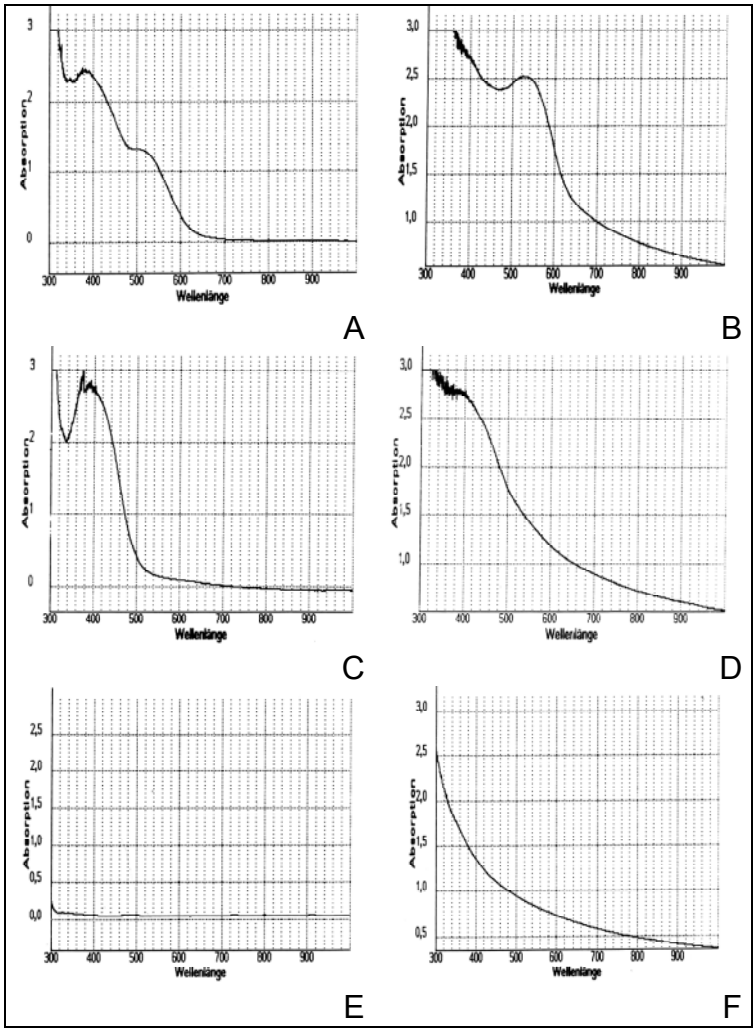


Abb. 40: Absorptionsspektren verschiedener Extrakte bzw. Suspensionen in den Bereichen von 300 bis 1000 nm. Für die Bestimmung der Spektren wurden die Extrakte bzw. Suspensionen auf eine Absorption von ca. 3 bei 220 nm eingestellt (Ausnahme: E, hier ließ sich kein Extrakt erstellen, der eine Absorption > 0,25 bei 220 nm zeigte). (A) Chloroformextrakt des Wildtyps (pH 6), (B) Kaliumphosphatpufferextrakt des Wildtyps (pH 7), (C) Chloroformextrakt des Wildtyps (pH 2), (D) Kaliumphosphatpufferextrakt des Wildtyps (pH 2), (E) Chloroformextrakt einer PKS-K.O.-Mutante (pH 6), (F) Kaliumphosphatpuffer einer PKS-K.O.-Mutante (pH 7).

3.4.3.9.3. Aktivität des roten Farbstoffes gegenüber anderen Organismen

Bei den Polyketiden handelt es sich um eine große und sehr divergente Gruppe von Sekundärmetaboliten. Unter diesen finden sich neben Komponenten der Pigmentbiosynthesewege außerdem Mycotoxine und weitere antibiotisch wirksame Bestandteile.

Bei dem hier untersuchten PKS-Gen handelt es sich um ein Bestandteil einer Pigmentsynthese. Es sollte außerdem untersucht werden, ob dieses Pigment zusätzlich eine antibiotische oder cytotoxische Wirkung aufweist. Für diesen Zweck wurden zweierlei Tests durchgeführt. (1) Ein Hemmhoftest mit verschiedenen Bakterien sowie dem Hefepilz *Candida albicans* und (2) ein Wachstumshemmtest in Flüssigkultur.

Die Hemmhoftests wurden gegen *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* und *C. albicans* durchgeführt.

Zunächst erfolgte ein Vortest mit Filterblättchen, die mit jeweils 100 µl Fusariumextrakt getränkt wurden. In diesem ersten Test wurde die Wirkung gegen *B. subtilis*, *E. coli* und *M. luteus* untersucht. Der Extrakt des Wildtyps und der eingesetzten AOX-K.O.-Mutante

(Kontrolle) von *F. graminearum* zeigte eine das Wachstum von *B. subtilis* und *M. luteus* hemmende Wirkung. *E. coli* wurde nicht im Wachstum gehemmt (Abb. 41). Ein Extrakt aus der PKS-K.O.-Mutante zeigte keinerlei hemmende Wirkung, ebenso wenig die Kontrolle (reiner Kaliumphosphatpuffer). In der Abbildung sind die Ergebnisse des Tests mit einem Kaliumphosphatpufferextrakt dargestellt. Die gleichen Ergebnisse ergaben sich mit Chloroformextrakten. Ferner wurden identische Ergebnisse erzielt, wenn der Extrakt 10 min bei 99 °C erhitzt wurde.

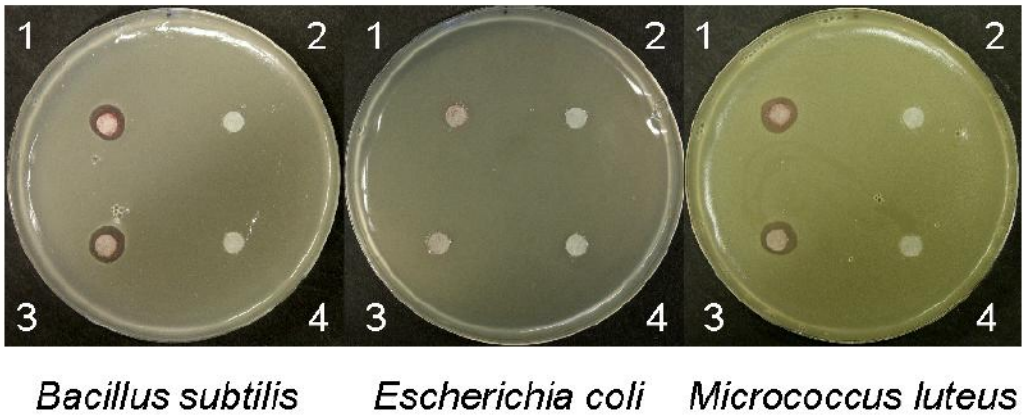


Abb. 41: Hemmhoftests gegen die Bakterien *B. subtilis*, *E. coli* und *M. luteus*. Filterblättchen wurden mit jeweils 100 µl sterilisiertem Kaliumphosphat-*Fusarium*-Extrakt getränkt und getrocknet. Diese Blättchen wurden auf LB-Agarplatten ausgebracht, die mit einer Bakterien-Agarsuspension überschichtet waren. Die Platten wurden ÜN bei 37 °C (*B. subtilis* und *E. coli*) bzw. 28 °C (*M. luteus*) inkubiert. 1: Extrakt des Wildtyps von *F. graminearum* ; 2: Extrakt einer PKS-K.O.-Mutante; 3: Extrakt einer AOX-K.O.-Mutante (Kontrolle); 4: Kaliumphosphatpuffer (pH 7) als Negativkontrolle.

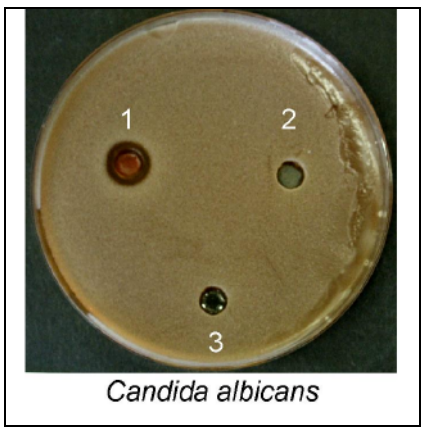


Abb. 42: Eine YPG-Agarplatte wurde mit einer *Candida*-Agar-Suspension überschichtet. In den Agar wurden mit einem sterilen Korkbohrer Löcher gebohrt, deren Boden mit Agar abgedichtet wurden. In diese Löcher wurden jeweils 80 µl zu testende Lösung eingefüllt. Die Platte wurde ÜN bei 37 °C inkubiert. 1: Extrakt des Wildtyps von *F. graminearum*; 2: Extrakt einer PKS-K.O.-Mutante; 3: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle).

Da es unter Einsatz der getränkten Filterblättchen nur zu kleinen Hemmhöfen kam, wurde der Versuch mit einem Lochtest wiederholt. Hierbei wurde der Versuch zusätzlich auf den Hefepilz *C. albicans* ausgeweitet. Das Ergebnis mit *C. albicans* ist in Abb. 42 dargestellt. Die Ergebnisse mit den Bakterien entsprachen denen in Abb. 41.

Auch hier kam es zur Ausbildung eines kleinen Hemmhofes, da der Extrakt aus *F. graminearum* offensichtlich eine toxische Wirkung gegenüber *C. albicans* zeigt.

Neben den Hemmhoftests wurden zusätzliche Versuche in Flüssigkulturen durchgeführt. Jeweils 4 ml Medium wurden mit *E. coli, M. luteus, B. subtilis* und *Pseudomonas aeroginosa,* und den hefeartigen Pilzen *C. albicans, Candida parapsilosis, Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae* und *Geotrichum candidum* sowie den filamentösen Pilzen *F. graminearum*, *Nectria haematococca* und *Pyrenophora teres* inokuliert. Die Kulturen wurden mit den jeweiligen Extrakten des Wildtyps oder einer PKS-K.O.-Mutante von *F. graminearum* bzw. mit Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle) versetzt. Nach entsprechender Inkubation wurde das Wachstum der Kulturen bestimmt. Hierfür wurde die OD_{595} (Bakterien und Hefen) bestimmt, bzw. das Trockengewicht (filamentöse Pilze) gemessen.

Die Ergebnisse und Kulturbedingungen des Versuchs in Bezug auf die getesteten Bakterien und hefeartigen Pilze sind in Tab. 4 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass der Zusatz des Wildtypextraktes zum Teil zur erheblichen Reduktion im Wachstum der Organismen geführt hat (vgl. auch Abb. 42).

Tab. 4: Kulturbedingungen und Ergebnisse (Mittelwert aus drei Versuchen) der in Flüssigkulturen mit verschiedenen Bakterien und hefeartigen Pilzen durchgeführten Wachstumshemmversuche mit Extrakten von *F. graminearum*. Temp.: Inkubationstemperatur der Testkultur; Inokulations OD_{595}: Optische Dichte der Hauptkultur, aus der die zu testende Kultur inokuliert wurde (15 µl je 4 ml); +WT: Extrakt aus dem Wildtyp von *F. graminearum*; +K.O.: Extrakt einer PKS-K.O.-Mutante von *F. graminearum*; +Puffer: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle)

Organismus	Medium	Temp.	Inokulations OD_{595}	OD_{595} nach 16 h Inkubation		
				+ WT	+ K.O.	+ Puffer
Escherichia coli	LB	37 °C	3,125	2,412	3,360	3,163
Bacillus subtilis	LB	37 °C	3,452	0,000	1,960	1,910
Micrococcus luteus	LB	28 °C	2,890	0,037	2,301	2,213
Pseudomonas aeroginosa	LB	28 °C	2,759	2,009	2,127	2,230
Candida albicans	YPG	37 °C	2,972	0,004	5,254	5,148
Candida parapsilosis	YPG	28 °C	3,345	2,670	4,830	5,124
Pichia pastoris	YPG	28 °C	3,092	0,542	3,556	3,276
Saccharomyces cerevisiae	YPG	28 °C	2,893	1,966	3,896	3,963
Geotrichum candidum	YPG	28 °C	2,798	2,966	3,466	3,702

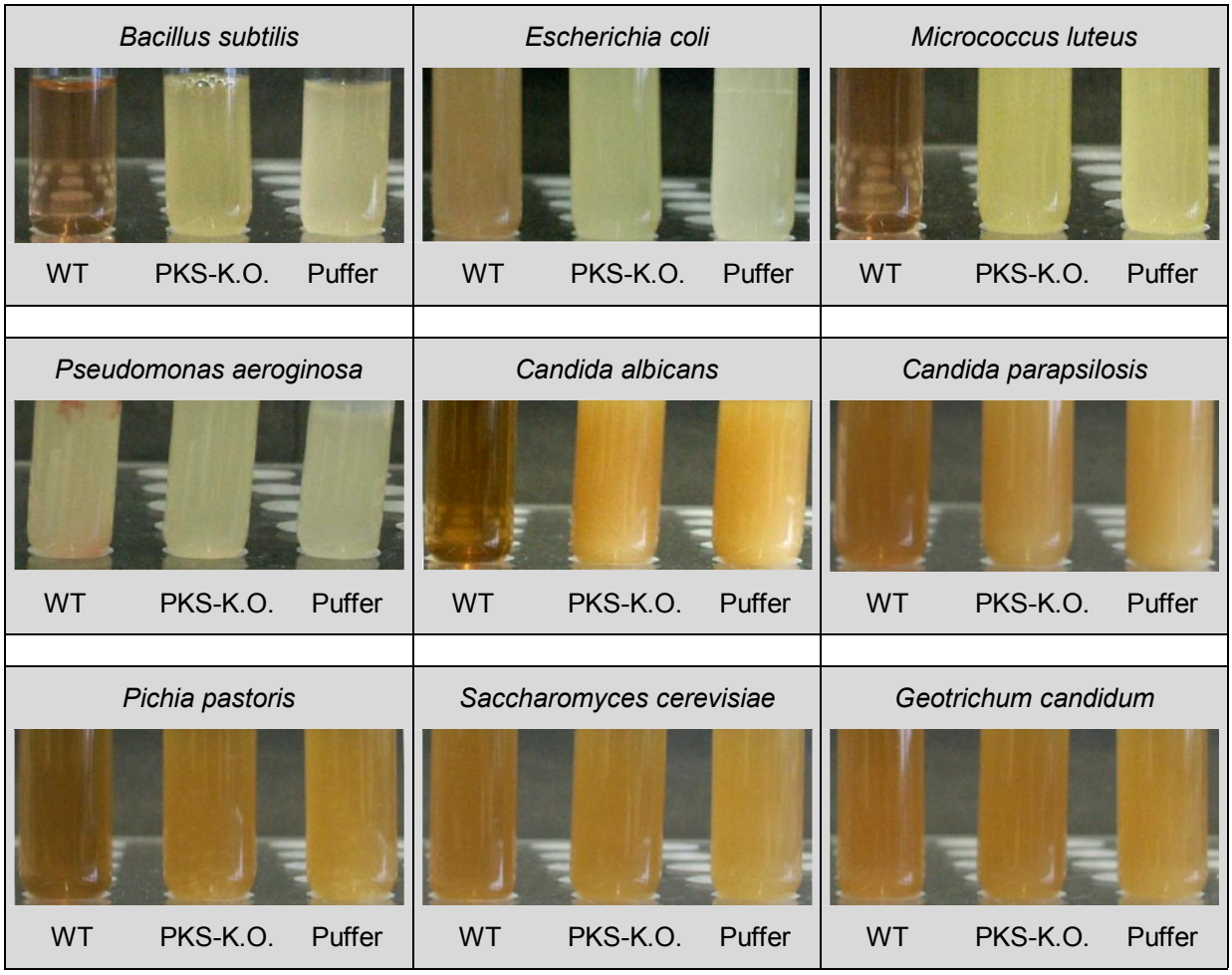


Abb. 42: Kulturen verschiedener Bakterien und hefeartiger Pilze wurden mit einem Extrakt von *F. graminearum* versetzt und ÜN kultiviert. WT: Extrakt des Wildtyps von *F. graminearum*; PKS-K.O.: Extrakt einer PKS-K.O.-Mutante von *F. graminearum*; Puffer: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle).

Eine abschließende grafische Zusammenfassung der Ergebnisse zeigt die Abb. 43 in der das relative Wachstum der Kulturen dargestellt wurde. Unter den Bakterien werden die gram-positiven Arten *B. subtilis* und *M. luteus* zu 100 bzw. zu 98 % im Wachstum gehemmt. Die beiden eingesetzten gram-negativen Bakterienarten werden kaum im Wachstum gehemmt. *E. coli* zeigt ein Wachstum von 72 %, *P. aeroginosa* von 90 % unter Zusatz des Extrakts aus dem Wildtyp von *F. graminearum*. Unter den hefeartigen Pilzen zeigt *C. albicans* die höchste Hemmung im Wachstum (99,9 %), gefolgt von *P. pastoris* (85 %). *S. cerevisiae* sowie *C. parapsilosis* zeigen eine Reduktion im Wachstum um etwa die Hälfte (50 bzw. 48 %). *G. candidum* zeigt nur eine geringe Hemmung im Wachstum (20 %).

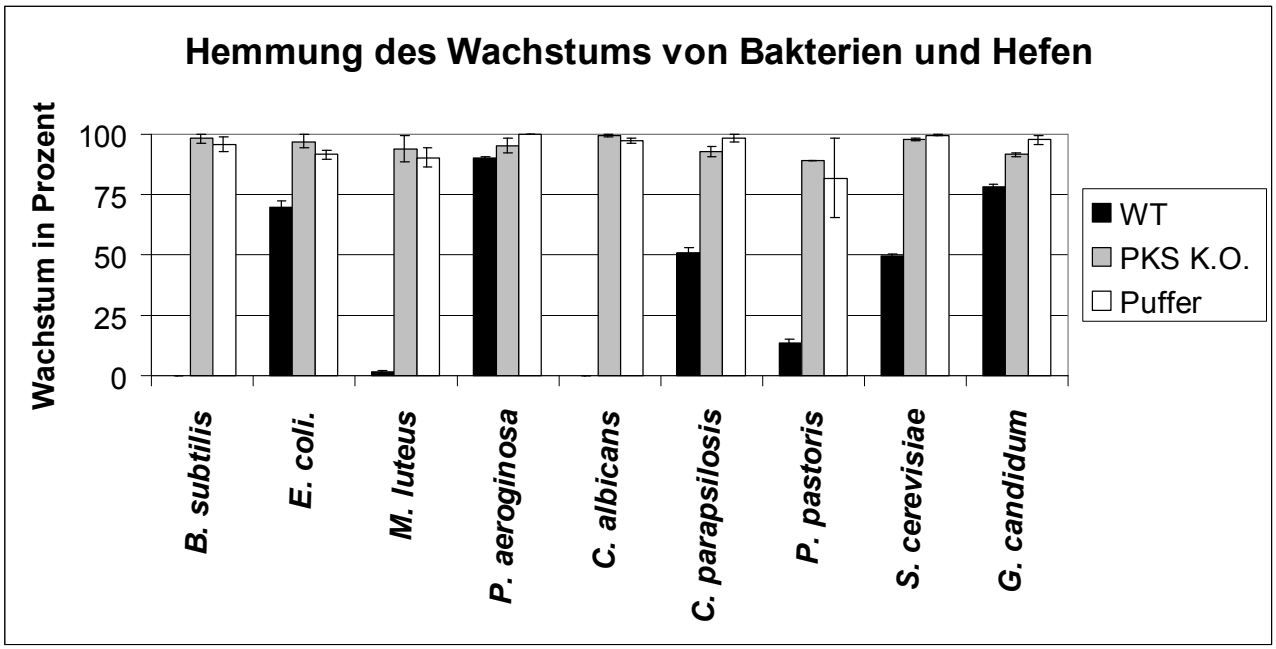


Abb. 43: Aktivität eines Extraktes aus *F. graminearum* gegenüber verschiedenen Bakterien und hefeartiger Pilze. Dargestellt ist jeweils das Wachstum (quantifiziert über eine Bestimmung der OD bei 595 nm) in Prozent, wobei jeweils der Einzelwert des stärksten Wachstums (PKS-K.O. oder Puffer) als 100 % angenommen wurde (da hier die Mittelwerte aufgetragen wurden, zeigen auch die Balken des stärksten Wachstums nicht immer 100 %). WT: Extrakt aus dem Wildtyp von F. graminearum; PKS-K.O.: Extrakt aus einer PKS-K.O.-Mutante; Puffer: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle).

Die Tab. 5 fasst die Kulturbedingungen und Ergebnisse der Wachstumshemmversuche bezüglich der filamentösen Pilze *F. graminearum*, *P. teres* und *N. haematococca* zusammen. Es ist zu erkennen, dass der Zusatz des Wildtypextraktes bei *P. teres* zur erheblichen Reduktion im Wachstums führt, was sich ebenfalls in den Abb. 44 und Abb. 45 zeigt.

Tab. 5: Kulturbedingungen und Ergebnisse (Mittelwert aus drei Versuchen) der in Flüssigkulturen mit verschiedenen filamentösen pflanzenpathogenen Pilzen durchgeführten Wachstumshemmversuche mit Extrakten von *F. graminearum*. Temp.: Inkubationstemperatur der Testkultur; Inokulation mit...: Angabe der Ausgangskultur zur Inokulation der Testkultur; +WT: Extrakt aus dem Wildtyp von *F. graminearum*; +K.O.: Extrakt einer PKS-K.O.-Mutante von *F. graminearum*; +Puffer: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle)

Organismus	Medium	Temp.	Inokulation mit...	Trockengewicht nach 40 h Inkubation in mg		
				+ WT	+ K.O.	+ Puffer
Fusarium graminearum	CM	28°C	Myzel	17	16	18
Fusarium graminearum	CM	28°C	10^4 Konidien	14	15	13
Nectria haematococca	CM	28°C	10^4 Konidien	15	16	15
Pyrenophora teres	CM	28°C	Myzel	0	9,5	8

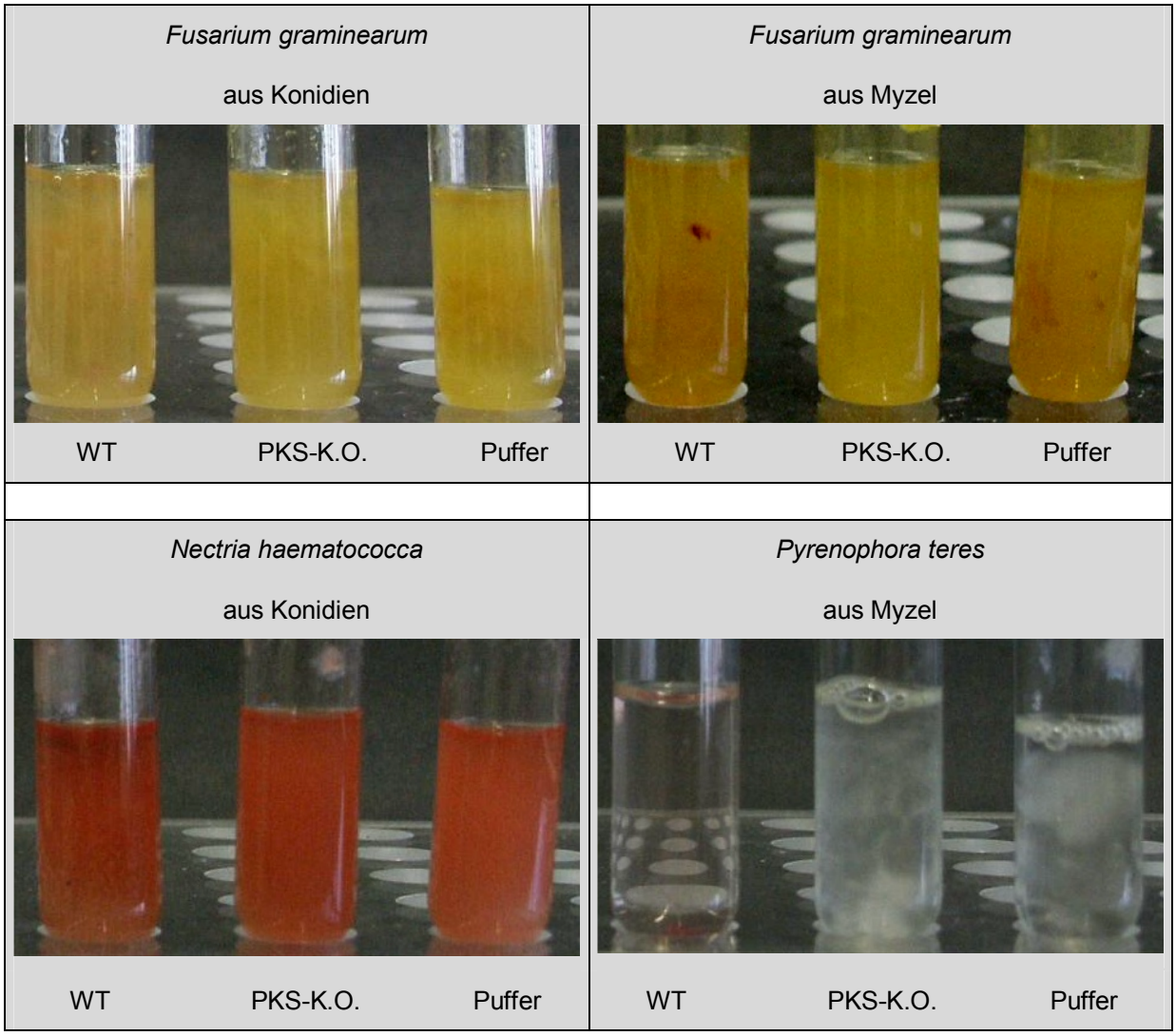


Abb. 44: Kulturen verschiedener filamentöser Pilze wurden mit einem Extrakt von *F. graminearum* versetzt und für 40 h kultiviert. WT: Extrakt des Wildtyps von *F. graminearum*; PKS-K.O.: Extrakt einer PKS-K.O.-Mutante von *F. graminearum*; Puffer: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle).

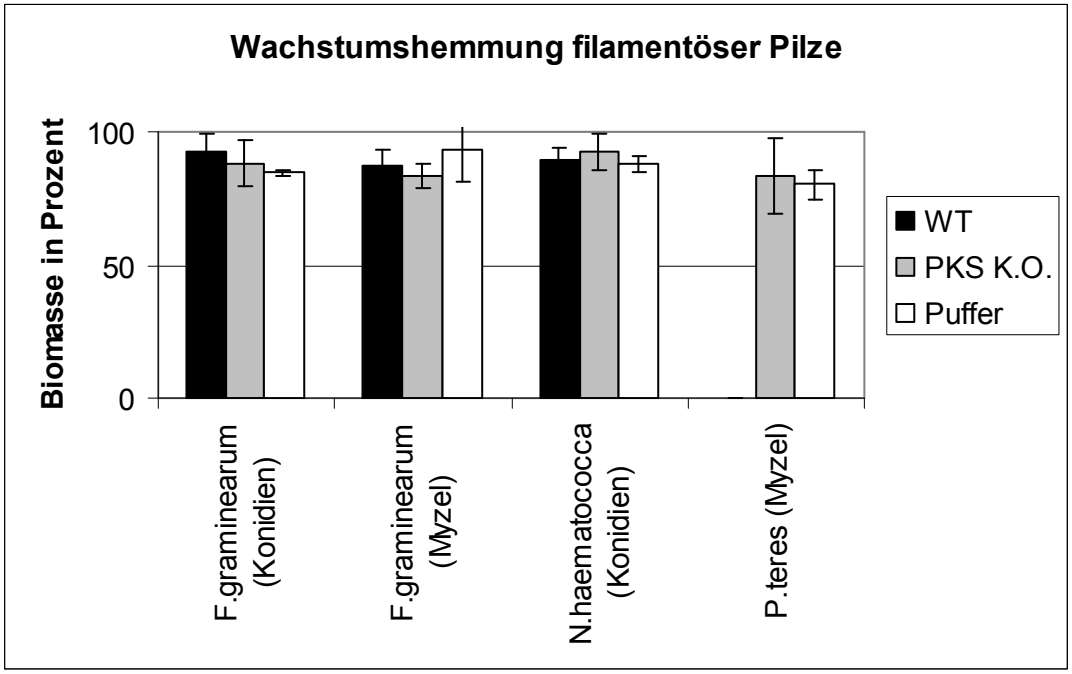


Abb. 45: Aktivität eines Extraktes aus *F. graminearum* gegenüber verschiedenen filamentösen Pilze. Dargestellt ist jeweils das Wachstum (quantifiziert über eine Bestimmung des Trockengewichts der Biomasse) in Prozent, wobei jeweils der Einzelwert des stärksten Wachstums (PKS-K.O. oder Puffer) als 100 % angenommen wurden (da hier die Mittelwerte aufgetragen wurden, zeigen auch die Balken des stärksten Wachstums nicht immer 100 %). WT: Extrakt aus dem Wildtyp von F. graminearum; PKS-K.O.: Extrakt aus einer PKS-K.O.-Mutante; Puffer: Kaliumphosphatpuffer (Kontrolle).

4. Diskussion

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit umfasste neben der Etablierung eines effizienten Transformationssystems für *F. graminearum* die Untersuchung verschiedener Gene im Zusammenhang mit der Pathogenität des Pilzes gegenüber Weizen.

Transformationssystem und Homologe Rekombination

Die Effizienz der gezielten Gendisruption ist in der Regel abhängig von der Länge der homologen Region sowie vom transkriptionalen Status des Zielortes. Darüber hinaus korreliert sie mit dem dominanten Weg des DNA-Doppelstrang-Reparatur-Mechanismus (Schaefer, 2001).

Bei Verwendung der Standard-Transformationsmethoden (Replacement-Vektor oder Insertions-Vektor) findet sich durch illegitime Rekombination neben der homologen Rekombination eine hohe Frequenz an ektopischer Integration außerhalb des Zielortes. Dieses führt zu einer Verminderung der Zielgeneffizienz[6]. Die Auswertung zahlreicher Transformationsversuche zeigte bei verschiedenen Pilzen eine weite Streuung dieser Zielgeneffizienz. So lag der Wert bei *Saccharomyces cerevisiae* bei 95 %, bei *Schizosaccharomyces pombe* bei 10 bis 90 %, bei *Aspergillus nidulans* bei 5 bis 75 % und bei *Neurospora crassa* bei 1 bis 30 % (Schaefer, 2001). In den beiden letztgenannten Fällen betrug die Größe der homologen Sequenz 2 bis 9 kb, in *S. cerevisiae* nur 0,1 bis 0,5 kb. In Ergänzung hierzu sei eine Arbeit von Bird & Bradshaw (1997) genannt, in der die durchschnittliche Zielgeneffizienz für *A. nidulans* bei 1 bis 43 % lag.

Die genannten Werte zeigen, dass die Rate der ektopischen Integration für filamentöse Pilze, im Gegensatz zu hefeartigen Pilzen, höher zu sein scheint. Bird & Bradshaw (1997) zeigten, dass die Zielgeneffizienz abhängig ist von der Konfiguration des K.O.-Vektors sowie der Länge des homologen Bereiches. Unter Nutzung eines linearisierten Insertions-Vektors, geöffnet in der Mitte der Zielgensequenz, und einer Größe des homologen Bereichs von 2,15 kb konnte die Zielgeneffizienz bei *A. nidulans* von 43 % auf 83 % gesteigert werden.

Bei der Transformation von *F. graminearum* zeigt die Konfiguration des Vektors ebenfalls einen deutlichen Einfluss auf die Rate der homologen Rekombination im Zielgen (diese Arbeit). Insbesondere die Zahl der erhaltenen Transformanden wird stark beeinflusst. Unter Verwendung eines Insertions-Vektors mit einem 0,8 kb langen Fragment einer Polyketidsynthase (PKS) zeigte sich für die Transformation mit dem linearisierten Vektor eine Zielgeneffizienz von 90 bis 100 %. Lag derselbe Vektor für die Transformation in zirkulärer Form vor, so wurde eine homologe Rekombinationsrate von 75 bis 83 % erzielt. Ein drastischer Unterschied zeigte sich in der Zahl der generierten Transformanden. Im Falle des linearisierten Vektors konnten bis zu 100 Transformanden je Transformation erzeugt werden, im Falle des zirkulären Vektors maximal fünf. Versuche mit K.O.-Vektoren, die Frag-

[6] Zielgeneffizienz = Zielgenrekombination / (Zielgenrekombination + illegitime Rekombination)

mente weiterer Gene trugen (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt), führten unter Einsatz zirkulärer DNA fast nie zur Regeneration von Transformanden. Für eine erfolgreiche Disruption sollten möglichst zahlreiche Transformanden generiert werden. Unter diesen können die K.O.-Mutanten mit erfolgter homologer Rekombination detektiert werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der K.O.-Vektor in linearisierter Form für die Transformation eingesetzt. Weitere Resultate vorangegangener Versuche (in dieser Arbeit nicht gezeigt) wiesen darauf hin, dass die Linearisierung möglichst symmetrisch in der homologen Sequenz erfolgen musste. Hierbei war von Bedeutung, dass wenigstens eines der Enden eine erforderliche Mindestlänge von 0,25 kb besaß. Bei Verkürzung der homologen Enden unterhalb dieser Länge nahm die Rate der homologen Rekombination erheblich ab. Auch die Zahl der generierten Transformanden reduzierte sich bei Verkürzung der homologen Enden. Konnten bei der Mindestlänge der homologen Enden noch bis zu 100 Transformanden erzeugt werden, so führte der Einsatz von Enden einer geringeren Länge nur zu vereinzelten Transformanden.

Leichte Modifikationen der homologen Enden haben keinen Einfluss auf die Transformation. Ohne Verlust der hohen homologen Rekombinationsrate konnten einzelne Basen in den Enden deletiert werden. Diese Vorgehensweise sollte zu einer Leserahmenverschiebung in den neu entstehenden Genkopien führen. Auch machte es keinen Unterschied, ob durch die Linearisierung des Vektors glatte oder überstehende Enden der DNA entstanden.

Es zeigte sich, dass der Zielgenort bzw. die homologe Sequenz für die Zielgeneffizienz und die Zahl der generierten Transformanden verantwortlich war. So führte der Versuch der Disruption eines Aquaporin-Gens zur Generierung von 36 Transformanden. Bei den hiervon analysierten 10 Transformanden zeigte sich eine Zielgeneffizienz von 80 %. Die Länge der homologen Enden lag hierbei gering unter der erforderlichen Mindestgröße. Die Transformation mit einem Alkoholoxidase-K.O.-Vektor, der einen homologen Bereich der geforderten Mindestlänge trug, führte zu einer ähnlichen Anzahl an Transformanden. Die Zielgeneffizienz aller generierten Transformanden lag jedoch lediglich bei 23 %. Dieses Beispiel stellt einen möglichen Hinweis auf die Rolle des transkriptionalen Status eines Gens für die erfolgreiche homologe Rekombination dar (Schaefer, 2001). Da die Alkoholoxidase von *F. graminearum* induziert werden muss, wird sie zum Zeitpunkt der Transformation wahrscheinlich nicht transkribiert. Der Zielgenort dürfte in kompakterer Form vorliegen. Srikantha et al. (1995) konnten einen derartigen Zusammenhang bei *Candida albicans* feststellen, Thyagarajan et al. (1995) in humanen Zellen. Bird & Bradshaw (1997) schließen die Korrelation zwischen dem transkriptionalen Status der Zelle und einem Anstieg der gezielten Rekombination bei *A. nidulans* jedoch aus.

Ein weiteres, möglicherweise entscheidendes, Phänomen ergab sich bei der PCR-Analyse der Alkoholoxidase-K.O.-Transformanden. Es zeigte sich, dass die detektierten PCR-Fragmente nach der Integration des K.O.-Vektors unterschiedliche Größen aufwiesen. Eine mögliche Erklärung hierfür wären die Vorgänge der bisher nicht vollständig aufgeklärten Ereignisse während der homologen Rekombination. Diese könnten zur Deletion, aber auch zur Insertion kleinerer DNA-Fragmente führen. Die ebenfalls durch PCR-

Reaktionen analysierten Aquaporin-K.O.-Transformanden zeigten dieses Phänomen nicht. Es wäre möglich, dass nicht nur die Quantität, sondern auch die Qualität der homologen Rekombination vom transkriptionalen Status des Zielgenortes abhängt.

Im Durchschnitt zeigte sich bei weiteren Disruptionsversuchen mit der in dieser Arbeit etablierten Transformationsmethode eine Zielgeneffizienz von 60 bis 90 % mit homologen Enden zwischen 250 und 300 bp. Hierbei erfolgte eine Regeneration von 15 bis über 50 Transformanden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit Resultaten von Proctor et al. (1995) sowie Royer et al. (1999), so zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Zielgeneffizienz mit der hier verwendeten Insertions-Vektor-Transformationsmethode. Proctor et al. (1995) und Royer et al. (1999) erzielten in Disruptionsversuchen mit einem Replacement-Vektor für *F. graminearum* bzw. *Fusarium venenatum* eine Zielgeneffizienz von 17 % bzw. 19 %.

Was also ist der Grund für die durch die hier eingesetzte Methode erzielten hohen homologen Rekombinationsraten in *F. graminearum*? Die Integration von Fremd-DNA über homologe oder illegitime Rekombination korreliert stark mit dem dominanten Weg, der von der Zelle für die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen genutzt wird (Schaefer, 2001). In *S. cerevisiae* (Zielgeneffizienz: 95 %) liegt der vorrangige Weg der Doppelstrangbruch-Reparatur in der homologen Rekombination. Er wird dort der epistasischen Gruppe RAD-52 (radiation-sensitive-52) zugeordnet. Die Reparatur unter Nutzung der nicht-homologen Rekombination stellt in *S. cerevisiae* nur einen Nebenweg dar und wird mit der epistasischen RAD-50/Ku-70-Gruppe in Verbindung gebracht (Paques & Haber, 1999). Gene, die Homologien zur letztgenannten Gruppe zeigen, konnten in pflanzlichen und tierischen Zellen identifiziert werden. Weitere Studien weisen darauf hin, dass die schlechte Effizienz der homologen Rekombination in diesen Systemen auf einen dominanten Weg der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur durch die illegitime Rekombination zurückzuführen ist (Schaefer, 2001). Nach den in der vorliegenden Arbeit sowie in der AG Schäfer erhaltenen Resultaten der gezielten Disruption von Genen ist anzunehmen, dass der überwiegende Mechanismus der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in dem haploiden Pilz *F. graminearum* ebenfalls der homologen Rekombination zugrunde liegt. Diese Folgerung ergibt sich aus der Tatsache, dass die überwiegende Zahl der Transformationen zu einer Zielgeneffizienz von 70 bis 100 % führte. Die genetische Determinante für die Bevorzugung eines der beiden Reparaturwege konnte bisher nicht gefunden werden (Schaefer, 2001). Es zeigt sich jedoch, dass diploide Organismen den Weg der illegitimen Rekombination "bevorzugen". Haploide Organismen bzw. Stadien hingegen ziehen den Weg der homologen Rekombination vor.

Neben dem möglicherweise präferierten DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination ergibt sich für *F. graminearum* außerdem ein entscheidender Vorteil aus der Nutzung eines Insertions-Vektors an Stelle des Replacement-Vektors. Möglicherweise erfolgt die DNA-Reparatur über die homologe Rekombination eher im Zusammenhang mit Einzel-Cross-Over-Ereignissen, wie sie für den Insertions-Vektor notwendig sind. Für die gezielte Disruption durch den Replacement-Vektor muss ein doppeltes Cross-Over-Ereignis vorliegen. Auch unter Nutzung eines Replacement-Vektors kommt es jedoch

über ein Einzel-Cross-Over zur Integration des Vektors im Zielgen. Proctor et al. (1995) erhielten nach der Transformation von *F. graminearum* 42 positive Transformanden (Hygromycin B-resistent). In sieben Mutanten erfolgte die Gendisruptionen der Zielgensequenz. Dies entspricht einer Zielgeneffizienz von 17 %. Lediglich ein Transformand zeigte ein "Genreplacement", die weiteren sechs zeigten eine oder mehr Integrationen des Vektors im Zielgenort. Es zeigt sich, dass in diesem Fall ein Replacement-Vektor als Insertions-Vektor fungierte. In einer weiteren Arbeit erhielten Royer et al. (1999) lediglich Replacement-Transformanden mit dem entsprechenden Vektor. Hier erfolgte jedoch eine Vorselektion der Transformanden über eine PCR, die auf die Selektion von eben diesen Transformanden ausgelegt war. Transformanden mit einer Integration im Zielgenort wurden über diese Methode nicht erfaßt. Es lässt sich daher nicht ausschließen, dass auch diese regeneriert wurden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass offensichtlich das Ereignis eines einfachen Cross-Overs in Verbindung mit dem bevorzugten DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination bei *F. graminearum* im Vordergrund steht. Ferner war festzustellen, dass die Konstruktion von Replacement-Vektoren mit einem Hygromycin-Resistenzmarkergen für *F. graminearum*-Gene nicht standardmäßig gelingt. Daher wurde die Konstruktion von Insertions-Vektoren durchgeführt. Diese Vektoren ließen sich sehr effizient erstellen. Sie führten unter Verwendung einer in ihrer Größe optimalen homologen Region, in die über eine Restriktion ein symmetrischer Doppelstrangbruch eingeführt wurde, zu einer optimalen Zielgeneffizienz für die Disruption von Genen.

Aquaporine

Die Besiedelung der Wirtspflanze durch *F. graminearum* scheint zunächst über die Stomata und anschließend über die Penetration des Pflanzengewebes unter Einsatz Zellwand-degradierender Enzyme zu erfolgen (Pritsch et al., 2000; Kang & Buchenauer, 2000). Denkbar wäre ferner, dass unter Stressbedingungen sowie bei der Bildung bzw. der Auskeimung von Fusarien-Konidien ein Aquaporin eine Rolle spielen könnte. Die Konidien, als Dauerformen und vor allem als infektiöse Formen des Pilzes, sind in ihrer Generierung auf die Dehydratation und in ihrer Keimung auf eine Hydratation angewiesen. Es kommt somit im Laufe eines vollständigen Zyklus der Konidienbildung zu einem starken Wasser-Efflux und -Influx. Dieser könnte im Zusammenhang mit der Bildung von Aquaporinen stehen. Ferner wäre der Transport kleiner Moleküle, z.B. Glycerol, in die Konidien als Dauerformen, aber auch im Myzel, durch das hier analysierte Aquaporin denkbar. Es erfolgte daher die Untersuchung, ob ein in *F. graminearum* identifiziertes Aquaporin in das vegetative Wachstum des Pilzes oder die Konidien-Bildung bzw. -Keimung involviert ist. Diese Zusammenhänge sollten insbesondere auch unter osmotischem Stress analysiert werden.

Das für *F. graminearum* identifizierte Gen führt zu einem putativen Aquaporin-Protein der typischen Länge und der charakteristischen Sequenzsignatur dieser Untergruppe der MIPs. Es weist sowohl die NPA-Motive als auch eine HW[V/I][F/Y]WXGP-Region auf. Un-

ter Vergleich mit weiteren Aquaporinen aus anderen Organismen (mikrobielle sowie höhere Eukaryoten) lässt sich die für ein Aquaporin typische Primärstruktur erkennen. Bei näherer Analyse des topologischen Aufbaus zeigt das putative Protein jedoch sieben membranständige Helices und sechs Schleifen. Es weicht somit von der durch Reizer et al. (1993) für MIP beschriebenen Struktur mit sechs membrandurchspannenden Helices und fünf extrazellularen und intrazellularen Schleifen ab. Obwohl die theoretische Translation der identifizierten Nukleinsäuresequenz in einem ununterbrochenen Leserahmen durchgeführt werden kann, scheint daher ein kurzes Intron vorhanden zu sein. Das Vorhandensein von meist sehr kurzen Introns ist für *F. graminearum* sehr typisch und zeigt sich in allen in dieser Arbeit sowie in zahlreichen in der AG Schäfer analysierten Fusarien-Genen. Zum Teil weist hierbei die Gesamtheit der Intron-Strukturen dieselbe Länge auf wie die der Exon-Strukturen. Introns werden zum einen als regulatorische Einheiten des Multitasking-Netzwerkes des Genomapparates und zum anderen als Hot-Spots von Mutationen diskutiert (Gilbert et al., 1997; Mattick & Gagen, 2001). Letzteres führt im Zusammenhang mit der möglicherweise ebenfalls durch die Introns verursachten, erhöhten Rekombination von Exons ("Exon-Shuffling") zur effizienten Neubildung von funktionellen Genen, was auf eine erhöhte genetische Variabilität schließen lässt. Insbesondere für pathogene mikrobielle Eukaryoten ist diese typisch.
Nach Entfernung eines kurzen Proteinabschnittes *in silico* weist das Aquaporin aus *F. graminearum* die konservierte MIP-Struktur auf. Eine weitere Bestätigung des Introns über die Analyse der cDNA erfolgte nicht, da das Gen im Zusammenhang mit der Pathogenität, der Konidiation und dem vegetativen Wachstum keine offensichtliche Bedeutung aufwies und daher auf DNA-Ebene zunächst nicht weiter charakterisiert werden sollte.

Das theoretische Protein trägt vier Aminosäuren, die in Aquaporinen konserviert sind. Glyceroltransport-unterstützende Proteine zeigen an diesen Stellen andere konservierte Reste (Lagrée et al., 1998; Lagrée et al., 1999). Fütterungsstudien mit Glycerol in einem Kohlenstoffmangelmedium zeigten weiter, dass eine Involvierung in den Glyceroltransport nicht zutrifft. Die Disruption des Aquaporin-Gens führte hierbei nicht zu einem Nachteil der K.O.-Transformanden gegenüber dem Wildtyp. Somit wäre eine Funktion des Aquaporins eher im Wasser- als im Glycerolflux zu vermuten, was experimentell noch zu belegen ist.

Dem Aquaporin aus *F. graminearum* konnte unter den hier durchgeführten Versuchen keine physiologische Rolle zugeordnet werden. Anders als K.O.-Transformanden von *S. cerevisiae* zeigten Fusarium-Mutanten auch unter hyperosmotischem Stress keinen Vorteil des Wachstums gegenüber dem Wildtyp. Die gezielte Deletion des Aquaporin-Gens in *S. cerevisiae* hingegen führte zu einer verminderten Sensitivität gegenüber osmotischem Stress (Bonhivers et al., 1998; Laize et al., 2000). Trotz höchster Homologie des Fusarien-Gens zu einem Aquaporin-Gen aus *S. cerevisiae* konnte somit kein vergleichbarer Phänotyp der K.O.-Mutanten aufgezeigt werden. Auch ein Wachstumsnachteil konnte unter hyperosmolaren Bedingungen nicht festgestellt werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das hier untersuchte Aquaporin eine Rolle in der Osmoregulation der protoplastierten Pilzzelle spielt. Zur Zeit der Transformation scheint sich das Gen in einem hohen transkriptionellen Status zu befinden. Hierfür spricht die hohe Zielgeneffi-

zienz des K.O.-Vektors. Weitere Versuche sind jedoch notwendig, um dies zu belegen.

Die Fähigkeit der Konidienbildung sowie -keimung zeigte ebenfalls keine Veränderung. Eine Rolle des Aquaporins für die Dehydratation bzw. Hydratation dieser infektiösen Dauerstadien kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden. Nach Versuchen zur Weizeninfektion, in denen sich die Konidien der K.O.-Transformanden ebenso pathogen zeigten wie der Wildtyp, erfolgte zunächst keine weitere Charakterisierung des hier bearbeiteten Aquaporins.

Auch wenn dem Aquaporin-Gen aus *F. graminearum* in den vorliegenden Untersuchungen keine eindeutige Funktion zugeschrieben werden kann, ist eine physiologische Rolle nicht auszuschließen. Neben der Tatsache, dass das Gen der multifunktionellen Familie der MIP zuzuordnen ist, deuten weitere Aspekte auf eine physiologische Bedeutung. Möglicherweise ist das Aquaporin aus *F. graminearum* eingebunden in den Verlauf einer Signaltransduktionskette. Für das hier bearbeitete Aquaporin aus *F. graminearum* konnten theoretische Phosphorylierungsstellen bestimmt werden. Diese liegen vorwiegend in der ersten Schleife, aber auch in der für die Kanalbildung entscheidenden Schleife E (unmittelbar zum NPA-Motiv) sowie im C-terminalen Bereich. Beispiele für die Feinregulierung und Aktivierung von Mitgliedern der MIP-Familie durch Phosphorylierungen liegen vor (Weaver et al., 1991; Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1996; Ikeda et al., 1997; Johansson et al., 1998; Klussmann et al., 2000; Guenther et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die Wassertransportaktivität in Aquaporinen aus Pflanzen *in vivo* durch eine Calcium-abhängige Phosphorylierung eines Serinrestes an Position 274 im C-terminalen Ende reguliert wird (Johansson et al., 1998). Auch das Aquaporin aus *F. graminearum* besitzt an Stelle 274 einen als putative Phosphorylierungsstelle identifizierten Serinrest. Regulationen durch Calcium bzw. Calmodulin stellen einen der wichtigsten Steuerungsprozesse im zellulären Geschehen dar. Calcium-Signale gehören außerdem zu den schnellsten Antworten nach einem Befall mit pathogenen Organismen und sind an der Ausbildung der lokalen und systemischen Abwehrreaktionen von Pflanzen beteiligt. Der Anstieg der Calcium-Konzentration in der Pflanze könnte somit zur Feinregulation eines Aquaporins des Pathogens *F. graminearum* über einen Calcium-abhängigen Proteinkinaseweg führen.

Zum Ende dieser Arbeit wurden in der zwischenzeitlich veröffentlichten Genomsequenz von *F. graminearum* fünf weitere putative Mitglieder der MIP-Genfamilie identifiziert. Diese sind ebenfalls den Aquaporinen zuzuordnen. Das Vorkommen zusätzlicher Aquaporine lässt auf eine mögliche Komplementation des fehlenden Genproduktes in den vorliegenden Fusarium-K.O.-Mutanten schließen. Möglicherweise spielt eines dieser Aquaporine gemeinsam mit dem hier untersuchten Gen im Gesamtfeld der Pathogenität oder in anderen physiologischen Beziehungen eine Rolle. Weitere Untersuchungen wären somit sinnvoll, um die Funktion der Mitglieder einer großen Genfamilie in dem Pathogen *F. graminearum* aufzuklären. So könnten zunächst RT-PCR-Analysen durchgeführt werden, um aufzuzeigen, welche der Aquaporin-Gene in *F. graminearum* zu welchem Zeitpunkt bzw. Stadium exprimiert werden. Die Fragestellung des Expressionsmusters ist aufzuklären. Auch eine multiple Gendisruption mehrerer Aquaporingene könnte zur Aufklärung der

Funktion dieser Gene beitragen. Ebenso eine Störung der möglichen Calcium-abhängigen Regulation durch den Einsatz von Calciumaufnahmehemmern oder Calciumantagonisten.

Alkoholoxidasen

Alkoholoxidasen wurden ursprünglich in verschiedenen Hefen als Schlüsselenzyme für den Methanolstoffwechsel identifiziert (Ledeboer et al., 1985; Ellis et al., 1985; Koutz et al., 1989; Cregg et al., 1989; Sakai & Tani, 1992). Prokaryoten und höheren Eukaryoten fehlt das Enzym, doch wurden homologe Sequenzen in den Ascomyceten *Penicillium chrysogenum* (Schreiner et al., 1995; Holzmann et al., 2002), *Cladosporium fulvum* (Segers et al., 2001), *Cochliobolus victoriae* (Ghabrial, 2001), *Mycosphaerella fijiensis* (Donzelli & Churchill, 2003) und *F. graminearum* (diese Arbeit) identifiziert. Weitere Analysen weisen ferner auf homologe Sequenzen in *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Phycomyces blakesleeanus* und *Yarrowia lipolytica* hin (Holzmann et al., 2002). In den genannten Pilzen spielt die Alkoholoxidase, im Gegensatz zu den methyltrophen Hefen, meist keine Rolle im eigentlichen Methanolstoffwechsel. Die genaue Funktion im Metabolismus dieser Pilze ist somit bislang ungeklärt. Der Alkoholoxidase des Tomatenpathogens *C. fulvum* wird jedoch die Funktion eines Virulenzfaktors zugeschrieben (Segers et al., 2001).

Auch für *F. graminearum* konnte eine Alkoholoxidase identifiziert werden. Es ergab sich daher die Fragestellung hinsichtlich einer ähnlichen Bedeutung für die Pathogenität des Pilzes. Die Alkoholoxidase von *F. graminearum* zeigt Homologien und Übereinstimmungen der für die Gruppe der Ascomyceten-Alkoholoxidasen festgelegten konservierten Bereiche (vgl. Ergebnisse 3.3.2., Abb. 17). Die höchste Gesamthomologie zeigt die Alkoholoxidase aus *F. graminearum* zu dem Enzym aus *C. fulvum*.

In Alkoholenzymaktivitätstests konnte eine Aktivität der Alkoholoxidase aus *F. graminearum* gegenüber kurzkettigen Alkoholen (Methanol, Ethanol, 2-Propanol und n-Butanol) gezeigt werden. Auch diese Aktivität zeigt sich analog zu der Alkoholoxidase aus *C. fulvum* (Segers et al., 2001). Gegenüber getesteten aromatischen Alkoholen (Benzylalkohol, Zimtalkohol und Salicylalkohol) zeigte die Alkoholoxidase aus *F. graminearum* keinerlei Aktivität. Diese Tatsache spricht ebenfalls für eine Alkyl-Alkoholoxidase aus der Gruppe der Ascomyceten. Diese Gruppe ist deutlich abzugrenzen von der für Basidiomyceten spezifischen Gruppe der Aryl-Alkoholoxidasen, welche die Oxidation aromatischer sowie ungesättigter Alkohole katalysieren. Sie spielen als sekretierende Enzyme eine Rolle bei der Lignindegradation durch Weißfäulepilze (Marzullo et al., 1995) bzw. dem weiteren Abbau phenolischer Komponenten, die bei dieser Degradation entstehen (Fraaije, 1998). Bei den genannten Alkyl-Alkoholoxidasen der Ascomyceten handelt es sich dagegen um intrazelluläre Proteine. Diese bilden ihre aktive Stufe in Form von Oktameren in der Regel erst in den Peroxisomen aus (van der Klei et al., 1990; Evers et al., 1994 und 1996; Waterham et al., 1997; Ozimek et al., 2003). Entsprechend der Lokalisation in den Peroxisomen besitzen die Mitglieder dieser Gruppe eine Peroxisomenzielsequenz, die aus einem Tripeptid am C-Terminus des Proteins besteht. Dieses

Tripeptid wurde auf das konservierte Motiv [S/T/A/G/C/N/P]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y] festgelegt (Gould et al., 1989; De Hoop & Ab, 1992; Nishimura et al., 1996; Waterham et al., 1997). Die Alkoholoxidase aus *F. graminearum* trägt als abschließendes Tripeptid die Sequenz HRL. Die erste Aminosäure wäre somit nicht zutreffend. In einer weiteren Arbeit zeigten jedoch Birdsey & Danpure (1998), dass eben dieses Tripeptid zur Peroxisomenlokalisation einer Glyoxylat-Aminotransferase von *Cavia porcellus* führt. Die ursprünglich konservierte Peptidfolge kann somit in [S/T/A/G/C/N/P/H]-[R/K/H]-[L/I/V/M/A/F/Y] geändert werden. Für *F. graminearum* wurde allerdings die Lokalisation der Alkoholoxidase noch nicht näher untersucht.

Neben den Hinweisen auf die Zugehörigkeit der Alkoholoxidase zur Gruppe der Alkyl-Alkoholoxidasen bleibt die Frage nach der Funktion in *F. graminearum* offen. Wie Infektionsversuche ergaben, handelt es sich nicht um einen Pathogenitätsfaktor des Pilzes. Trotzdem zeigt sich, dass eine Transkription des Gens während der Infektion ab einem Zeitpunkt von 48 Stunden nachweisbar war. Die vergleichende Kontrollanalyse hinsichtlich der Transkription eines β-Tubulin-Fragments zeigte, dass die Pilz-RNA generell bereits nach 12 Stunden nachweisbar war. Die Hochregulierung des Alkoholoxidase-Gens spricht für eine funktionelle Rolle im Zeitraum der Infektion, wenn auch der Wildtyp gegenüber der K.O.-Mutante unter den durchgeführten *in vitro* und *in planta* Tests keinen sichtbaren Vorteil aufwies.

In vitro kann das Alkoholoxidase-Gen durch Methanol induziert werden, was zur Enzymaktivität gegenüber den genannten Alkoholen führt. Ähnlich wie von Segers et al. (2001) für die Alkoholoxidase von *C. fulvum* beschrieben, erfolgte die Induktion erst in einem Kohlenstoffmangelmedium, dem Methanol zugesetzt wurde. Hierbei kam es zu einer höheren, messbaren Aktivität nach Vorkultur in einem Stickstoffbasismedium mit Glucose als einziger Kohlenstoffquelle im Vergleich zur direkten Kultur in Stickstoffbasismedium mit Methanol als hauptsächlicher Kohlenstoffquelle. In beiden Fällen musste Hefeextrakt in sehr geringer Dosis (0,05 %) zugegeben werden. Die Induktion konnte hierbei jedoch eindeutig dem Methanol zugesprochen werden, da in einer Kultur mit Hefeextrakt ohne Methanol auch nach 20 h keine Enzymaktivität nachweisbar war. Ferner zeigte sich bei Transfer des Pilzes aus der Glucose-Vorkultur in die Methanol-Hauptkultur ein weit höherer Anstieg der Expression des Alkoholoxidase-Gens gegenüber der Vergleichskultur, in welcher *F. graminearum* von Beginn an mit Methanol als alleinige C-Quelle kultiviert wurde.

Insgesamt wies der Wildtyp in der Regel eine niedrigere Alkoholoxidase-Aktivität auf als die ektopischen Transformanden. Eine Ausnahme stellte die Transformande 184.38.1. dar, welche, abgesehen von den K.O.-Mutanten, die niedrigste Aktivität zeigte. Die Reduktion der Aktivität des Wildtyps ist möglicherweise auf die vermehrte Passage des Isolats über Vollmedienplatten zurückzuführen und wurde auch in anderen Enzymaktivitätstests gefunden (pers. Mitteilung durch N. Jenczmionka). Die erhebliche Aktivitätsreduktion der Transformande 184.38.1. könnte durch die ektopische Integration des K.O.-Vektors in einen unbekannten Genlocus erklärt werden. Dieses würde mindestens ein weiteres Gen voraussetzen, welches in die hier analysierten Prozesse involviert sein müsste. Denkbar

wäre die Disruption eines Gens, welches für einen peroxisomalen Faktor codiert und somit für die Bildung des aktiven Alkoholoxidase-Oktamers verantwortlich ist (Ozimek et al. 2003). Die Notwendigkeit der Bildung aktiver Oktamere ist für *F. graminearum* bislang nicht belegt und zeigt sich bei weiteren Pilzen von Organismus zu Organismus verschieden (van der Klei et al.1991; Waterham et al., 1997).

Die Alkoholoxidase von *F. graminearum* ist durch das eigentliche Substrat - Methanol oder ein anderer kurzkettiger Alkohol - induzierbar, die Verwertung dieses Stoffes reicht jedoch für einen Grundumsatz nicht aus. Hierfür müssen weitere Ressourcen verfügbar sein, die im Experiment in Form von Hefeextrakt angeboten wurden. Der Alkoholoxidase scheint jedoch in einer Mangelsituation eine funktionelle Rolle zuzufallen. So konnte diese *in vitro* bei der drastischen Kulturumstellung von dem glucosehaltigen Medium auf das Kohlenstoffmangelmedium beobachtet werden. *In planta* wäre hierdurch das späte Anschalten des Alkoholoxidase-Gens auf der Ähre mit einem durch Abbau bedingten Mangel an Ressourcen zu erklären.

Ob der Alkoholoxidase hierbei hauptsächlich eine Rolle in der Umsetzung von pflanzlichen Alkoholen zufällt oder die während dieser Reaktion erfolgende Bildung von H_2O_2 durch den Pilz im Vordergrund steht, ist zu klären. Segers et al. (2001) diskutieren beide Aspekte, wobei vorgeschlagen wird, dass das H_2O_2 als mögliches Co-Substrat für eine das Pflanzengewebe degradierende Peroxidase fungiert. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Funktion, die nicht essentiell für die Infektion der Pflanze durch *F. graminearum* ist, da *in planta* kein Unterschied zwischen Wildtyp und K.O.-Mutante zu erkennen war. Denkbar wäre jedoch auch die Komplementierung der Funktion der Alkoholoxidase durch ein anderes Gen.

Zum Ende dieser Arbeit stand die Sequenzinformation des gesamten Genoms von *F. graminearum* zur Verfügung. Durch den Homologievergleich mit der hier bearbeiteten Alkoholoxidase konnten in *F. graminearum* weitere Gene mit signifikanter Ähnlichkeit identifiziert werden. Es liegen mindestens vier weitere Alkoholoxidase-Gene sowie mindestens vier weitere Mitglieder der GMC-Oxidoreduktase-Familie vor. Eine Klassifizierung dieser Gene erfolgte zunächst nicht. Es ist jedoch auszuschließen, dass diese Gene für die Oxidation von Methanol, Ethanol und weiterer, in dieser Arbeit getesteter, Alkohole verantwortlich sind. Die generierten K.O.-Transformanden zeigten unter den hier gewählten Bedingungen keinerlei Aktivität mehr. Es ist jedoch möglich, dass eine der anderen Alkoholoxidasen während der Infektion die Rolle des disruptierten Alkoholoxidase-Gens übernimmt. Denkbar wäre die Oxidation eines anderen Alkohols und die damit in Zusammenhang stehende Bildung von H_2O_2. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestärkt, dass beispielsweise gegen Benzylalkohol in allen Linien (Wildtyp, K.O.-Transformande sowie ektopische Transformande) eine deutliche Aktivität messbar war, was auf mindestens eine weitere Alkoholoxidase hinweist. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um eine extrazelluläre Aryl-Alkoholoxidase handelt. Es muss somit weiter geklärt werden, ob eine Alkoholoxidase dieser Gruppe der GMC-Oxidoreduktasen in *F. graminearum* existiert und möglicherweise in die Vorgänge der Pathogenität involviert ist bzw. die hier analysierte Alkyl-Alkoholoxidase komplementieren kann.

Polyketidsynthasen (PKS)

Fusarium graminearum produziert während der Pflanzeninfektion eine Reihe von Mycotoxinen, die zu einem starken gesundheitlichen Risiko für Mensch und Nutztier und daher zu einer Qualitätseinbuße des Ernteguts führen können. Eine Großzahl an Mycotoxinen ist der Gruppe der Polyketide zuzuordnen. Die Mitglieder dieser Gruppe besitzen ein hohes Potential an bioaktiver Wirkung. In diesem Zusammenhang war zu untersuchen, ob Polyketide in *F. graminearum,* vergleichbar mit den Mitgliedern der Gruppe der Trichothecene (Wang & Miller, 1988; Bruins et al., 1993; Proctor et al., 1995; Desjardins et al., 1996; Proctor et al. 1997; Kang & Buchenauer, 1999; Eudes et al., 2001), ebenfalls sowohl als Mycotoxin als auch als Phytopathotoxin fungieren und somit einen Einfluss auf die Pathogenität des Pilzes und die Qualität des Ernteguts haben. Darüber hinaus bleibt aufzuklären ob bzw. in welcher Form Polyketide bei *F. graminearum* in weitere physiologische Zusammenhänge involviert sind.

Für *F. graminearum* konnte über den Einsatz degenerierter Primer - spezifisch für die hochkonservierte PKS-Ketoacylsynthase-Domäne - ein durch fünf Introns unterbrochener, offener Leserahmen identifiziert werden. Dieser führt zu einem putativen Protein in der Größe von 2071 Aminosäuren. Dieses Molekulargewicht entspricht den bislang bekannten pilzlichen PKSs des Typs I (Linnemannstöns et al., 2002). Das Protein weist neben der Ketoacylsynthase-Domäne die für eine PKS typischen Motive einer Acyltransferase- und Acylträgerprotein-Domäne auf und zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten PKSs aus *A. nidulans*, *Gibberella fujikuroi* und *W. dermatitidis* (Mayorga and Timberlake, 1992; Feng et al., 2001; Linnemannstöns et al., 2002). Die Produkte dieser PKSs sind einerseits in die Pigmentsynthese involviert, weisen jedoch auch eine hohe Bioaktivität auf oder spielen eine Rolle in Virulenz des Pilzes. Die hohe Homologie zu diesen PKSs ließ somit eine ähnliche Funktion der PKS aus *F. graminearum* vermuten.

In der PKS aus *F. graminearum* ließ sich ferner das Motiv einer Thioesterase-Domäne identifizieren, welche für die Abspaltung und Makrozyklisierung des Polyketidmoleküls verantwortlich gemacht wird (Khosla et al., 1999; Lal et al., 2000). Ableitend von den angeführten Aspekten ließ sich bereits aus dem Aufbau der hier untersuchten PKS von *F. graminearum* auf ein makrozyklisches, als Pigment fungierendes Molekül als Endprodukt schließen, welches möglicherweise eine Bioaktivität besitzt. Die genaue chemische Struktur des entsprechenden Polyketids konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht aufgeklärt werden.

Die Disruption des PKS-Gens führte zum Verlust eines Pigments, welches *F. graminearum* normalerweise auf Komplett-Medium und auf Regenerationsmedium ausbildet. Im Zusammenhang mit der hohen Effizienz der Transformation ergab sich aus diesem Phänotyp eine ideale, von weiteren molekularbiologischen Verfahren unabhängige, Transformationskontrolle. Bereits der optische Phänotyp zeigt die erfolgreiche Disruption des Gens über die homologe Rekombination an. Molekularbiologische Detektionsmethoden, wie Southern-Blot- oder PCR-Analysen, sind nicht notwendig. Die hohe homologe Rekombi-

nationsrate ist darüber hinaus ein Indiz für eine erfolgreiche Transformation. Werden nur wenige Albino-Mutanten in der mitgeführten "PKS-Kontroll-Transformation" erhalten, so kann dies als Hinweis für einen grundsätzlichen Fehler im Transformationsablauf gedeutet werden.

Mit Verlust des Pigments ist ferner die erste Hypothese bezüglich der oben genannten Eigenschaften des PKS-Produktes erfüllt. Die Pigmentierung des Wildtyps von *F. graminearum* ist hierbei medienabhängig. In Tab. 6 sind verschiedene Medien mit ihren Hauptbestandteilen sowie die auf ihnen von *F. graminearum* gebildete Myzelfärbung aufgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich der Mangel an rotem Pigment nicht eindeutig einer im Medium enthaltenen Substanz zuordnen. Aus der Tabelle wird jedoch ersichtlich, dass alle Medien, die zur Bildung eines roten Pigments führten, sehr nährstoffreich waren. So enthalten sie Hefeextrakt, Zucker und Peptide. Fehlten eine oder mehrere dieser Komponenten, so zeigte das Myzel von *F. graminearum* nur noch eine weiße (LB-Medium, YG-Medium und Corn-Meal-Agar) bis rosa oder orange Färbung (Stärke-Agar oder Czapek-Medium). Hierbei konnte jedoch keiner der Inhaltsstoffe als entscheidende Komponente bestimmt werden. Besonders deutlich wird dies im Vergleich der beiden Medien Corn-Meal-Agar und LB-Medium. Während ersteres lediglich ein Zuckerderivat beinhaltet, fehlt dieses im LB-Medium ganz. Hier liegen statt dessen die Komponenten Hefeextrakt und Peptid vor. In beiden Fällen bleibt das Myzel von *F. graminearum* jedoch weiß. Weitere Wachstumstests unter Nutzung definierter Medienzusammensetzungen wären notwendig gewesen, um den Stoff zu identifizieren, der für die Induzierung oder die Repression des Biosynthesewegs des roten Pigments oder als Bestandteil dieses Polyketids eine Rolle spielt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden entsprechende Tests nicht weiter verfolgt, da vorerst die Charakterisierung und Funktion des Pigments in Bezug auf die mycotoxische und phytopathotoxische Relevanz im Vordergrund stehen sollten. Aufgrund der weiteren Ergebnissen, die sich im Rahmen dieser Arbeit ergaben, wäre eine Durchführung dieser Untersuchungen jedoch notwendig, um Aussagen über die natürliche Funktion des Pigments treffen zu können. Hierfür wären idealerweise verschiedene Lebensstadien des Pilzes *in vitro* zu simulieren, um aufzeigen zu können, ob die Pigmentierung des Myzels auf einen Bestandteil im Medium zurückzuführen ist, der sich aus einem definierten Zustand im Lebenszyklus des Pilzes ergibt.

Tab. 6: Für die Pigmentierung und die Wachstumsgeschwindigkeit getestete Medien und ihre wichtigsten Bestandteile. In der ersten Spalte sind das Medium sowie die Myzelfarbe des Wildtyps von *F. graminearum* aufgeführt. Die Bestandteile sind entweder durch ein Plus oder die genauere Bezeichnung als Inhaltsstoff des entsprechenden Mediums aufgeführt.

Medium (Myzelfarbe)	Hefeextrakt	Zucker-derivat	Peptide	Salze (verschiedene)
Regenerations-Medium (braun-rot)	+	Saccharose	Caseinhydrolysat (enzymatisch)	
CM-Medium (rot)	+	Glucose	Caseinhydrolysat (enzymatisch/ säure-hydrolysiert)	+
YPG-Medium (rot)	+	Glucose	Pepton (Hydrolysat pflanzlicher und tierischer Proteine)	
Czapek-Medium (orange)		Saccharose		+
Stärke-Agar (rosa)		Stärke		
Corn Meal Agar (weiß)		Stärke		
YG-Medium (weiß)	+	Glucose		
LB-Medium (weiß)	+		Trypton (= Caseinhydrolysat)	+

Eine Schutzfunktion für die Zelle, wie in anderen Pilzen beispielsweise für Melanin beschrieben (Polak, 1989), konnte dem Pigment der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden. Weder eine UV-Bestrahlung noch ungünstige Wachstumstemperaturen wurden von dem Pigment-bildenden Wildtyp signifikant besser toleriert als von den farblosen PKS-K.O.-Mutanten. Die Konidien des Wildtyps zeigten eine leicht erhöhte Auskeimrate in bestimmten Strahlendosisbereichen gegenüber denen der PKS-K.O.-Mutanten. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass eine Pigmentierung der Konidien lichtmikroskopisch nicht detektierbar war. Ob es dennoch bereits in den Sporen zur Einlagerung des Pigments gekommen ist, lässt sich im Rahmen der hier eingesetzten Untersuchungsmethoden weder bestätigen noch ausschließen. Für die Pigmentierung der Konidien von *Aspergillus nidulans* (Mayorga & Timberlake, 1992) sowie *Aspergillus fumigatus* (Langfelder et al., 1998; Tsai et al., 1998) konnte eine PKS verantwortlich gezeigt werden.

Auch die Bestrahlung des Myzels führte nicht zu einem signifikanten Ergebnis. Hier zeigte die PKS-K.O.-Mutante in bestimmten Strahlungsdosisbereichen eine leicht erhöhte Toleranz gegenüber der UV-Strahlung. Weitere Versuche, etwa mit Zellwand-abbauenden Enzymen (z.B. Glucanase), sind in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt worden. Ob PKS-K.O.-Mutanten durch diese Enzyme besser protoplastiert würden, ist zu untersuchen. Für Versuche dieser Art müsste zunächst ein Medium gefunden werden, in dem das entsprechende Pigment von *F. graminearum* bereits nach kürzester Zeit gebildet wird. Versuche zur Transformation zeigten, dass zumindestens das Myzel des Wildtyps, trotz noch nicht sehr ausgeprägter Pigmentierung, schon nach mehr als 24 h Wachstum nicht mehr protoplastierbar war. Bislang sind keine Versuche mit einer PKS-K.O.-Mutante durchgeführt worden.

Bei Wachstumsversuchen unter Verwendung verschiedener Temperaturen zeigte sich weder für den Wildtyp noch für die PKS-K.O.-Mutante ein signifikanter Vorteil. Die PKS-K.O.-Mutanten zeigten hier lediglich bei 12 °C bis 28 °C den zuvor bereits diskutierten Wachstumsvorteil. Ab 30 °C (bis 42 °C) kam es in beiden Fällen zur drastischen Reduktion bis zur vollständigen Stagnation des Wachstums. Die Einlagerung des Pigments führte somit nicht zu einer erhöhten Temperaturtoleranz, weder im niedrigen noch im hohen Temperaturbereich.

Die Pigmentierung zeigte sich in Korrelation zur Wachstumsgeschwindigkeit und dem damit verbundenen Aufbau von Biomasse. So konnte ein schnelleres Wachstum von ansonsten gleich gestalteten Myzelkolonien beobachtet werden, wenn es nicht zur Pigmentbildung kam. Diese Tatsache könnte für eine partielle Verlagerung der Biosyntheseleistung sprechen. Wird auf die Synthese des pigmentartigen Polyketids und dessen Modifikation verzichtet (aufgrund der Gendisruption oder der Medienzusammensetzung), so könnten die hierfür notwendigen Startermoleküle für andere wichtige Stoffwechselwege zur Verfügung stehen. Dieses könnte beispielsweise für das Acetyl-CoA von Bedeutung sein, welches u.a. in den Citrat-Zyklus eingeht, aber auch für Propionyl-CoA oder Butyryl-CoA. Auch die das Polyketid verlängernden Moleküle, die Acetyl- oder Propionyl-Einheiten, stehen bei der Pigmentbildung nur in verminderter Form für andere, energiebringende oder Biomasse-erzeugende Stoffwechselwege zur Verfügung.

Die Pathogenität von *F. graminearum* nach der Disruption des PKS-Gens sollte untersucht werden. In parallel durchgeführten Infektionsversuchen an Weizenähren zeigte sich, dass der Wildtyp keinen Vorteil in der Infektion gegenüber der PKS-K.O.-Mutante aufweist. Die Ausbreitung des Pilzes vom Inokulationspunkt verlief in der gleichen Geschwindigkeit und Intensität. Das vom Wildtyp gebildete Pigment hat keinen Einfluss auf die Infektion der hier getesteten Weizensorte Nandu. Es wurden jedoch keine Toxinanalysen des infizierten Weizenmaterials durchgeführt. Insofern kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu einer geringeren Toxinbelastung des Erntegutes nach Disruption des PKS-Gens kommt. Allerdings zeigten RT-PCR-Analysen von mit Wildtyp infiziertem Weizenmaterial, dass es zu den hier untersuchten Zeitpunkten der Infektion (vier Stunden bis sieben Tage nach Inokulation) nicht zur Transkription des PKS-Gens kam. Die Synthese eines rosa-lachsfarbenen Pigments nach oder zu späteren Zeitpunkten der Infektion ist im

Freiland jedoch bekannt (Klingenhagen & Frahm, 1999). Ferner fällt durch *F. graminearum* infiziertes Getreide z.T. durch graurosa- bis rotgefärbte Weizenkörner auf (Rodemann, 1999; Fliss et al., 2000). Ob es sich dabei um das Produkt der hier untersuchten PKS handelt, ist zu untersuchen.

Es ist nicht auszuschließen, dass das hier charakterisierte PKS-Produkt, ähnlich dem T-Toxin aus *C. heterostrophus* (Yoder & Gracen, 1974; Yang et al., 1996; Rose et al., 2002) oder dem PM-Toxin aus *Mycosphaerella zeae-maydis* (Comstock et al., 1973; Yoder, 1973; Yun et al., 1998), gegenüber bestimmten Getreidesorten eine phytopathotoxische Wirkung aufweist, die den PKS-K.O.-Mutanten fehlt. Für umfassendere Untersuchungen sind daher weitere Weizensorten, aber auch Gerste und Mais, in ihrer Suszeptibilität gegenüber den PKS-K.O.-Mutanten zu analysieren.

Um einen Hinweis auf eine mögliche Bioaktivität zu erhalten, sollte der Farbstoff für nachfolgende Versuche extrahiert werden. Die Extraktion erfolgte mit Kaliumphosphatpuffer als anorganischem bzw. mit Chloroform als organischem Lösungsmittel. In beiden Fällen konnte aus dem Wildtyp von *F. graminearum* ein roter Farbstoff isoliert werden. Die Extraktion mit Chloroform führte zu einer echten Lösung, die mit Kaliumphosphatpuffer zu einer Suspension. Weitere Versuche wiesen eine pH-Wert-abhängige Farbgebung auf. Das Pigment zeigt sich im alkalischen bis neutralen Bereich rot, im sauren Bereich gelb. Parallelen zu pflanzlichen Anthocyanen konnten ausgeschlossen werden, da diese im alkalischen Bereich gelb, im neutralen Bereich blau und im sauren Bereich rot sind. Naheliegender war die Verwandtschaft zu dem in *G. fujikuroi* ebenfalls als rotes Pigment beschriebenen Polyketid Bikaverin (Giordano et al., 1999; Linnemannstöns et al., 2002). Bereits nach Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass es sich nicht um dieselbe Substanz handelt. Bikaverin, ein dem PKS-Weg zugeschriebenes Polyketid, zeigt bei der Extraktion mit stark angesäuertem Chloroform eine rote Färbung und weist in spektralphotometrischen Untersuchungen ein Maximum bei 518 nm auf (Giordano et al., 1999). Ferner wird es vom Pilz sekretiert und zeigt sich für die rote Färbung des Kulturmediums verantwortlich (Balan et al., 1970; Linnemannstöns et al., 2002). Diese Aspekte treffen auf das PKS-Produkt von *F. graminearum* nicht zu. Zwar weist die spektralphotometrische Analyse einen leichtes Absorptionsmaximum im Bereich von 518 nm auf, doch befindet sich der Farbstoff hier im neutralen Bereich. Die Extraktion mit angesäuertem Chloroform führt zu einer gelben Lösung, und es zeigt sich hier bei etwa 400 nm ein Absorptionsmaximum. Ferner wird der hier untersuchte Farbstoff vom Pilz nicht in das Medium abgegeben, was sich sowohl makroskopisch, auf Festmedium und in Flüssigkultur, aber auch mikroskopisch erkennen lässt. In letzterem Fall zeigt sich, dass mechanisch zerstörtes Myzel das Pigment als Granula freigibt, welche offensichtlich nicht in wässrige Lösung gehen. Dieses erklärt die Suspension nach der Kaliumphosphatpufferextraktion. Mit Chloroform ließ sich der Farbstoff aus den Granula extrahieren und in Lösung bringen. Es handelt sich bei dem Endprodukt der PKS von *F. graminearum* somit um einen stark hydrophoben Stoff. Ob dies für Bikaverin ebenfalls zutrifft, ließ sich der Literatur nicht entnehmen, doch weisen die Rotfärbung des Kulturmediums sowie die in der Strukturformel enthaltenen Hydroxy-Gruppen zumindestens auf einen gewissen Grad der Wasserlöslichkeit hin. Die

Extraktion erfolgt jedoch meist mit angesäuertem Chloroform (Giordano, et al., 1999; Linnemannstöns et al., 2002).

Obwohl es sich bei dem Farbstoff aus *F. graminearum* offensichtlich nicht um Bikaverin handelt, sollte untersucht werden, ob er eine vergleichbare Bioaktivität aufweist. Bikaverin wird eine hohe antiprotozoale und antifungale sowie eine Mitochondrien-inhibierende Aktivität zugesprochen (Balan et al., 1970; Kjær et al., 1971; Cornforth et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002). Vergleichbare Bioaktivität zeigt sich in der Gruppe der Polyketide in den verschiedensten Bereichen (Khosla und Zawada, 1996; Khosla et al., 1999; Lal et al., 2000).

Für die Analyse der toxischen Wirksamkeit wurden zunächst Hemmhoftests gegen die Bakterien *Escherichia coli, Micrococcus luteus* und *Bacillus subtilis* durchgeführt. Ferner wurde in diesem Test eine mögliche toxische Wirkung gegenüber dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* untersucht. Diese Versuche zeigten, dass sowohl die wässrige Suspension als auch die organische Lösung, die aus der Extraktion des Myzels vom Wildtyp von *F. graminearum* stammte, eine antibakterielle Wirkung gegenüber den hier getesteten gram-positiven Bakterien (*M. luteus* und *B. subtilis*) und eine antifungizide Wirkung gegenüber dem Pilz *C. albicans* aufweist. Weiter zeigte sich jedoch, dass es, auch bei Einsatz hoher Konzentrationen, im Experiment nur zur Ausbildung kleiner Hemmhöfe kam. Dieser Aspekt weist erneut auf die geringe Wasserlöslichkeit des PKS-Produktes hin, woraus sich eine geringe Diffusionsfähigkeit im Agar ergibt. Folgende Versuche sollten daher in Flüssigkultur erfolgen, um so eine optimale Verteilung des Hemmstoffes zu gewährleisten. Hierbei wurde das Spektrum der zu testenden Stämme erweitert. Es zeigte sich eine hemmende Wirkung gegenüber den gram-positiven Bakterien *M. luteus* und *B. subtilis*, den hefeartigen Pilzen *C. albicans*, *Candida parapsilosis*, *Pichia pastoris* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie dem filamentösen pflanzenpathogenen Pilz *Pyrenophora teres*. Eine nur sehr geringe bis nicht nachweisbare Wirkung zeigte sich gegenüber den gram-negativen Bakterien *E. coli* und *Pseudomonas aeroginosa*, dem hefeartigen *Pilz Geotrichum candidum* und den filamentösen Pilzen *Nectria haematococca* sowie *F. graminearum* selbst.

Die bioaktive Wirkung gegenüber Bakterien und Pilzen zeigt ebenfalls Differenzen gegenüber dem Bikaverin aus *G. fujikuroi*. Bikaverin wird zwar eine antiprotozoale und antifungale Aktivität zugesprochen (Kjær et al., 1971; Cornforth et al., 1971; Linnemannstöns et al., 2002), Balan et al. (1970) erzielten mit Bikaverin jedoch ausschließlich letale Effekte gegen *Leishmania brasiliensis*, nicht aber gegen *Trypanosoma cruzi*, *Euglena gracilis*, *Astasia chattoni*, *Strigomonas culicidarum*, *Tetrahymena pyriformis* sowie gegen Bakterien und Pilze. Es handelt sich bei dem in dieser Arbeit identifizierten PKS-Produkt demnach um eine neue, bisher noch nicht beschriebene, bioaktive Substanz.

Die Bedeutung der bioaktiven Wirkung des Pigments aus *F. graminearum* könnte sich aus der Konkurrenz gegenüber Antagonisten erklären. So zeigt beispielsweise das Isolat D1/2 des Bodenbakteriums *B. subtilis* umgekehrt eine hohe Aktivität gegenüber *F. graminearum* und anderen Fusarium-Arten (Bacon et al., 2001; Chan et al., 2003; Okigbo

2003). *B. subtilis* inhibiert hierbei das Myzelwachstum von *F. graminearum* und induziert die Bildung angeschwollener Hyphen bei der Keimung von Konidien (Chan et al., 2003). Auf Mais besetzt *B. subtilis* die gleiche ökologische Nische wie *G. fujikuroi* und scheint die Akkumulation der Mycotoxine zu reduzieren (Bacon et al., 2001). Auch eine antagonistische Interaktion des Getreidepathogens *F. graminearum* und des Bodenbakteriums *B. subtilis* wäre vorstellbar. Hierbei scheint es unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, dass nicht nur das Bakterium gegenüber dem Pilz eine hemmende Wirkung ausübt. Es ist zu folgern, dass ebenso der Pilz eine Strategie entwickelt hat, antagonistische Bakterien zu inhibieren. Ob diese antibakterielle Wirkung alleine auf das hier untersuchte PKS-Produkt zurückzuführen ist, muss in weiteren Versuchen analysiert werden. PKS-K.O.-Mutanten wiesen jedenfalls keine antibakterielle Wirkung auf. Weiterhin sollte untersucht werden, auf welchen Mechanismen die inhibierende Wirkung beruht. In diesem Zusammenhang muss außerdem geklärt werden, ob die vorläufigen Ergebnisse, dass gram-negative Bakterien nicht von der hemmenden Wirkung des PKS-Produktes betroffen sind, Bestand haben. Möglicherweise ließe sich von der Wirkung auf die Gruppe der Bakterien auf den Mechanismus schließen, der für die ebenfalls vorliegende Inhibition der untersuchten Hefen, insbesondere dem wichtigen humanpathogenen Pilz *Candida albicans*, verantwortlich ist. Ferner ist zu untersuchen, ob das hier analysierte PKS-Produkt, ähnlich den weiteren Polyketiden aus Fusarien-Arten, eine toxische Wirkung auf tierische Zellen ausübt. Beispielsweise durch die Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien wie das Bikaverin (Kováč et al., 1978). Ein Hinweis auf die evolutionäre Entwicklung des PKS-Produktes aus *F. graminearum* für die inhibierende Wirkung gegenüber antagonistischen Mikroorganismen zeigt sich in der Tatsache, dass ein weiteres Getreidepathogen, *P. teres*, zu 100 % im Wachstum gehemmt wird. Das in der vorliegenden Arbeit außerdem getestete, nicht sensitiv reagierende Erbsenpathogen *N. haematococca* (anamorph: *Fusarium solani*), synthetisiert hingegen ebenfalls ein rotes Pigment, für welches ein PKS-Syntheseweg verantwortlich gemacht wird (Graziani et al., 2003). Weitere Funktionen des entsprechenden Genproduktes sind bislang nicht bekannt, doch wäre durch die eigene Produktion eines äquivalenten Stoffes die Resistenz von *N. haematococca* gegenüber dem PKS-Produkt von *F. graminearum* erklärbar. Für *P. teres* hingegen ist bislang keine PKS identifiziert worden.

Neben der in dieser Arbeit aufgezeigten Funktion eines PKS-Produktes ergeben sich ferner Fragestellungen über die Funktion weiterer PKS-Gene. Zum Ende der vorliegenden Arbeit konnten in dem mittlerweile veröffentlichten Genom 14 zusätzliche PKS-Gene identifiziert werden. Basierend auf einem nicht publizierten Genomprojekt und vermutlich abweichenden Suchparametern nennen Yoder & Turgeon (2001) 35 mögliche PKS-Gene für *Fusarium graminearum.* Yoder & Turgeon (2001) weisen ferner darauf hin, dass ebenfalls untersuchte Saprophyten, im Gegensatz zu den untersuchten pathogenen Pilzen, keine oder wenige PKS-Gene aufweisen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es möglich war, nach Etablierung eines Transformationssystems für *F. graminearum* effizient Gene in diesem Pilz zu disruptieren. Die Produkte der in dieser Arbeit aufgezeigten Gene zeigten keine phytopathotoxische Wir-

kung und fungieren in der hier getesteten Weizensorte nicht als Virulenzfaktor. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen nach der Charakterisierung und Disruption von drei Genen in *F. graminearum* ergibt sich ein weites Feld anzuschließender Untersuchungen. Diese sollten sich nicht nur auf die in dieser Arbeit bereits vorgestellten Gene beschränken, sondern auch weitere Mitglieder der jeweiligen Gruppen einbeziehen.

5. Zusammenfassung

Der Ascomycet *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorph Gibberella zeae [Schwein.] Petch) ist ein weltweit verbreiteter Erreger von Keimlings-, Halmbasis- und Ährenkrankheiten (Fusariosen) der Süßgräser (Poaceae). Er zählt zu den bedeutendsten Getreidepathogenen. Die Fusariose führt, neben drastischen Ertragseinbußen, zu einer erheblichen Gefährdung des Endverbrauchers, da es zur Akkumulation von Mykotoxinen in den befallenen Getreiden kommt. Weder die Resistenzzüchtung noch verschiedenste Pflanzenschutzverfahren konnten bisher einen Erfolg gegen *F. graminearum* erzielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die gezielte Disruption möglicher pathogenitätsrelevanter Gene zur Detektion von Faktoren führen, die als Ziele der spezifischen Bekämpfung von F. graminearum dienen könnten. Die hierbei erzeugten K.O.-Mutanten wurden hinsichtlich ihres Phänotyps, ihrer Physiologie *in vitro* sowie ihrer Virulenz *in planta* analysiert.

Zunächst wurde ein System etabliert, welches es erstmals ermöglicht, in *F. graminearum* effizient Gene zu disruptieren. Dieses System, welches auf dem Einsatz eines Insertionsvektors basiert, führt zur Generierung einer großen Zahl an Transformanden sowie einer für Ascomyceten sehr hohen Rate der homologen Rekombination (bis 100 %) im Zielgen.

Im Anschluss an die Identifizierung und Charakterisierung der Gene für ein Aquaporin, eine Alkoholoxidase und eine Polyketidsynthase, wurden diese disruptiert. Mit Ausnahme des Aquaporins sind die Produkte dieser Gene bei anderen Pilzen bereits als Virulenzfaktoren bzw. Mykotoxine beschrieben. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene zeigten *in vitro* zum Teil einen veränderten Phänotyp bzw. eine veränderte Physiologie, konnten aber nicht als Virulenzfaktoren gegenüber der hier getesteten Weizensorte identifiziert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Gene bei der Infektion von anderen Weizensorten, anderen Getreiden oder Mais eine wichtige Rolle als Virulenzfaktoren spielen.

Die physiologische Bedeutung des hier untersuchten Aquaporins konnte nicht aufgeklärt werden. Die generierten K.O.-Mutanten zeigten unter allen Versuchsbedingungen, *in vitro* wie *in planta*, das gleiche Verhalten wie der Wildtyp. Es ergab sich kein Einfluss des Aquaporin-Gens auf das Wachstum unter hyperosmolaren Bedingungen. Die Bildung sowie die Keimfähigkeit der infektiösen Dauerstadien (Konidien) des Pilzes blieben unbeeinflusst. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente konnte weder eine Rolle als Pathogenitätsfaktor noch eine Funktion im Wasser- oder Glycerolflux nachgewiesen werden. Möglicherweise zeigt sich eine solche erst in Korrelation mit weiteren Aquaporin-Genen, welche sich nach Abschluss dieser Arbeit im mittlerweile vollständig sequenzierten Genom von *F. graminearum* auffinden ließen.

In dem Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* konnte eine Alkoholoxidase als Virulenzfaktor identifiziert werden. Ein homologes Gen fand sich auch in *F. graminearum*, weshalb dieses Gen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer analogen Funktion untersucht

werden sollte. Die Alkoholoxidase zeigte, vergleichbar zur Oxidase von *C. fulvum*, die Fähigkeit, kurzkettige aliphatische Alkohole zu oxidieren. Generierte Alkoholoxidase-K.O.-Mutanten zeichneten sich unter induzierenden Versuchsbedingungen durch einen Verlust der Aktivität gegenüber diesen Alkoholen aus. Das zu untersuchende Gen wurde somit erfolgreich disruptiert, was sich durch molekularbiologische Analysen bestätigen ließ. Eine Aktivität gegenüber dem aromatischen Benzylalkohol, die auch der Wildtyp zeigt, bleibt den Alkoholoxidase-K.O.-Mutanten jedoch erhalten. Diese lässt auf mindestens eine weitere Alkoholoxidase schließen, die der Gruppe der Aryl-Alkoholoxidasen zuzuordnen ist, während die hier untersuchte Alkoholoxidase aus *F. graminearum* und die Alkoholoxidase aus *C. fulvum* den Alkyl-Alkoholoxidasen angehören. Im Gegensatz zu *C. fulvum* zeigen die Alkoholoxidase-K.O.-Mutanten von *F. graminearum in planta* keine verminderte Virulenz. Durchgeführte Expressionsstudien weisen jedoch trotz fehlender Verminderung der Pathogenität auf eine Induktion des Alkoholoxidase-Gens während der Infektion hin. Unter Umständen zeigen sich verschiedene Alkoholoxidase-Gene gemeinsam für die Pathogenität des Pilzes verantwortlich. Dieses wäre denkbar, da im Genom von *F. graminearum*, nach Abschluss der vorliegenden Arbeit, weitere Alkoholoxidase-Gene detektiert werden konnten.

Die Disruption des hier untersuchten PKS-Gens führt zu einem Albino-Phänotyp von *F. graminearum*. Das betreffende Pigment verhilft der Zelle nicht zu einem verbesserten Schutz gegenüber UV-Strahlung oder hoher Temperatur, wie es beispielsweise für das Polyketidderivat Melanin beschrieben ist. Die Produktion des Pigments verringert jedoch die zeitliche Biomasseproduktion des Pilzes, was auf eine Präferierung des PKS-Synthesewegs gegenüber dem Grundmetabolismus schließen lässt. In eigenen Arbeiten konnten, nach Abschluss der vorliegenden Untersuchungen, 14 weitere putative PKS-Gene im Genom von *F. graminearum* identifiziert werden. Da Infektionsversuche zeigten, dass die Disruption des hier untersuchten PKS-Gens nicht zur Verminderung der Pathogenität gegenüber Weizens führt, wäre eine Komplementation durch weitere PKS-Gene vorstellbar. Ferner zeigt das hier charakterisierte PKS-Produkt eine erhöhte Bioaktivität gegenüber prokaryotischen und eukaryotischen Mikroorganismen. Unabhängig von seiner Wirkung gegenüber der Wirtspflanze konnte hiermit ein Stoff identifiziert werden, der auf Bakterien sowie auf human- und phythopathogene Pilze inhibierend wirkt. Diese Substanz spielt möglicherweise eine wichtige Rolle in der Physiologie des pathogenen Pilzes und stellt einen denkbaren Angriffspunkt in der Bekämpfung von *F. graminearum* dar. Der Verlust des PKS-Produktes könnte den Pilz in seiner Fitness gegenüber mikrobiellen Antagonisten schwächen. Ob das PKS-Produkt sich als Leitsubstanz zur Entwicklung neuer Fungizide eignet, wird zur Zeit geprüft.

6. Literatur

Agre P., Sasaki S., Chrispeels M.J. 1993. Aquaporins - a family of water channel proteins. Am. J. Physiol. 256, F461

Agre, P., Saboori, A.M. Asimos, A. & Smith, B.L. 1987. Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh(D) antigen. J. Biol. Chem. 262(36): 17497-17503

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.L. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402

Andersen, A.L. 1948. The Development of *Gibberella zeae* Headblight of Wheat. Phytopathology. 38: 595-611

ApSimon, J.W. The Biosynthetic Diversity of Secondary Metabolites. 1994. In: Mycotoxins In Grain – Compounds other than Aflatoxin. Miller, J.D. & Trenholm, H.L. (Hrsg.) Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA

Aronson, B.D., Lindgren, K.M., Dunlap, J.C. & Loros, J.J. 1994. An efficient method for gene disruption in *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 242: 490-494

Bacon, C. W., Robbins, J.D. & Porter, J.K. 1977. Media for Identification of *Gibberella zeae* and Production of F-2 (Zearalenone). Appl. Environ. Microbiol. 33: 445-449

Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M. & Meredith, F. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. Environ Health Perspect. 1009 S2: 325-332

Bai, G. and Shaner, G. 1994. Scab of Wheat: Prospects for Control. Plant Dis. 78(8): 760-766

Baker M.E. & Saier, M.H. Jr. 1990. A common ancestor for bovine lens fiber major intrinsic protein, soybean nodulin-26 protein, and *E. coli* glycerol facilitator. Cell 60(2): 185-186

Balan, J., Fuska J., Kuhr, I. & Kuhrová, V. 1970. Bikaverin, an antibiotic from *Gibberella fujikuroi* effective against *Leishmania brasiliensis*. Folia Microbiol. 15: 479-482

Barrero, A.F., Sánchez, J.F., Oltra, J.E., Tamayo, N., Cerdá-Olmedo, E., Candau, R. & Avalos, J. 1991. Fusarin C and 8 Z-Fusarin C from *Gibberella fujikuroi*. Phytochemistry 30(7): 2259-2263

Bauknecht, H., Conze, T., Jaszczuk, B., Lukow, T., Moerschbacher, B. & Prüfer, D. 2003. Transcriptional regulation of cell wall degrading enzymes in *Fusarium graminearum*. (Poster) Annual Meeting. From Molecules to Cells – Information Processing in Microbes

Bingle, L.E.H., Simpson, T.J. & Lazarus, C.M. 1999. Ketosynthase Domain Probes Identify Two Subclasses of Fungal Polyketide Synthase Genes. Fungal Genetics and Biology 26: 209-223

Bird, D. & Bradshaw, R. 1997. Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. Mol Gen Genet. 255: 219-225

Birdsey, G.M & Danpure, C.J. 1998. Evolution of alanine: glyoxylate aminotransferase intracellular targeting: structural and functional analysis of the guinea pig gene. Biochem. J. 331: 49-60

Birren, B., Fink, G. & Lander, E. 2002. Fungal Genome Initiative. White Paper developed by the Fungal Research Community. http://www.genome.wi.mit.edu/seq/fgi/ FGI_ whitepaper _Feb8.pdf

Bonhivers, M., Carbrey, J.M., Gould, S.J. & Agre, P. 1998. Aquaporins in *Saccharomyces*. J. Biol. Chem. 273(42): 27565-27572

Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A. & Agre, P. 1999. Cellular and Molecular Biology of the Aquaporin Water Channels. Annu. Rev. Biochem. 68: 425-458

Boshoff, W.H.P., Pretorious, Z.A., Swart, W.J. & Jacobs, A.S. 1996. A comparison of scab development in wheat infected by *Fusarium graminearum* and *Fusarium crookwellense*. (Abstr.) Phytopathology 86: (Suppl.) S58

Bowden, R.L. and Leslie, J.F. 1999. Sexual Recombination in *Gibberella zeae*. Phytopathology. 89(2): 182-188

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ana. Biochem. 72:248-254.

Brakhage. 2002. Molekulare Mechanismen der Protektion und deren Regulation des lungenpathogenen Pilzes *Aspergillus fumigatus* gegen Immuneffektorzellen. http://www.mh-hannover.de/ forschung/sfb587/teilprojekta8.htm

Braun, T., Philipsen, A., Wirtz, S., Borgnia, M. J., Agre, P., Kühlbrandt, W., Engel, A. & Stahlberg, H. 2000. The 3.7 Å projection map of glycerol facilitator GlpF: a variant of the aquaporin tetramer. EMBO Reports 1(2): 183-189

Brenner, S., Johnson, M., Bridgham, J., Golda, G., Lloyd, D.H., Johnson, D., Luo, S., McCurdy, S., Foy, M., Ewan, M., Roth, R., George, D., Eletr, S., Albrecht, G., Vermaas, E., Williams, S.R., Moon, K., Burcham, T., Pallas, M., DuBridge, R.B., Kirchner, J., Fearon, K., Mao, J., Corcoran, K. 2000. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. Nat. Biotechnol. 18(6):630-4

Brobst, S.W. & Townsend C.A. 1994. The potential role of fatty acid initiation in the biosynthesis of the fungal aromatic polyketide aflatoxin B_1. Can. J. Chem. 72:200-207

Bruins, M.B.M., Karsai, I., Schepers, J. & Snijders, C.H.A. 1993. Phytotoxicity of deoxynivalenol to wheat tissue with regard to in vitro selection for *Fusarium* head blight resistance. Plant Sci. 94: 195-206

Bürgerinformation Mykotoxine/Schimmelpilzgifte in Lebensmitteln. 1999. http://www. luas.bayern.de/btmyktox.htm

Butler, M.J., Day, A.W., Henson, J.M. & Money, N.P. 2001. Pathogenic properties of fungal melanins. Mycologia 93(1): 1-8

Carbrey, J.M., Bonhivers, M., Boeke, J.D. & Agre, P. 2001. Aquaporins in *Saccharomyces*: Characterization of a second functional water channel protein. PNAS 98(3): 1000-1005

Carbrey, J.M., Cormack, B.P. & Agre, P. 2001b. Aquaporin in *Candida*: characterization of a functional water channel protein. Yeast 18(15): 1391-1396

Cavener, D.R. 1992. GMC oxidoreductase: A newly defined family of homologous proteins with diverse catalytic activities. J. Mol. Biol. 223: 811-814

Chan, Y.K., McCormick, W.A. & Seifert, K.A. 2003. Characterization of an antifungal soil bacterium and its antagonistics activities against *Fusarium* species. Can. J. Microbiol. 49(4): 253-262

Chang, P.-K., Cary, J.W., Yu, J., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. 1995. The *Aspergillus parasiticus* polyketide synthase gene pksA, a homolog of *Aspergillus nidulans wA*, is required for aflatoxin B_1 biosynthesis. Mol. Gen. Genet. 248: 270-277

Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., 162: 156-159.

Chrispeels M.J & Agre P. 1994. Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. Trends Biochem. Sci. 19,421-425

Chrispeels, M.J. & Maurel, C. 1994. Aquaporins: The Molecular Basis of Facilitated Water Movement Through Living Plant Cells? Plant Physiol. 105: 9-13

Chumley, F.G. & Valent, B. 1990. Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 3(3): 135-143.

Clergeot, P.-H., Gourgoues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.-P., Pépin, R., Tharreau, D., Notteghem, J.-L. & Lebrun, M.-H. 2001. PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. PNAS 98(12): 6963-6968

Comstock, J.C., Martinson, C.A. & Gengenbach, B.G. 1973. Host specifity of a toxin from *Phyllosticta maydis* for Texas cytoplasmically male sterile maize. Phytopathology 63: 1357-1360

Cornforth, J.W., Ryback, G., Robinson, P.M. & Park, D. 1971. Isolation and Characterization of a Fungal Vacuolation Factor (Bikaverin). J. Cehem. Soc. (C): 2786-2788

Cregg, J.M., Madden, K.R., Barringer, K.J., Thill, G.P. & Stillman, C.A. 1989. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Moll. Cell Biol. 9(3): 1316-1323

De Hoop, M.J. & Ab, G. 1992 Import of proteins into peroxisomes and other microbodies. Biochem. J. 286:657-669

Deacon, J.W. 1997. Modern Mycology, 3rd Edition, Chapter 8 Genetics, Blackwell Science, S. 144

Dean, A.R. 1997. Signal pathways and appressorium morphogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 211-234

Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buecheley, G. & Hohn, T.M. 1996. Reduced virulence of trichotecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. Molecular Plant-Microbe Interactions 9: 775-781

Dewey, R.E., Timothy, D.H. & Levings, C.S. 1987. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 5374-5378

Dixon, D.M., Polak, A. & Szaniszlo P.J. 1987. Pathogenicity and virulence of wild-type and melanin-deficient *Wangiella dermatitidis*. J. Med. Vet. Mycol. 25(2): 97-106

Donzelli, B.G.G. & Churchill, A.C.L. 2003. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Mycospaerella fijiensis*, the black Sigatoka pathogen of bananas. The 22th Fungal Genetics Confrence, Asilomar, California

Eaton D.L. & Groopman, J.D. 1994. The toxicology of aflatoxins. Academic Press, San Diego

Echevarría, M., Windhager, E.E. & Frindt, G. 1996. Selectivity of the Renal Collecting Duct Water Channel Aquaporin-3. J. Biol. Chem. 271(41): 25079-25082

Ellis, S.B., Brust, P.F., Koutz, P.J., Waters, A.F., Harpold, M.M. & Gingeras, T.R. 1985. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell Biol. 5(5): 1111-1121

Emmet, R.W. & Parbery, D.G. 1975. Appressoria. Annu. Rev. Phytopathol.13: 147-167

Engelhardt, G., 2002. Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit. http://www.vis-ernaehrung.bayern.de/de/left/fachinformationen/risiken/stoffe-bio/mykotoxine/ aflatoxine.htm

Eudes, F., Comeau, S., Rioux, S. & Collin, J. 2001. Impact of trichothecenes on *Fusarium* head blight [*Fusarium graminearum*] development in spring wheat (*Triticum aestivum*). Can. J. Plant Pathol. 23: 318-322

Evers, M.E., Titorenko, V., Harder, W., van der Klei, I. & Veenhuis, M. 1996. Flavin adenine dinucleotide binding is the crucial step in alcohol oxidase assembly in the yeast *Hansenula polymorpha*. Yeast 12(10): 917-923

Evers, M.E., Titorenko, V.I., van der Klei, I.J., Harder, W. & Veenhuis, M. 1994. Assembly of alcohol oxidase in peroxisomes of the yeast *Hansenula polymorpha* requires the cofactor flavin adenine dinucleotide. Mol. Biol. Cell 5(8): 829-837

Feng, B., Wang, X., Hauser, M., Kaufmann, S., Jentsch, S., Haase, G., Becker, J.M. & Szaniszlo, P.J. 2001. Molecular Cloning and Characterization of WdPKS1, a Gene Involved in Dihydroxynaphthalene Melanin Biosynthesis and Virulence in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. Infection and Immunity 69 (3): 1781-1794

Fernando, W.G.D., Paulitz, T.C., Seaman, W.L., Dutilleul, P. & Miller, J.D. 1997 Head Blight Gradients Caused by *Gibberella zeae* from Area Sources of Inoculum in Wheat Field Plots. Phytopathology 87(4): 414-421

Ferrer, J.L., Jez, J.M., Bowman, M.E., Dixon, R.A. & Noel, J.P. 1999 Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. Nature Structural Biology 6(8): 775-784

Fliss, M., Mugnier, J., Delatte, J.L. & Baret, J.L. 2000. *Fusarium* and equivalent in malting house. Congrés "Innovation dans la filière Orge-Malt-Bière". Nancy.

Flynn, C. R., Mullen, R.T. & Trelease, R. N. 1998 http://abstracts.aspb.org/aspb1998/37/0785.shtml

Forschergruppe DFG-Fusarientoxine, Lauber U. & Miedaner, T. (Hrsg.) 2001. Fusarientoxine: Vorkommen, Wirkung und Prophylaxe. Zusammenfassung des Arbschlussberichtes der DFG-Forschergruppe an der Universität Hohenheim

Fortin, M.G., Morrison, N.A. & Verma, , D.P.S. 1987. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin, is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. Nucl. Acids Res. 15: 813-825

Fraaije, M. 1998. Function, mechanism and structure of vanillyl-alcohol oxidase. Dissertation. Wageningen University.

Froger, A., Rolland, J.-P.; Bron, P., Lagrée, V., Le Cahérec, F., Deschamps, S., Hubert, J.-F., Pellerin, I., Thomas, D. & Delamarche, C. 2001. Functional characterization of a microbial aquaglyceroporin. Microbiology 147: 1129-1135

Garber, R. C., Yoder, O. C. 1983. Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal & plasmid components. Anal. Biochem. 135:416-422.

Ghabrial, S.A. 2001. A novel alcohol oxidase/RNA-binding protein with affinity for mycovirus doublestranded RNA from the plant pathogenic fungus *Helminthosporium* (*cochliobolus*) *victoriae*. The 21th Fungal Genetics Confrence, Asilomar, California

Gilbert, W., de Souza, S.J. & Long, M. 1997. Origin of Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 7698–7703

Giordano, W., Avalos, J., Cerdá-Olmedo, E. & Domenech, C.E. 1999. Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiology Letters 173: 389-393

Gorin, M.B., Yance, S.B., Cline, J., Revel, J.-P. & Horwitz, J. 1984. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane. Cell 39, 49-59

Gould, S.J., Keller, G.A., Hosken, N., Wilkinson, J. & Subramani, S. 1989. A conserved tripeptide sorts proteins to peroxisomes. J. Cell Biol. 108: 1657-1664

Graziani, S., Vasnier, C. & Daboussi, M.J. 2003. Homologs of aflatoxin biosynthetic genes in a cluster of genes involved in the biosynthesis of perithecial red pigment in *Nectria haematococca*. The 22th Fungal Genetics Confrence, Asilomar, California

Guenther, J.F., Chanmanivone, N., Galetovic, M.P., Wallace, I.S., Cobb, J.A. & Roberts, D.M. 2003. Phosphorylation of Soybean Nodulin 26 on Serine 262 Enhances Water Permeability and Is Regulated Developmentally and by Osmotic Signals. The Plant Cell 15: 981-991

Hazen K.C., Lay J.G., Hazen B.W., Fu R.C. & Murthy S. 1990. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. Infect Immun. 58(11): 3469-3476

Hoefte, H.R., Hubbard, L., Reizer, J., Ludevid, D., Kerman, E.M. & Chrispeels,M.J. 1992. Vegetative and seed-specific forms of tonoplast intrinsic protein in the vacuolar membrane of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 99: 561-570

Hogan, L.H., Klein, B.S. & Levitz, S.M. 1996. Virulence Factors of Medically Important Fungi. Clinical Microbiology Reviews: 469-488

Hohmann, S. 2002. Osmotic adaptation in yeast - control of the yeast osmolyte system. Int. Rev. Cytol. 215: 149-187

Hohmann, S., Bill, R. M., Kayingo, G. & Prior, B. A. 2000. Microbial MIP channels. Trends in Microbiology 8(1): 33-38

Hohn, T.M. & Desjardins, A.E. 1992. Isolation and Gene Disruption of the *Tox5* Gene Encoding Trichodiene Synthase in *Gibberella pulicaris*. Molecular Plant-Microbe Interactions 5 (3): 249-256

Holzmann, K., Schreiner, E. & Schwab, H. 2002. A *Penicillium chrysogenum* gene (aox) identified by specific induction upon shifting pH encodes for a protein which show high homology to fungal alcohol oxidase. Curr. Genet. 40: 339-344

Howard, R.J. & Valent, B. 1996. BREAKING AND ENTERING: Host Penetration by the Fungal Rice Blast Pathogen *Magnaporthe grisea*. Annu. Rev. Microbiol. 50: 491-512

Ikeda, S., Nasrallah, J.B., Dixit, R., Preiss, S. & Nasrallah, M.E. 1997. An aquaporin-like gene required for the brassica self-incompatibility response. Science 276: 1564-1566

Jahn, B., Koch, A., Schmidt, A., Wanner, G., Gehringer, H., Bhakdi, S. & Brakhage, A.A. 1997. Isolation and Characterization of a Pigmentless-Conidium Mutant of *Aspergillus fumigatus* withe Altered Conidial Surface and Reduced Virulence. Infection and Immunity 65(12): 5110-5117

Jez, A.M., Austin, M.B., Ferrer, J., Bowman, M.E., Schroder, J. & Noel, J.P. 2000. Structural control of polyketide formation in plant-specific polyketide synthases. Chem. Biol. 7(12): 919-930

Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V.K, Chrispeels, M.J., Larsson, C. & Kjellbom, P. 1998. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. The Plant Cell 10: 451-459

Johansson, I., Larsson, C., Ek, B. & Kjellbom, P. 1996. The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential. The Plant Cell 8: 1181-1191

Johnson, K.D., Höfte, H. & Chrispeels, M.J. 1990. An intrinsic tonoplast protein of protein storage vacuoles in seeds is structurally related to a bacterial solute transporter (GlpF). The Plant Cell 2, 525-532

Jung, J.S., Preston, G.M., Smith, B.L., Guggino, W.B. & Agre, P. 1994. Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. J. Biol. Chem. 269 , 14648-14654

Kang, Z. & Buchenauer, H. 1999. Immunocytochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. Physiological and Molecular Plant Pathology 55: 275-288

Kang, Z. & Buchenauer, H. 2000. Ultrastructural and Cytochemical Studies on Cellulose, Xylan and Pectin Degradation in Wheat Spikes Infected by *Fusarium culmorum*. J. Phytopathology 148: 263-275

Karlson, P., Doenecke, D. & Koolman, J. 1994. Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage

Khosla, C. & Zawada, R.J.X. 1996 Generation of polyketide libraries via combinatorial biosynthesis. Trends in Biotechnology 14: 335-340

Khosla, C., Gokhale, R.S., Jacobsen, J.R. & Cane, D.E. 1999. Tolerance and Specifity of Polyketide Synthases. Annu. Rev. Biochem. 68: 219-253

Kirch, H.H., Vera-Estrella, R., Golldack, D., Quigley, F., Michalowski, C. B., Barkla, B.J. & Bohnert, H.J. 2000. Expression of Water Channel Proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. Plant Physiol. 123: 111-124

Kjær, D., Kjær, A., Pedersen, C., Bu'Lock, J.D. & Smith, J.R. 1971. Bikaverin and Norbikaverin, Benzoxanthentrione Pigments of *Gibberella fujikuroi*. J. Chem. Soc. (C): 2792-2797

Klingenhagen, G. & Frahm, J. 1999. Fusariumbefall im Getreide. GetreideMagazin 5(2)

Klussmann E., Maric, K. & Rosenthal, W. 2000. The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 141: 33-95

Knepper, M.A. 1994. The aquaporin family of molecular water channels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 6255-6258

Koga, H. 1995. An electron microscopy study of the infection of spikelets of rice by *Pyricularia oryzae*. J. Phytopathol. 143: 439-445

Köller, W., Parker, D.M. & Becker, C.M. 1991. Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. Phytopathology 81: 1375-1379

Koutz, P., Davis, G.R., Stillman, C., Barringer, K., Cregg, J. & Thill, G. 1989. Structural comparison of the *Pichia pastoris* alcohol oxidase genes. Yeast 5(3): 167-177

Kováč, L., Bömerová & Fuska, J. 1978. Inhibition of mitochondrial functions by the antibiotics, bikaverin and duclauxine. Journal of Antibiotics 31 (6):616-620

Kreitmann, G. & Nord, F.F. 1949. Lycopersin, pigment of *Fusarium lycopersici*. Arch. Biochem. 21: 457-458

Kruger, W.M., Pritsch, C., Chao, S. & Muehlbauer, G.J. 2001. Functional and Comparative Bioinformatic Analysis of Expressed Genes from Wheat Spikes Infected with *Fusarium graminearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 15(5): 445-455

Kwon-Chung, K.J.& Rhodes, J.C. 1986. Encapsulation and melanin in *Cryptococcus neoformans*. Infect. Immun. 51: 218-223

Lagrée, V., Froger, A., Deschamps, S., Hubert, J.-F., Delamarche, C., Bonnec, G., Thomas, D., Gouranton, J & Pellerin, I. 1999. Switch from an Aquaporin to a Glycerol Channel by Two Amino Acids Substitution

Lagrée, V., Froger, A., Deschamps, S., Pellerin, I., Delamarche, C., Bonnec, G., Gouranton, J., Thomas, D. & Hubert, J.-F. 1998. Oligomerization State of Water Channels and Glycerol Facilitators - Involvement of Loop E. J. Biol. Chem. 273(51): 33949-33953

Laize, V., Tacnet, F., Ripoche, P. & Hohmann, S. 2000. Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* aquaporins. Yeast 16(10): 897-903

Lal, R., Kumari, R., Kaur, H., Khanna, R., Dhingra, N. & Tuteja, D. 2000. Regulation and manipulation of the gene clusters encoding type-I PKSs. Trends in Biotechnology 18: 264-274

Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H., Schmidt, A., Wanner, G. & Brakhage, A.A. 1998. Identification of polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. Med. Microbiol. Immunol. 187: 79-89

Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G. & Brakhage, A.A. 2003. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. Fungal Genetics and Biology 38: 143-158

Leach, J., Lang, B.R. & Yoder, O.C. 1982. Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus.* J. Gen. Microbiol. 128: 1719-1729.

Ledeboer, A.M., Edens, L., Maat, J., Visser, C., Bos, J.W., Verrips, C.T., Janowicz, Z., Eckart, M., Roggenkamp, R. & Hollenberg, C.P. 1985. Molecular cloning and characzterization of a gene coding for methanol oin *Hansenula polymorpha*. Nucleic Acids Res. 13(9): 3063-3082

Levings, C.S. & Siedow, J.N. 1992. Molecular basis of disiease susceptibility in the Texas cytoplasm of maize. Plant Molecular Biology 19: 135-147

Linnemannstöns, P., Schulte, J., del Mar Prado, M., Proctor, R.H., Avalos, J. & Tudzynski, B. 2002. The polyketide synthase gene *pks4* from *Gibberella fujikuroi* encodes a key enzyme in the biosynthesis of the red pigment bikaverin. Fungal Genetics and Biology 37: 134-148

Liu, Y.G. & Whittier, R.F. 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from YAC clones for chromosome walking. Genomics 25: 674-681.

Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. & Whittier, R.F. 1995. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. Plant J. 8(3): 457-63

Lösch, A. P. 1997. Promotorsuche und Mutagenese bei dem gerstenpathogenen Pilz *Pyrenophora teres* durch REMI-(restriction enzyme mediated integration)-Transformation mit Fremd-DNA. Diplomarbeit Universität Hamburg.

Ludevid, D., Höfte, H., Himelblau, E. & Chrispeels M.J. 1992. The expression pattern of the tonoplast intrinsic protein γ-TIP in *Arabidopsis thaliana* is correlated with cell enlargement. Plant Physiol. 100: 1633-1639

Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. & Hohmann, S. 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. EMBO J. 14(7): 1360-1371

Ma, T., Yang, B. & Verkman, A.S. 1996. Gene structure, cDNA cloning & expression of a mouse mercurial-insensitive water channel. Genomics 33 (3): 382-388

Maier, F.J. & Schäfer, W. 1999. Mutagenesis via Insertional- or Restriction Enzyme-Mediatet-Integration (REMI) as a Tool to Tag Pathogenicity Related Genes in Plant Pathogenic Fungi. Biol. Chem. 380: 855-864

Malalasekera, R.A.P., Sanderson, F.R. & Colhoun, J. 1973. Fusarium disease of cereals. IX. Penetration and invasion of wheat seedlings by *Fusarium culmorum* and *F. nivale*. Trans. Br. Mycol. Soc. 60: 453-462

Malz, S. & Sauter, M. 1999. Expression of two PIP genes in rapidly growing internodes of rice is not primarily controlled by meristem activity or cell expansion. Plant Molecular Biology 40: 985-995

Mattick, J.S. & Gagen, M.J. 2001. The Evolution of Controlled Multitasked Gene Networks: The Role of Introns and Other Noncoding RNAs in the Development of Complex Organisms. Mol. Biol. Evol. 18(9):1611–1630

Maurel, C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 399-429

Maurel, C., Kado, R.T., Guern, J. & Chrispeels, M.J. 1995. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin α-TIP. The EMBO Journal 15 (13), 3028-3035

Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I., Chrispeels, M.J. & Saier, M.H. 1994. Functional Characterization of the Escherichia coli Glycerol Facilitator, GlpF, in *Xenopus* Oocytes. J. Biol. Chem. 269(16): 11869-11872

Maurel, C., Reizer, J., Schroeder, J.I. & Chrispeels, M.J. 1993. The vacuolar membrane protein γ-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. The EMBO Journal 12 (6), 2241-2247

Mayorga, M.E. & Timberlake, W.E. 1992. The developmantally regulated *Aspergillus nidulans wA* gene encodes a polypeptide homologous to polyketide and fatty acid synthases. Mol Gen Genet, 235: 205-212

McInnes, A.G., Walter, J.A., Smith, D.G., Wright, J.L. & Vining, L.C. 1976. Biosynthesis of bikaverin in *Fusarium oxysporum*. Use of 13C nuclear magnetic resonance with homonuclear 13C decoupling to locate adjacent 13C labels. J. Antibiot. (Tokyo) 29(19): 1050-1057

McMullen, M., Jones, R. & Gallenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. Plant Dis. 81: 1340-1348

Metz, J.G., Roessler, P., Facciotti, D., Levering, C., Dittrich, F., Lassner, M., Valentine, R., Lardiabal, K., Domergue, F., Yamada, A., Yazawa, K., Knauf, V. & Browse, J. 2001. Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases in Both Prokaryotes and Eukaryotes. Science 293: 290-293

Miller, J.D. 1999. Type 2 Resistance & Other Thoughts on *Fusarium*. Canadian Workshop on Fusarium Head Blight. Winnipeg, Manitoba, November 28 – 30. 1999.

Miller, J.D., Young, J.C. & Trenholm, H.L. 1993. Fusarium toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. Canadian Journal of Botany 61: 3080-3087

Mizuguchi, K., Deane, C.M., Blundell, T.L. & Overington, J.P., 1998. HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. Protein Sci., 7, 2469-2471.

Mönke, E. & Schäfer, W. 1993. Transient and stable gene expression in the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* after transformation with the β-glucuronidase (GUS) gene. Mol. Gen. Genetic 241: 73-80

Muller, P.Y., Studer, E. & Miserez, A.R. 2001. Molecular BioComputing Suite: A Word Processor Add-In for the Analysis and Manipulation of Nucleic Acid and Protein Sequence Data. BioTechniques 31:1306-1313

Mullis, K. B. 1990. Eine Nachtfahrt und die Polymerase Ketten Reaktion. Spektrum der Wissenschaft 6:60-67.

Nicholson, P., Simpson, D.R., Eston, G.W., Rezanoor, H.N., Lees, A.K., Parry, D.W. & Joyce, D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology 53: 17-37

Nirenberg, H.I. 1981. A simplified method for identifying *Fusarium* ssp. occurring on wheat. Canadian J. Botany 59: 1599-1609

Nishimura, M., Maeshima, M., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Kinoshita, T., Kato, A., Hiraiwa, N., Mano, S., Hayashi, H., Yamada, K. Takemoto, D., Tachibe, Y., Kondo, M., Yamaguchi, K., Melgarejo, L. M., Koumoto, Y. & Kuroyanagi, M. 1996. http://www.nibb.ac.jp/annual_report/ 1996/05.html

Okigbo, R.N. 2003. Mycoflora of tuber surface of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir) and postharvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. Mycopathologia 156(2): 81-85

Ouyang, L.J., Whelan, J., Weaver, C.D., Roberts, D.M. & Day, D.A. 1991. Protein phosphorylation stimulates the rate of malate uptake across the peribacteroid membrane of soybean nodules. FEBS Lett. 293: 188-190

Ozimek, P., van Dijk, R., Latchev, K., Gancendo, C., Wang, D.Y., van der Klein, I.J. & Vennhuis, M. 2003. Pyruvate Carboxylase Is an Essential Protein in the Assembly of Yeast Peroxisomal Oligomeric Alcohol Oxidase. Molecular Biology of the Cell 14: 786-797

Paitan, Y., Alon, G., Orr, E., Ron, E.Z. & Rosenberg, E. 1999. The First Gene in the Biosynthesis of the Polyketide Antibiotic TA of *Myxococcus xanthus* Codes for a Unique PKS Module Coupled to a Peptide Synthetase. J. Mol. Biol. 286: 465-474

Paques, F. & Haber, J.E. 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 349-404

Phillips, A.L. & Huttly, A.K. 1994. Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel, γ-TIP, is increased by GA_3. Plant Mol. Biol. 24: 603-615

Polacheck, I. & Kwon-Chung, K.J. 1988. Melanogenesis in *Cryptococcus neoformans*. J. Gen. Microbiol. 134: 1037-1041

Polak, A. 1989. Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. Mycoses 33: 215-224

Preston, G.M., Caroll, T.P., Guggino, W.B. & Agre, P. 1992. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. Science 256, 385-387

Pritsch, C., Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R., Somers, D.A. & Vance, C.P. 2000. Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions 13(2): 159-168

Pritsch, C., Vance, C.P., Bushnell, W.R., Somers, D.A., Hohn, T.M. & Muehlbauer, G.J. 2001. Systemic expression of defence response genes in wheat spikes as a response to *Fusarium graminearum* infection. Physiological and Molecular Plant Pathology 58: 1-12

Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. & Hohn, T. 1999. A Polyketide Synthase Gene Required for Biosynthsis of Fumonisin Mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* Mating Poppulation A. Fungal Genetics and Biology 27: 100-112

Proctor, R.H., Hohn, T.M. & McCormick, S.P. 1995. Reduced Virulence of Giberella zeae Caused by Duisruption of a Trichothecene Toxin Biosynthetic Gene. Molecular Plant-Microbe Interact. 8 (4):593-601

Proctor, R.H., Hohn, T.M. & McCormick, S.P. 1997. Restoration of wild-type virulence to *Tri5* disruption mutants of *Gibberella zeae* via gene reversion and mutant complementation. Microbiology 143: 2583-2591

Punt, P.J., Olive, R.P., Dingmanse, M.A., Pouwels, P.H. & van den Hondel, C.A.M.J.J. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene 36: 117-124

Quigley, F., Brinkmann, H., Martin, W.F. & Cerff, R. 1989. Strong functional GC pressure in a light-regulated maize gene encoding subunit GAPA of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: implications for the evolution of GAPA pseudogenes. J Mol Evol 29(5): 412-21

Raper, K.B. & Thorn, C. 1949. A Manual of the Penicillia. Waverly Press Inc., The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 64-65.

Reizer, J., Reizer A. & Saier M.H., Jr 1993. The MIP family of integral membrane channel proteins: sequence comparisons, evolutionary relationships, reconstructed pathway of evolution, and proposed functional differentiation of the two repeated halves of the proteins. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28, 235-257

Remize, F., Barnavon, L. & Dequin, S. 2001. Glycerol export and glycerol-3-phosphate dehydrogenase, but not glycerol phosphatase, are rate limiting for glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Metab. Eng. 3(4): 301-312

Rhoads, D.M., Levings, C.S. & Siedow, J.N. 1995. URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. J. Bioenerg. Biomebr. 27: 437-445

Rodemann, B. 1999. Mykotoxine im Getreide. http://www.verbraucherministerium.de/forschungs-report/rep2-99/getreide.htm

Rose, M.S., Yun, S.-H., Asvarak, T., Lu, S.-W., Yoder, O.C. & Turgeon, B.G. 2002. A Decarboxylase Encoded at the *Cochliobolus heterostrophus* Translocation-Associated Tox1B Locus Is Required for Polyketide (T-toxin) Biosynthesis and High Virulence on T-cytoplasm Maize. Mol Plant Microbe Interact. 15: 883-893

Royer, J.C., Christianson, L.M., Yoder, W.T., Gambetta, G.A., Klotz, A.V., Morris, C.L., Brody, H. & Otani, S. 1999. Deletion of the Trichodiene Synthase Gene of *Fusarium venenatum*: Two Systems for Repeated Gene Deletions. Fungal Genetics and Biology 28: 68-78

Royer, J.C., Moyer, D.L., Reiwitch, S.G., Madden, M.S., Jensen, E.B., Brown, S.H., Yonker, C.C., Johnstone, J.A., Golightly, E.J., Yoder, W.T. & Shuster, J.R. 1995. *Fusarium graminearum* A 3/5 as a Novel Host for Heterologous Protein Production. Bio/Technology 13: 1479-1483

Ruiter, R.K., van Eldik, G.J., van Herpen, M.A.M, Schrauwen, J.A.M. & Wullems, G.J. 1997. Expression in anthers of two genes encoding *Brassica oleracea* transmembrane channel proteins. Plant Mol. Biol. 34: 163-168

Sakai, Y. & Tani, Y. 1992. Cloning and sequencing of the alcohol oxidase-encoding gene (AOD1) from the formaldehyde-producing asporogeneous methyltrophic yeast, Candida boidinii S2. Gene 114(1): 67-73

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

Sandal, N.N. & Marcker, K.A. 1988. Soybean nodulin 26 is homologous to the major intrinsic protein of the lens fiber membrane. Nucl. Acids Res. 16: 9347

Schaefer, D.G. 2001. Gene targeting in *Physcomitrella patens*. Current Opinion in Plant Biology 4: 143-150

Schäffner, A.R. 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? Planta 204: 131-139

Schiestl, R.H. & Petes, T.D. 1991. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7585-7589

Schnitzler, N., Peltroche-Llacsahuanga, H., Bestier, N., Zündorf, J., Lütticken, R. & Haase, G. 1999. Effect of melanin and carotenoids of *Exophiala* (*Wangiella*) *dermatitidis* of phagocytosis, oxidative burst, and killing by human neutrophils. Infect. Immun. 67: 94-101

Schreiner, E., Holzmann, K. & Schwab, H. 1995. Molecular and functional characterization of the specifically regulated aox gene of *Penicillium chrysogenum*. The 18th Fungal Genetics Confrence, Asilomar, California

Schroeder, H.W. & Christensen, J.J. 1963. Factors Affecting Resistance of Wheat to Scab Caused by *Gibberella zeae*. Phytopathology 53: 831-838

Segers, G., Bradshaw, N., Archer, D., Blissett, K. & Oliver, R.P. 2001. Alcohol oxidase is a novel pathogenicity factor for *Cladosporium fulvum*, but aldehyde dehydrogenase is dispensable. Mol Plant Microbe Interact. 14(3): 367-377

Shortle, D., Haber, J.E. & Botstein, D. 1982. Lethal Disruption of the yeast Actin Gene by Integrative DNA Transformation. Science 217: 371-373

Siedow, J.N., Rhoads, D.M., Ward, G.C. & Levings, C.S. 1995. The relationship between the mitochondrial gene T-urf13 and fungal pathotoxin sensitivity in maize. Biochim. Biophys. Acta 1271: 235-240

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517.

Srikantha, T., Morrow, B., Schröppel, K. & Soll, D.R. 1995. The frequency of integrative transformation at phase specific genes of *Candida albicans* correlates with their transcriptional state. Mol. Gen. Genet. 246: 342-352

Stamer, W.D., Bok, D., Hu, J., Jaffe, G.J. & McKays, B.S. 2003. Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44(6): 2803-2808

Steele, J.A., Lieberman, J.R. & Mirocha, C.J. 1974. Biogenesis of zearalenone (F-2) by *Fusarium roseum* ‚Graminearum'. Can. J. Microbiol. 20: 531-534

Stewart, M.Q., van Dijk, R., Veenhuis, M. & Goodman, J.M. 2002. Monomeric alcohol oxidase is preferentially digested by a novel protease from *Candida boidinii*. Biochim. Biophys. Acta 1542(1-3): 160-172

Steyn, P.S. 1992. The biosynthesis of polyketide-derived mycotoxins. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 11(1): 47-59

Strange, R.N., Majer, J.R. & Smith, H. 1974. The isolation and identification of choline and betaine as the two major components in anthers and wheat germ that stimulate *Fusarium graminiarum in vitro*. Physiological Plant Pathology 4: 277-290

Sweeny, M.J. & Dobson, A.D.W. 1999. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. FEMS Microbiology Letters 175: 149-163

Takano, Y., Kubo, Y., Shimizu, Y., Mise, K., Okuno T. & Furusawa, I. 1995. Structural analysis of *PKS1*, a polyketide synthase gene involvesd in melanin biosynthesis in *Colletotrichum lagenarium*. Mol. Gen. Genet. 249: 162-167

Tamas, M.J., Karlgren, S., Bill, R.M., Hedfalk, K., Allegri, L., Ferreira, M., Thelevein, J.M., Rydstrom, J., Mullins, J.G. & Hohmann, S. 2003. A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1p. J. Biol. Chem. 278(8): 6337-6345

Tamas, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M. & Hohmann, S. 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. Mol. Microbiol. 31(4): 1087-1104

Taylor, B.E., Wheeler, M.H. & Szaniszlo, P.J. 1987. Evidence for pentaketide melanin biosynthesis in dematiaceous human pathogenic fungi. Mycologia 79: 320-322

Thompson, J.E., Fahnestock, S., Farrall, Liao, D.-I., Valent, B. & Jordan, D.B. 2000. The second Naphthol Reductase of Fungal Melanin Biosynthesis in *Magnaportha grisea*. The Journal of Biological Cemistry 275(45): 34867-34872

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 24:4876-4882.

Thyagarajan, B., Johnson, B. & Campbell, C. 1995. The effect of target site transcription on gene targeting in human cells in vitro. Nucleic Acids Res. 23: 2784-2790

Townsend, C.A. 2003 Townsend Research Overview. http://www.jhu.edu/~chem/ townsend/Researchoverview.html

Tsai, H.F., Chang, Y.C., Washburn, R.G., Wheeler, M.H. & Kwon-Chung K.J. 1998. The Developmentally Regulated *alb1* Gene of *Aspergillus fumigatus*: Its Role in Modulation of Conidial Morphology and Virulence. Journal of Bacteriology 180(12): 3031-3038

Tsai, H.F., Washburn, R.G., Chang, Y.C. & Kwon-Chung, K.J. 1997. *Aspergillus fumigatus arp1* modulates conidial pigmentation and complement deposition. Molecular Microbiology 26(1): 175-183

Tsai, H.F., Wheeler, M.H., Chang, Y.C. & Kwon-Chung K.J. 1999. A Developmantally Regulated Gene Cluster Involved in Conidial Pigment Biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. Journal of Bacteriology 181(20): 6469-6477

Tsukaguchi, H., Shayakul, C., Berger, U.V., Mackenzie, B., Devidas, S., Guggino, W.B., van Hoek, A.N. & Hediger, M.A. 1998. Molecular Characterization of a Broad Selectivity Neutral Solute Channel. J. Biol. Chem. 273(38): 24737-24743

Tuite, J. and Shaner, G. 1990. Wheat Scab in Soft Red Winter Wheat in India in 1986 and Ist Relation to Some Quality Measurements. Plant Dis. 74:959-962

Turgeon, B.G., Kodama, M., Yang, G., Rose, M.S., Lu, S.W. & Yoder, O.C. (1995). Function and chromosomal location of the Cochliobolus heterostrophus Tox1 locus. Can. J. Bot. 73: S1071-S1076

Van Aelst, L., Hohmann, S., Zimmermann, F.K., Jans, A.W. & Thevelein, J.M. 1991. A yeast homologue of the bovine lens fibre MIP gene family complements the growth defect of *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not ist defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signalling. EMBO J. 10(8): 2095-2104

Van der Klei, I.J., , Bystrykh, L.V. & Harder, W. 1990. Alcohol Oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732. Methods in Enzymology 188: 420-427

Van der Klei, I.J., Sulter, G.J., Harder, W. & Veenhuis, M. 1991. Assembly of alcohol oxidase in the cytosol of a peroxisome-deficient mutant of *Hansenula polymorpha* – properties of the protein and architecture of the crystals. Yeast 7: 195-209

Verkman, A.S. & Mitra, A.K. 2000. Structure and function of aquaporin water channels. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 278: F13-F28

Verkman, A.S. 2003. Role of aquaporin water channels in eye function. Exp. Eye Res. 76(2): 137-143

Virkki, L., Frankes, C., Somieski, P. & Boron, W.F. 2002. Cloning and Functional Characterization of a Novel Aquaporin from *Xenopus laevis* Oocytes. J. Biolog. Chem. 277(43): 40610-40616

Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. & Merrill Jr., A.H. 1991. Inhibition of Sphingolipid Biosynthesis by Fumonisin. Journal of Biological Chemistry 266(22): 14486-14490

Wang, Y.Z. & Miller, J.D. 1988. Effects of *Fusarium graminearum* metabolites on wheat tissue in relation to *Fusarium* head blight resistance. J. Phytopathol. 122: 118-125

Watanabe, C.M. & Townsend C.A. 2002. Initial characterization of a type I fatty acid synthase and polyketide synthase multienzym complex NorS in the biosynthesis of aflatoxin B(1). Chem. Biol. 9(9): 981-988

Waterham, H.R., Russell, K.A., de Vries, Y. & Cregg, J.M. 1997. Peroxisomal Targeting, Import, and Assembly of Alcohol Oxidase in *Pichia pastoris*. J. Cell Biol. 139(6): 1419-1431

Weaver, C.D., Crombie, B., Stacey, G. & Roberts, D.M. 1991. Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules: Evidence for phosphorylation of nodulin 26. Plant Physiol. 95: 222-227

Wharton, P.S., Julian, A.M. & O'Connell, R.J. 2001. Ultrastructure of the Infection of Sorghum bicolor by Colletotrichum sublineolum. Phytopathology 91(2): 149-158

Wheeler, H. 1977. Ultrastructure of penetration by *Helminthosporium maydis*. Physiol. Plant Pathol. 11:171-178

Wierenga, R.K., Terpstra, P. & Hol, W.G.J. 1986. Predictions and occurrence of the ADP-binding βαβ-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. J. Mol. Biol. 187:101-107

Williamson, P.M., Sivasithamparam & Cowling, W.A. 1991. Formation of subcuticular coralloid hyphae by *Phomopsis leptostromiformis* upon latent infection of narrow-leafed lupins. Plant Dis. 75: 1023-1026

Yamada, S, Katsuhara, M., Kelly, W.B., Michalowski, C.B. & Bohnert, H.J. 1995. A family of transcripts encoding water channel proteins: Tissue-specific expression in the Common Ice Plant. The Plant Cell 7: 1129-1142

Yang, G., Rose, M.S., Turgeon, B.G. & Yoder, O.C. 1996. A Polyketide Synthase is Required for Fungal Virulence and Production of the Polyketide T-Toxin. The Plant Cell 8: 2139-2150

Yoder, O.C. & Gracen, V.E. 1974. Segregation of Pathogenicity Types and Host-Specific Toxin Production in Progenies of Crosses between Races T and O of *Helminthosporium maydis* (*Cochliobolus heterostrophus*). Phytopathology 65: 273-276

Yoder, O.C. & Turgeon, B.G. 2001. Fungal genomics and pathogenicity. Curr. Opin. Plant. Biol. 4(4): 315-321

Yoder, O.C. 1973. A selective toxin produced by *Phyllosticta maydis*. Phytopathology 63: 1361-1365

Yoder, O.C. 1988. *Cochliobolus heterostrophus*, cause of the southern corn leaf blight. Adv. Plant Pathol. 6(6): 93-122. Academic Press.

Young, J.C., Miller, J.D. 1985. Appearance of fungus, ergosterol and Fusarium mycotoxins in the husk, axial stem and stalk after ear inoculation of field corn. Canadian Journal of Plant Sciences 65: 47-53

Yu, T.-W., Shen, Y., Doi-Katayama, Y., Tang, L., Park, C., Moore, B.S., Hutchinson, C.R. & Floss, H.G. 1999 Direct evidence that rifamycin polyketide synthase assembles polyketide chains processively. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 9051-9056

Yun, S.-H., Turgeon, B.G. & Yoder, O.C. 1997. Comparative genetics of polyketide toxin production by *Mycospaerella zeae-maydis* and *Cochliobulus heterostrophus*. The 19th Fungal Genetics Conference, Asilomar, California

Yun, S.-H., Turgeon, B.G. & Yoder, O.C. 1998. REMI-induced mutants of Mycosphaerella zeae-maydis lacking the polyketide PM-toxin are deficient in pathogenesis to corn. Physiological and Molecular Plant Pathology. 52: 53-66

Anhang

A. Aquaporin

5'-TCCGGCGGCCACATGAATCCGGCTGTCACCATGGCCATGTTGATGGTCAAGGCCATCAG

CGTCACAAGAGCCATTGTTCTGTTCCTCGCTCAAATTCTCGGGTCTATGCTTGCCTCTGTTG

← AQP37InvA

TTGTACGCTACCTCTTCCCTGAAACATTCAACGTTCGAACCACTCTTGGTGGCG**GTGCATCT**

AQP37InvB →

CTGGTCCAGGGTGTC**TTCATC**GAG***GCT***CTTC**T**TACTGCTGAACTGGTCTTTAC**TATCTTTAT

AGC

GCTTGCCAAGGAGAAGCACCGAGCCACTTTCATTGCTCCCGTCGGTATTGGTCTGGCTCTTT

TCATCGCTGAGATGGTCGGAGTCCAGTTCACTGGAGGTTCTCTCAACCCTGCACGTAGCTTT

GGTCCTTGTGTCATCACCGGTAGCTTCGATACCGAGCACTGGGTTTACTGGATCGGCCCCTT

C-3'

Abb. 47: Aquaporinteilsequenz aus *F. graminearum*, wie sie im Vektor pGEM-T/AQPFg-37 vorliegt. Der Vektor wurde als Template für eine Inverse PCR mit den angegebenen Primern AQP37InvA und AQP37InvB (fett) eingesetzt. Durch diese wurde eine Schnittstelle (Eco47III: AGCGCT, kursiv-fett und unterstrichen) eingefügt. Des weiteren erfolgte eine Deletion von Einzelbasen (Normalschrift, unterstrichen) durch den Einsatz der Primer (gekennzeichnete Basen fehlen in der Primersequenz).

```
-182                                                  ag
                    AQPgrF →
-180 ttttacagcagtgacgaccctagtatacctcccaacgacagacgg
-135 aggatgatggatgaagaggcaggctaccctggtcgacctcatgct
 -90 ttccgacgcacttccactctcaacggcttcaacatcaccacaggc
 -45 aggcttcagtggaacgagttgagccgacaggagaagtccgagatc
   AQPFB →
   1 ATGCGTCTTCCATTGACACAGTGGATGAACTCGAATTTCAAGAAC
   1  M  R  L  P  L  T  Q  W  M  N  S  N  F  K  N

  46 TACTTCGTTGCCGGTGTAGGAGAGTTTATTGGCACCACTATGTTC
  16  Y  F  V  A  G  V  G  E  F  I  G  T  T  M  F

  91 CTTTTCTTTGCCTCTGCTGGTACAGAGGTCGCCAACATCCAGGCC
  31  L  F  F  A  S  A  G  T  E  V  A  N  I  Q  A

 136 GACACCACCAACAGGACCGCCACTGGTGAATCTACCGGTAGTCTC
  46  D  T  T  N  R  T  A  T  G  E  S  T  G  S  L

 181 AACGTTTCCAAACTCCTCTACATCTCTATCATCTTCGGTTTCTCT
  61  N  V  S  K  L  L  Y  I  S  I  I  F  G  F  S
```

```
                AQP3'a →                                ↓
 226 CTCATGGTCAACGTCTGGGTCTTCTTCCGTATCTCCGGCGGCCAC
  76  L  M  V  N  V  W  V  F  F  R  I  S  G  G  H

                                                  AQP3'SM →
 271 ATGAATCCGGCTGTCACCATGGCCATGTTGATGGTCAAGGCCATC
  91  M  N  P  A  V  T  M  A  M  L  M  V  K  A  I

                                          ← SMTAIL3FAQP
 316 AGCGTCACAAGAGCCATTGTTCTGTTCCTCGCTCAAATTCTCGGG
 106  S  V  T  R  A  I  V  L  F  L  A  Q  I  L  G

 361 TCTATGCTTGCCTCTGTTGTTGTACGCTACCTCTTCCCTGAAACA
 121  S  M  L  A  S  V  V  V  R  Y  L  F  P  E  T
        ← SMTAIL2FAQP
 406 TTCAACGTTCGAACCACTCTTGGTGGCGGTGCATCTCTGGTCCAG
 136  F  N  V  R  T  T  L  G  G  G  A  S  L  V  Q
                          SMTAIL1RAQP →← SMTAIL1FAQP
 451 GGTGTCTTCATCGAGGCTCTTCTTACTGCTGAACTGGTCTTTACT
 151  G  V  F  I  E  A  L  L  T  A  E  L  V  F  T

 496 ATCTTTATGCTTGCCAAGGAGAAGCACCGAGCCACTTTCATTGCT
 166  I  F  M  L  A  K  E  K  H  R  A  T  F  I  A
        SMTAIL2RAQP →
 541 CCCGTCGGTATTGGTCTGGCTCTTTTCATCGCTGAGATGGTCGGA
 181  P  V  G  I  G  L  A  L  F  I  A  E  M  V  G

 586 GTCCAGTTCACTGGAGGTTCTCTCAACCCTGCACGTAGCTTTGGT
 196  V  Q  F  T  G  G  S  L  N  P  A  R  S  F  G
                    SMTAIL3RAQP →        ← AQP5'SM
 631 CCTTGTGTCATCACCGGTAGCTTCGATACCGAGCACTGGGTTTAC
 211  P  C  V  I  T  G  S  F  D  T  E  H  W  V  Y
                      ↓   ← AQP5'a
 676 TGGATCGGCCCCTTCATCGGTTCTCTGATCGCCGTGTGCTTCTAC
 226  W  I  G  P  F  I  G  S  L  I  A  V  C  F  Y

 721 TGGTTCATCAAGACCCTGGAATACGAGATGGCCAATCCTGGCGCC
 241  W  F  I  K  T  L  E  Y  E  M  A  N  P  G  A

 766 GACGGTGACGATCTCAACGACCCTACCAAGAACCCTGAAAAGCGA
 256  D  G  D  D  L  N  D  P  T  K  N  P  E  K  R

 811 GCAGAGATCCAAGCTTCCAAGCCAGTTCCCACAGCCGCCTTTGGC
 271  A  E  I  Q  A  S  K  P  V  P  T  A  A  F  G

 856 TCTGGCAAGACCGCTTCTATTCTCAGTTAGtgtttgagcttgttt
 286  S  G  K  T  A  S  I  L  S  *

 901 caacatgactgcaatgaacggaaacgataaacatgattcatgaat
 946 gtaacatttcaggaaacagaatgcgataagtgccatgaaatttag
 991 gattttggcacaagattgtacccagcaagaacttgggattagtct
1036 aaaacagaacgattgttggagttagctttggcgtttctattatgg
1081 gagttataagtgttgtaaataggaatacatatatcgatctactcg
1126 tttgagaccatggcatcgtcatcatcaccaccaaaatatctgtga
```

```
1171 tagtttaagcgatcttcattgtagctgaaagcggcagcaatcggt
1216 gaagattatatttatttatcggttaaacacgacacgatacgtgga
1261 tcgttat**aataa**ggaccgaaacaagcttgaagtcatgatgtgctc
                          ← AQPGRR-2
1306 aacaggttgccaggga**gaatctgcttgaatgcctgcg**aggtagcc
1351 tcgtgatctctttcaacacggacgtatgttattcttgctagaact
1396 gagtttgtcgctttttgacttcgttctgtttcggtcaggtgccat
1441 ctctaccagagagatgacacatagaagtctccagaagcagctggt
1486 caccttgggcattaggttaacgccagactggggtagcgttgtcct
1531 cacgatcacactctactaatcactagtgcggccgcctgcaggtcg
1576 accatatgggagagctcccaacgcgttggatgcatagcttgagta
```

Abb. 48: Putative Proteinsequenz des AQP aus *F. graminearum*, abgeleitet von der ebenfalls dargestellten genomischen Nukleinsäuresequenz. Eine mögliche Intronsequenz ist markiert (Aminosäuren in diesem Bereich fett, kursiv, unterstrichen, vgl. Text). Im 5‘ Bereich ist das Start-Codon (fett, nt 1 bis 3) zu erkennen. Eine mögliche TATA Box konnte nicht identifiziert werden. Im 3‘-Bereich liegen das Stop-Codon (fett, nt 883 bis 885) und ein mögliches Polyadenylierungssignal (fett, nt 1268 bis 1272), wobei hier die Sequenz von der sonst konservierten Basenabfolge (AATAAA) abweicht. Ebenfalls dargestellt sind die für die Analyse der AQP-Sequenz eingesetzten Primer (fett und beschriftet). Die sechs putativen Transmebranbereiche des Proteins sind rot unterlegt. Der Beginn und das Ende des ursprünglichen Fragments, welches auch die homologe Sequenz des K.O.-Vektors beinhaltet, ist durch Pfeile (von oben nach unten) gekennzeichnet. Des weiteren sind die zwei für die Mitglieder der MIP-Genfamilie typischen NPA-Motive markiert (schwarz unterlegt).

```
FgAQP          ------------------------MRL---------------PLTQWMN----------SNF
AQY1_YEAST     ----------MSSNDSNDTDKQHTRLDPTGVDDAYIPPEQPETKHHRFKISR-----DTL
                                        **              * *:  .          ..:

FgAQP          KNYFVAGVGEFIGTTMFLFFASAGTEVANIQADTTNRTATGESTGSLN--VSKLLYISII
AQY1_YEAST     RDHFIAAVGEFCGTFMFLWCAYVICNVANHDVALVAAPD-GSHPG-------QLIMIAIG
               :::*:*.**** ** ***: * .  :*** :.  .  .  *. .*       :*: *:*

FgAQP          FGFSLMVNVWVFFRISGGHMNPAVTMAMLMVKAISVTRAIVLFLAQILGSMLASVVVRYL
AQY1_YEAST     FGFSVMFSIWCFAGVSGGALNPAMSLSLCLARAVSPTRCVVMWVSQIVAGMAAGGAASAM
               ****:*..:* *  :*** :***::::: :.:*:* **.:*::::**:..* *. ..  :

FgAQP          FP-ETFNVRT---TLGGGASLVQGVFIEALLTAELVFTIFMLAKEKHR--ATFIAPVGIG
AQY1_YEAST     TPGEVLFAN----SLGLGCSRTRGLFLEMFGTAILCLTVLMTAVEKRE--TNFMAALPIG
                * *.: ..    :** *.* .:*:*:* : ** * :*::* * **:.  :.*:*.: **

FgAQP          LALFIAEMVGVQFTGGSLNPARSFGPCVITGSFDTEHWVYWIGPFIGSLIAVCFYWFIKT
AQY1_YEAST     ISLFIAHVALTAYTGTGVNPARSLGAAVAARYFPHYHWIYWIGTLLGSILAWSVWQLLQI
               ::****.:. . :** .:*****:*..* :  *   **:****.::**::* ..: :::

FgAQP          LEYEMAN------PGADGDDLNDPTKNPEKRAEIQASKPVP-------------TAAFGS
AQY1_YEAST     LDYTTY---------VTAEKAASTKEKAQKKGETSSSSAVA--------------EV---
               *:*            . .:.  ...::.:*:.* .:*..*.              .

FgAQP          GKTASILS-------------------------
AQY1_YEAST     ---------------------------------
```

Das mit ClustalX erzeugte Alignment zeigt die folgenden statistischen Werte der Übereinstimmung zwischen den Proteinstrukturen:

```
         AQY1_YEAST

  FGAQP    29%     Identität
           48%     Juxtaposition größer als Null
           16%     Aligned mit Lücken
```

Abb. 49: Homologievergleich zwischen dem AQP aus *F. graminearum* (FgAQP) und dem AQY1 aus *S. cerevisiae* (P53386). Die für Mitglieder der MIP Familie typischen NPA- und HW[V/I][F/Y]WXGP-Motive sind schwarz unterlegt. Die für Aquaporine (gegenüber Glyceroltransportern) konservierten Aminosäuren sind markiert (fett und unterstrichen). Ferner sind putative Phosphorylierungsstellen in der *Fusarium*-Sequenz schwarz unterlegt. Zeichen in der Consensusreihe: `*`, identische Aminosäuren in beiden Sequenzen des Alignments; `:`, konservierte Substituenten; `.`, semikonservierte Substituenten.

B. Alkoholoxidase

5'-TGCCAGAGGACGAGACAAGGGGGTATTTGACGANTGGAACTGAAGGGTACTGGACCGCTTGCCACCAAC
GGTATCGAGGCCGGTGTCAAGATCCGACCAACTGAGCAGGAACTCAAGGAGTTTGAGAGGTGGCCCACTCCT
CATTTCACCGACGGATGGAAGTCCTACTTCAAGAACAAGCCTGACGAGCCCGTCATGCATTACTCTGTGATT
GCTGGTTTCTTCGGCGACCACATGCTCATGCCTCCTGGAAAGTTCTTCTCCATGTTCCATTTC**CTCGAG**TAC
CCCTTCTCTCGTGGATTCACTCACATCAAGAGTGCTGATCCTTATGACGCTCCCGATTTTGATACTGGTTTC
ATGAACGATGAGCGAGACATGGTTCCTATGGTCTGGGGATACATCAAGTCGCGTGAGACTGCTCGCCGCATG
GACGCATACGCCGGCGAAGTCGAGAACATGCACCCCTTCTTTGACTATGATAGTCCCGCCCGTGCTCATGAT
CTCGACTCCAGACCACCAAGGCATACGCCCTCCCCGGTAACCTTACCGCTGGTATCGGCACGGAAGCTGGTC
TTCTCCTCTCCCCGAGGCAGACGTTGCAGCCGCAAATCTCAAATCCAAGGTCANATCGA-3'

Abb. 50: EST Sequenz des cDNA-Klons 4320, der eine hohe Homologie zu einem AOX-Gen aus *C. fulvum* aufweist. Mit den Primern ANK530AOX und ANK531AOX (rot, hier ohne angehängte *Asc*I- und *Not*I-Restriktionsstellen [vgl. Text]) wurde ein Fragment amplifiziert, welches nach Verdau mit den genannten Enzymen in den pUCmin/VaHyg-Vektor ligiert wurde. Für die Transformation wurde der entstandene K.O.-Vektor mit dem Enzym *Xho*I (unterstrichen, fett) linearisiert. Des weiteren ist die Sequenz des Primers AOXR1 (blau) aufgeführt.

```
-1158                agtggagaatcatagggggggtccgggtgtagt
-1125 aaacgtcgatcctatttgcccgggaacaagacatatgggggttca
-1080 atgtttgggggttttatacttaacgatacaggaaataaagagtcc
-1035 aacagtggatcagacgtggcataaaatatctaagtaattctgtcc
 -990 tttaggcatgcagtgtcgtgttcgacaagggtagctctggaatag
 -945 gatagctctgacaagggtagctttgacatgtcgacgcccgttaaa
 -900 gctggggaagcgtcgtaatctgacatgcaacagcaacaaagtctt
 -855 ggctcgagagtttggttggttgaatgtcgatccttagcagtttgg
 -810 tctgcctcgggacaagggaagtatggaaattgcctgatcaaggtg
 -765 actgcactacactgtacagtatgtatatgcacatgcaggcagaca
 -720 gagaccttgtttttctttacttatccggcgggggaataagactg
 -675 aagatcggatatccatttgcgagtcagaatgtctgtgcattgtct
 -630 gtgagctggttgtgacttgttgaatatcaagaatatggcgtccgg
 -585 atatcacggaactcgacaacatcaattgattctgtcactcaatca
 -540 attggaaactaaaacccctaaacttctttatttcttgtataagct
 -495 ttctcttcatagagcaagataccagtcatccgggtaccgttaacc
 -450 cgaagggccaagcggcaaagcagatgatatcctggatatgcaggc
 -405 caagcaacagctcctcccaagagtatcacaacaacccccaagaac
 -360 tgattgacagacaatgaaaccattatccacagtgctattattgca
 -315 gatgactatatgatgcatttgcctattggtgcccgcaatcttcat
```

```
-270 cgagaggggttcgcagatgttgatgatgctcctgccagcatccgt
-225 tggacatgcacacatacttcggcgttcattcggcatctaggcttg
-180 cgtttggatcgatataccctgtttgtaatgatactcaatctcacg
-135 atgtatgtataaataagcttggtgtcgtccgcttcctcgaggcca
                                        AOXF1 →
 -90 ctcttaggcagagtatctctcgacccatttcttcaacggccgctc
 -45 tcgggcagagtatctctctatcgatttcttcaataaactttcacc
                    AOX-Start →
   1 ATGGCGTCTTCCAACTCGTACGCGAGCCACCAGGGCACGCTGCCC
   1  M  A  S  S  N  S  Y  A  S  H  Q  G  T  L  P

     ← AOXT1c
  46 GAGGAGTTTGACATTATCGTATGCGGAGGTGGTTCTTGTGGCTGT
  16  E  E  F  D  I  I  V  C  G  G  G  S  C  G  C
                  ← AOXT1b
  91 GTAGTTGCTGGCAGACTTGCCAACCTCGATCACAACCTCAAGGTC
  31  V  V  A  G  R  L  A  N  L  D  H  N  L  K  V
                                          ← AOXT1a
 136 CTGTTGATCGAGGCTGGTGAGAGTAATTTGAATAATCCGTGGGTA
  46  L  L  I  E  A  G  E  S  N  L  N  N  P  W

 181 AGTAACGGAAATCCAAGTCTTCCTACACGTTGTCTAACCAATAAA
                                                  A

 226 AGGTGTATCGGCCTGGAATCTTCCCTCGTAACATGAAGCTTGATT
  60    V  Y  R  P  G  I  F  P  R  N  M  K  L  D

 271 CAAAGACTGCTTCATTTTACAAGTCTCGTCCCAGCAAGCATCTCG
  75 S  K  T  A  S  F  Y  K  S  R  P  S  K  H  L

 316 CTGGCCGAGAAGCGACAGTTCCCTGTGCTCACATTCTCGGAGGTG
 90  A  G  R  E  A  T  V  P  C  A  H  I  L  G  G

 361 GTTCTTCCATTAACTTTATGATGTATACTCGCGCCAGTGCCTCAG
 105 G  S  S  I  N  F  M  M  Y  T  R  A  S  A  S

 406 ATTGTAGGTAAATTTATATCAACTTGGGAACAATTACTAATATGG
 120 D                                            B

 451 GTCTAGACGATGACTTCCAGGCCAAGGGATGGAGTACTGCTGTAA
 121       Y  D  D  F  Q  A  K  G  W  S  T  A

 496 GTCTGAATACCACTGTCAACCAAGAGCATCCCCATTAACTAAATA
                                                  C

 541 TTCAGGAACTTCTCCCGCTTATGAAGAAGCATGAAACTTACCAGC
 133       E  L  L  P  L  M  K  K  H  E  T  Y  Q
```

```
 586 GTCACTCTACCAACCCAGAAGTTCACGGCTT**TGAGGGCCCAATCA**
 146 R  H  S  T  N  P  E  V  H  G  F  E  G  P  I

      AOXINF1 ➔
 631 **AGGTCTC**GTTTGGAAACTACACGTACCCTATCAAGGATGACTTCC
 161 K  V  S  F  G  N  Y  T  Y  P  I  K  D  D  F

 676 TCCGAGCTACCGACTCTCAGGGCATCCCCTTCGTCGATGACCTCG
 176 L  R  A  T  D  S  Q  G  I  P  F  V  D  D  L

 721 AGGATCTCAGCACCGGCCATGGCGCAGAGCACTGGCTCAAGTGGA
 191 E  D  L  S  T  G  H  G  A  E  H  W  L  K  W

 766 TCAACAGAGACACGGGCCGTCGAAGTGACTCTGCTCATGCCTACA
 206 I  N  G  D  T  G  R  R  S  D  S  A  H  A  Y

 811 TCCATTCGACTCGTGCCAAGCACAGCAACTTGTACCTGGCTTGCA
 221 I  H  S  T  R  A  K  H  S  N  L  Y  L  A  C

 856 ACACAAAGGTCGACAAGATCATCATGGAGAATGGCCGTGCCGTTG
 236 N  T  K  V  D  K  I  I  M  E  N  G  R  A  V

 901 GTGTCCAGACCGTTCCCACCAAGCCTCTTCACCCGAATCAGGTCC
 251 G  V  Q  T  V  P  T  K  P  L  H  P  N  Q  V

 946 AGACAAGAACCTTCCGTGCCAGGAAGCAGATTGTTGTTAGCGGTG
 266 Q  T  R  T  F  R  A  R  K  Q  I  V  V  S  G

 991 GTACCCTCTCATCGCCTTTGATCCTCCAGCGCTCTGGTATCGGTG
 281 G  T  L  S  S  P  L  I  L  Q  R  S  G  I  G

1036 ACCCCCAGAAGCTTCGTGCTGCTGGTGTTGAGCCCAAGGTCGACC
 296 D  P  Q  K  L  R  A  A  G  V  E  P  K  V  D

1081 TTCCTGGTGTCGGTTTGAACTTCCAGGATCATTACATGACCTTCT
 311 L  P  G  V  G  L  N  F  Q  D  H  Y  M  T  F

1126 CAGTTTACCGTGCAAAGCCTGAAACTGAAAGTTTCGACGACTTTG
 326 S  V  Y  R  A  K  P  E  T  E  S  F  D  D  F

1171 TTCGTGGTGACCCCGAAGTTCAAAAGGTAAGACAACTCTCAATAT
 341 V  R  G  D  P  E  V  Q  K                      D

1216 GAAAATGACAGGAACTAACTAGAGAAACAGAAAGTATTTGACGAG
 350                                K  V  F  D  E

                 ANK568AOX ➔
1261 **TGGAACTTGAAGGGTACTGGA**CCGCTTGCCACCAACGGTATCGAG
 355  W  N  L  K  G  T  G  P  L  A  T  N  G  I  E

          ↓                ← AOXINR1
1306 GCCGGTGTCAAGATCCGACCAA**CTGAGCAGGAACTCAAGGAGT**TT
 370  A  G  V  K  I  R  P  T  E  Q  E  L  K  E  F
```

```
1351 GAGAGGTGGCCCACTCCTCATTTCACCGACGGATGGAAGTCCTAC
 385  E  R  W  P  T  P  H  F  T  D  G  W  K  S  Y

1396 TTCAAGAACAAGCCTGACAAGCCCGTCATGCATTACTCTGTGATT
 400  F  K  N  K  P  D  K  P  V  M  H  Y  S  V  I

1441 GCTGGTTTCTTCGGCGACCACATGCTCATGTAAATCCCTCTCTGA
 415  A  G  F  F  G  D  H  M  L  M                 E

1486 TGCGTCAAGATGTATGAAGACTAACAACAAAAAAGGCCTCCTGGA
 424                                    P  P  G

1531 AAGTTCTTCTCCATGTTCCATTTCCTCGAGTACCCCTTCTCTCGT
 427  K  F  F  S  M  F  H  F  L  E  Y  P  F  S  R
                                         AOXT2a →
1576 GGATTCACTCACATCAAGAGTGCTGATCCTTATGACACTCCCGAT
 442  G  F  T  H  I  K  S  A  D  P  Y  D  T  P  D

1621 TTTGATACTGGTTTCGTAAGCCAACCCCATTTATAATTTGCTTCA
 457  F  D  T  G  F                                F
                                            AOXT2b →
1666 AGTGTACTAACAAGACTAGATGAACGATGAGCGAGACATGGTTCC
 463                    M  N  D  E  R  D  M  V  P

1711 TATGGTCTGGGGATACATCAAGTCGCGTGAGACTGCTCGCCGCAT
 472   M  V  W  G  Y  I  K  S  R  E  T  A  R  R  M

1756 GGACGCATACGCCGGCGAAGTCGAGAACATGGTACGTCAATCTCC
 487   D  A  Y  A  G  E  V  E  N  M                 G
     AOXT2b →
1801 TAACTCACTATTCGACCTTTTACTGACTTGCCTAGCACCCCTTCT
 496                                    H  P  F

1846 TTGACTATGATAGTCCCGCCCGTGCTCATGATCTCGACCTCCAGA
 499 F  D  Y  D  S  P  A  R  A  H  D  L  D  L  Q

1891 CCACCAAGGCATACGCCCTCCCCGGTAACCTTACCGCTGGTATCG
 514 T  T  K  A  Y  A  L  P  G  N  L  T  A  G  I
       ← AOXR1
1936 GCCACGGAAGCTGGTCTTCTCCTCTCCCCGAGGCAGACCGCTTGC
 529 G  H  G  S  W  S  S  P  L  P  E  A  D  R  L
                          ↓
1981 CAGCCGCCAACATCCTCAACTCCAACAAGGCTCATATCCGAGAGG
 544 P  A  A  N  I  L  N  S  N  K  A  H  I  R  E

2026 AGCTCAAGTATAGCGAGAAGGACATCAAGGCTGTTGAGGGTAAGT
 559 E  L  K  Y  S  E  K  D  I  K  A  V  E
```

```
2071 CACTTATACTATCAGTCACTGCGTTGCAGTCACTAACTGTTCACA
                                                 H

2116 GAATGGGTCAAGCGCCACACCGAGTCTACCTGGCACTCCCTTGGA
 572  E  W  V  K  R  H  T  E  S  T  W  H  S  L  G

2161 ACCTGCTCCACGGCTCCCAAGGAGGGCAACAGCATCGTTAAGCAC
 587  T  C  S  T  A  P  K  E  G  N  S  I  V  K  H

2206 GGTGTCCTCAACGAGAGACTCAACGTCCACGGCGTCAAAGGACTC
 602  G  V  L  N  E  R  L  N  V  H  G  V  K  G  L

2251 AAGGTTGCTGATCTGTCCATCTGCCCCGACAACGTGGGCTGCAAC
 617  K  V  A  D  L  S  I  C  P  D  N  V  G  C  N

2296 ACGTACTCTACTGCTCTGCTCATTGGTGAGAAGTGTGCTATGCTT
 632  T  Y  S  T  A  L  L  I  G  E  K  C  A  M  L
                          ← AOX-V-Stop
2341 GCTGCTGAGGACCTCGGATACTCTGGCGAGGCTCTTGAGATGAAG
 647  A  A  E  D  L  G  Y  S  G  E  A  L  E  M  K

2386 GTCCCTACTTACCAGGCACCTGGTGAGTTTGTGGTCCGACACCGC
 662  V  P  T  Y  Q  A  P  G  E  F  V  V  R  H  R

2431 TTGTAAgggatgaatgagatattttgcgacttgatgtcctgtttg
 677  L  *

2476 acggccaagattggatgtagccgatctaatgtcagtttagcgatt
2521 aatttatttatgttgatggcaattgatggagcagatgatcgtgac
2566 tgttctgacatatcttgctgtgtgttaaattggcaaggccttgaa
2611 cacccccaagtcagaattcatgccagaacgtggtgataccacccg
2656 cacgtatggactaccagtttaaatactagtctaaacatttataca
2701 aataaatgatacctcaaatcatggtctacatgatattataaaaca
```

Abb. 51: Putative Proteinsequenz der AOX aus *F. graminearum*, abgeleitet von der ebenfalls dargestellten Nukleinsäuresequenz. Im 5‘ Bereich sind eine mögliche TATA-Box (fett, nt -128 bis -122) und das Start-Codon (fett, nt 1 bis 3) zu erkennen. Im 3‘-Bereich liegen das Stop-Codon (fett, nt 2434 bis 2436) und die Polyadenylierungsstelle (fett, nt 2540). Ebenfalls markiert ist ein mögliches Polyadenylierungssignal (nt 2518 bis 2523), wobei hier die Sequenz von der sonst konservierten Basenabfolge (AATAAA) abweicht. Ferner sind die acht Intronbereiche (unterstrichen und mit A bis H bezeichnet) zu erkennen: (A) 1. Intron (nt 179 bis 228), (B) 2. Intron (nt 409 bis 456), (C) 3. Intron (nt 493 bis 546), (D) 4. Intron (nt 1197 bis 1245), (E) 5. Intron (nt 1471 bis 1521), (F) 6. Intron (nt 1636 bis 1684), (G) 7. Intron (nt 1787 bis 1835) und (H) 8. Intron (2065 bis 2116). Ebenfalls dargestellt sind die für die Analyse der AOX-Sequenz eingesetzten Primer (fett und beschriftet). Der Beginn und das Ende des ursprünglichen Fragments ist durch Pfeile (von oben nach unten) gekennzeichnet.

```
                                        A           B
AOX_Fg          MASSNSYASHQGTLPEEFDIIVCGGGSCGCVVAGRLANLDHNLKVLLIEAGESNLNNPWV
AOX_Cf          ----------MTIPDEVDIIVCGGGSCGCVVAGRLANLDHKLQVMLIEAGESNLNNPWV
                            *:*:*.**********************:*:*:**************

AOX_Fg          YRPGIFPRNMKLDSKTASFYKSRPSKHLAGREATVPCAHILGGGSSINFMMYTRASASDY
AOX_Cf          FRPGIYPRNMKLDSKTATFYYSRPSEWLSGRRAIVPCANILGGASSINFMMYTRASASDY
                :****:***********:** ****: *:**.* ****:****.****************

AOX_Fg          DDFQAKGWSTAELLPLMKKHETYQRHSTNPEVHGFEGPIKVSFGNYTYPIKDDFLRATDS
AOX_Cf          DDFQAKGWTTKELLPLMKKHETYQRACQNRDLHGFDGPIKVSFGNYTYPVMQDFLRAAES
                ********:* ************** . * ::***:**************: :*****::*

AOX_Fg          QGIPFVDDLEDLSTGHGAEHWLKWINGDTGRRSDSAHAYIHSTRAKHSNLYLACNTKVDK
AOX_Cf          QGIPISDDLEDLNTGHGAQHWLKWINRDTGRRSDSAHAYIHSTRQHFENLHLVCNTKVDK
                ****: ******.*****:******* ***************** :..**:*.*******
                                                            C
AOX_Fg          IIMENGRAVGVQTVPTKPLHPNQVQTRTFRARKQIVVSGGTLSSPLILQRSGIGDPQKLR
AOX_Cf          VILEGNKAVGVKTIPTKPLHPNENKSRIFKARKQIIVSGGTLSSPLILQRSGIGDSQKLR
                :*:*..:****:*:********: ::* *:*****:*******************.****

AOX_Fg          AAGVEPKVDLPGVGLNFQDHYMTFSVYRAKPETESFDDFVRGDPEVQKKVFDEWNLKGTG
AOX_Cf          KAGVKPIIDLPGVGLNFQDHYLYFSLYRAKPWAESFDEFVRGNKEVQDKVFGQWELNGTG
                 ***:* :**************: **:***** :****:****: ***.***.:*:*:***

AOX_Fg          PLATNGIEAGVKIRPTEQELKEFERWPTPHFTDGWKSYFKNKPDKPVMHYSVIAGFFGDH
AOX_Cf          PLATNAIEAGVKARPTEQELEDMKSWPFPEFLSGWDSYFKNKPDKPVMHWAVVAGWFGDH
                *****.****** *******:::: ** *.* .**.**************::*:**:****

AOX_Fg          MLMPPGKFFSMFHFLEYPFSRGFTHIKSADPYDTPDFDTGFMNDERDMVPMVWGYIKSRE
AOX_Cf          MHVPPGKFFSMFHFLEYPFSRGFTHITSPNPYEAPDFDAGFMNDRRDMAPMVWGYIKSRE
                * :************************.*.:**::****:*****.***.***********

AOX_Fg          TARRMDAYAGEVENMHPFFDYDSPARAHDLDLQTTKAYALPGNLTAGIGHGSWSSPLPEA
AOX_Cf          TARRMDAYAGEVINMHPFYAYDSPARCKDLDLETTNAYAGPDHITANIQVGSWTVPK-EA
                ************ *****: ******.:****:**:*** *.::**.*  ***: *  **

AOX_Fg          DRLPAANILNSNKAHIREELKYSEKDIKAVEEWVKRHTESTWHSLGTCSTAPKEGNSIVK
AOX_Cf          GKAPEPSFMNNHQQHIQEDLQYSKDDLLAVEEWVKRHVETTWHSLGTCSMAPKNGNSIVK
                .: * ..::*.:: **:*:*:**:.*: *********.*:********* ***:******

AOX_Fg          HGVLNERLNVHGVKGLKVADLSICPDNVGCNTYSTALLIGEKCAMLAAEDLGYSGEALEM
AOX_Cf          HGVLDERLNVHGVKNLKVADLSICPDNVGCNTYSTALLIGEKCAVLTAEDLGYTGRALDM
                ****:*********.****************************:*:******:*.**:*
                                D
AOX_Fg          KVPTYQAPGEFVVRHRL
AOX_Cf          RVPDYQANREITGLARL
                :** ***  *:.   **
```

Das dargestellte und mit ClustalX erzeugte Alignment zeigt die folgenden statistischen Werte der Übereinstimmung zwischen den Proteinstrukturen:

	AOX_Fg	
AOX_Cf	75%	Identität
	85%	Juxtaposition größer als Null
	1%	Aligned mit Lücken

Abb. 52: Alignment der putativen AOX aus *F. graminearum* (AOX_*Fg*) mit der AOX aus *C. fulvum* (AOX_Cf). Verschiedene konservierte Bereiche sind markiert (unterstrichen). (A) mögliche FAD-bindende Stelle eines ADP-bindenden β-α-β-Motivs, (B, fett) mögliche N-terminale Peroxisomenzielsequenz, (C) mögliches GMC-Oxidoreduktase Muster, (D) mögliche C-terminale Peroxisomenzielsequenz. Zeichen in der Consensusreihe: *, identische Aminosäuren in beiden Sequenzen des Alignments; :, konservierte Substituenten; ., semikonservierte Substituenten. Des weiteren sind die statistischen Werte des Alignments aufgezeigt.

C. Polyketidsynthase

5'-**GACCCGCGGTTTTTCAACATG**TCTCCAAAGGAAGCTGAGCAGTCGGATCCTGGCCAGCGAATGGCCCTC
GAAACAGCTTACGAGGCGCTTGAGATGGCTAGTATCGTACCAGACAGAACACCTTCGACACAGAGAGATCGT
GTTGGTGTGTTCTACGGCATGACTAGCGATGATTGGAGAGAGGTCAACAGTGGGCAGAATGTCGACACTTAT
TTTATTCCTGGTAAGTTGTTTGTTCGCGTTTCACGACAATACTGATTGCAGACTACAGGTGGCAACAGAGCG
TTCACTCCTGGTCGACTCAACTACTTCTTCAAGTTCAGTGGGCCT***AGCGCT***AGTGTTGATACGGCTTGCTCC
TCCAGTCTCGTTGGCTTGCACTTGGCTTGTAATTCCCTCTGGAGAAATGATTGCGATACAGCTATTGCGGGC
GGAACCAATGTCATGACTAACCCTGACAACTTCGCTGGTTTGGACCGAGGCCACTTCCTATCTCAAGAACCG
GTAAGTCTCTCACAGATCTTGGAAGCTTCCTTCTTTTTAGTGTTTTTACTGACCTTGTTCCAGGCAACTGCA
ACACCTTTGACGATGGAGCAGACGGATACTGTCGAGCTGATGGCGTCGGAACCATCATCCTCAAGCGGCTTG
AGGACGCCGAAGCTGACAATGACCCTATTCTCGGTGTCATTCTGGGCGCTTACACAAACCACTCAGCCGAAG
CAGTATCCATCACTCGACCACATGCCGGAGCTCAAGAGTACATCTTCTCCAAACTCCTCCGTGAGTCGGGCA
CCGATCCCTACAACGTTAGCTACATC**GAGATGCACGGCACCGGCAC**-3'

Abb. 53: 835 bp großes Teilfragment der PKS aus *F. graminearum*, amplifiziert mit den Primern LC1 und LC2c. (fett). Weiter sind die Bindungsstellen der folgenden Primerpaare markiert: PKS F 100 und PKS R 100 (rot), PKS F 200 und PKS R 200 (blau), PKS F 300 und PKS R 300 (gelb) sowie PKS F 500 und PKS R 500 (grün). Die *Eco*47III Schnittstelle ist ebenfalls markiert (fett-kursiv).

```
wA Teil          DPRFFNMSPREALQADPAQRLALLTAYEALEGAGFVPDSTPSTQRDRVGIFYGMTSDDYR
WdPKS Teil       DARFFNMSPREAAQTDPMQRLMLTTGYXAMEMAGIVPGXTPSTXHDRIGTFYGQTSXXWR
FgPKS Teil       DPRFFNMSPKEAEQSDPGQRMALETAYEALEMASIVPDRTPSTQRDRVGVFYGMTSDDWR
                 *.*******:** *:** **: * *.* *:* *.:**. **** :**:* *** **  :*
                                                                          ↓
wA Teil          EVNSGQDIDTYFIP---------------GGNRAFTPGRINYYFKFSGPSVSVDTACSSS
WdPKS Teil       EVNAAXDIDTYFIS---------------GGVRAFGPGRINYFFKFSGPXFSVDTACSSS
FgPKS Teil       EVNSGQNVDTYFIPGKLFVRVSRQYLQTTGGNRAFTPGRLNYFFKFSGPSASVDTACSSS
                 ***:. ::*****.               ** *** ***:**:******  *********

wA Teil          LAAIHLACNSIWRNDCDTAITGGVNILTNPDNHAGLDRGHFLSRTGNCNTFDDGADGYCR
WdPKS Teil       LAAMNVAITSLRANECDTVFTGGANVLTNSDIFSGLSRGHFLSKTGSCKTWDNDADGYCR
FgPKS Teil       LVGLHLACNSLWRNDCDTAIAGGTNVMTNPDNFAGLDRGHFLSQEPVSLSQILEAS-FFL
                 *..::* .*:  *:***.::**.*::**.* .:**.******:   . :    *. :

wA Teil          ADGVGTVVLKRLEDALADNDPILGVINGAYTNHSAEAVSITRPHVGAQAFIFKKLLNEAN
WdPKS Teil       GDGVCTVIMKRLDDALADRDPVLGVIRGIGTNHSAEAVSITHPCAENQAFLFDKVLKECN
FgPKS Teil       VFLLTLFQATATPLTMEQTDTVELMASEPSSSSGLRTPKLTMTLFSVSFWALTQTTQPKQ
                    :  .  .    :: : *.:  :     :. . .: .:* .    . : : :  :  :

wA Teil          VDPKNISYIEMHGTGTQAGDAVEMQSVLDVFAPDHRRG---PGQSLHLG
WdPKS Teil       VHCNDVNYVEMHGTGTQAGDGIEMESVSSVFAPRQPRRR--PDQPLYVG
FgPKS Teil       YP--SLDHMPELKSTSSPNSSVSRAPIPTTLATSRCTA---PAX-----
                     .:.::    : :.....:.  .:  .:*. :      *
```

Abb. 54: Alignment der putativen Aminosäuresequenz (FgPKS Teil) des 835 bp großen PKS Fragments aus *F. graminearum* mit weiteren PKS Genen. WdPKS Teil: Fragment des *WdPKS1* aus *Wangiella dermatitidis* (Feng et al., 2001), wA Teil: Fragment des *wA* aus *Aspergillus nidulans* (Mayorga and Timberlake, 1992). Zeichen in der Consensusreihe: *, identische Aminosäuren in allen Sequenzen des Alignments; :, konservierte Substituenten; ., semikonservierte Substituenten. Die für die β-Ketoacylsynthase-Domänen konservierte Region ist schwarz hervorgehoben und trägt das für das aktive Zentrum dieser Domäne typische DXAC Motiv (Pfeil, nach Feng et al., 2001 und Metz et al., 2001).

```
-731                                                  atcgagtttcg
-720 tgttgcgtgtcatggtgtagcgaacaataccatactcctccatca
-675 aagggctgacgagcttggcatggacctttgtcatatggtgcctgt
-630 actctttctcgctaagagaaggtttttgtaggccgtgatggtta
-585 ggcaaacaagggtatcaggttgaccggtgacagttgcctcatgag
-540 aggtttcttgggtatcactatgaggcgacatgatgcaggttggag
-495 tttgttatcgaagtgctgggtaggatttggttgacagagttgcat
-450 aaactggagctctggatacgcaaggggtcataagagtatggatac
-405 gccgtcgattagaagctgtcagatccagtgcatcaatggcccgaa
-360 tgacgagagattgctgctcggcactgaaagtctgcagcgtgcttg
-315 tttcggagttatctctacagctgcaccgaatgacgaacaagcccg
                                        ← tailPKS 1d
-270 actatccatgtccgacgagcccggaccgacgtgatccgaatgctg
-225 tctaacacttaccaagacaatcatggggtatctctgaattatgat
                                        ← tailPKS 1d
-180 tgtgttgctcaagcagctaatcccaactcttaatcacgtcaagtg
-135 ccatgcttacctgtattatcatctgtcatcaacataccaactcct
                          ← tailPKS 1c
 -90 atatatagggggattgtgcttcattacctctccagtaacaactact
            PKS-V-Start →
 -45 tggagttcaaaccacatttcaacttactcttttagttcattcaac
   1 ATGACCCCATCAATGATGGAGGTATTCGTTTTTGGGGACCAAAGC
   1  M  T  P  S  M  M  E  V  F  V  F  G  D  Q  S

  46 ACACGCTTTGCCCCTCCACTGAAAGACCTACTCCTCAAAGGCAAC
  16  T  R  F  A  P  P  L  K  D  L  L  L  K  G  N

  91 AGTCCTTACTTGACACATTTTGTTAAACAAGTTCACGCACTTCTT
  31  S  P  Y  L  T  H  F  V  K  Q  V  H  A  L  L

 136 AGAAGGGAGATATCATCCTTGCCGGCAGTTCAACAGAAGCTTTTC
  46  R  R  E  I  S  S  L  P  A  V  Q  Q  K  L  F

 181 CCAAACTTTGCCGACATTCAGGAACTCGTCTCCAAGTCAGATTGG
  61  P  N  F  A  D  I  Q  E  L  V  S  K  S  D  W

 226 GGCAGTGGTAACCCTGCTTTGACAAGCGCTTTAGCATGCTTTTAC
  76  G  S  G  N  P  A  L  T  S  A  L  A  C  F  Y

 271 CATCTTTGCAGTTTCATTCAGGAGTATCATAACCAAGTACCCATA
  91  H  L  C  S  F  I  H                          A

 316 GATCTCTCCTGACCATCCAGCTTTTACGATGGACAAGGTCGTACC
  98                       F  Y  D  G  Q  G  R  T
```

```
 361 TTTCCTTCGGAGAACAGTCGCATTATTGGACTTTGCGTTGGTTCA
 106  F  P  S  E  N  S  R  I  I  G  L  C  V  G  S

 406 CTCGCTGCTACTGCTGTCAGTTGCTCCACATCACTGAGTGAATTG
 121  L  A  A  T  A  V  S  C  S  T  S  L  S  E  L

 451 GTATCAGCTGGTGTAGATGCTGTTCGTGTGGCATTGCACGTCGGA
 136  V  S  A  G  V  D  A  V  R  V  A  L  H  V  G

 496 CTACGGGTATGGCGAACTACCTCCCTTTTCGATGTACCAGACAGG
 151  L  R  V  W  R  T  T  S  L  F  D  V  P  D  R

 541 CCCTCCGCCACTTGGTTCATAATTGTGCCCGAGGCAGTACTACCA
 166  P  S  A  T  W  F  I  I  V  P  E  A  V  L  P

 586 AGAGAATCTGCGCAAGACCGACTTGACTCATTCATCATTGAAATG
 181  R  E  S  A  Q  D  R  L  D  S  F  I  I  E  M

 631 GTAAGCAATTCTTTGTCCTTGGAGCTCTCATAAAACATATTCACT
                                                  B
 676 CTTCTTTAGGGACTTGCTCGATCATCAGTTCCTTACATCAGCTCG
 196          G  L  A  R  S  S  V  P  Y  I  S  S

 721 GTCGCACATCACAACATGACCATCAGTGGTCCACCATCCGTCCTC
 208  V  A  H  H  N  M  T  I  S  G  P  P  S  V  L

 766 GAAAAGTTCATTCACAGTATATCAACATCACCGAAAGATTCTCTT
 223  E  K  F  I  H  S  I  S  T  S  P  K  D  S  L

 811 CCAGTGCCGATCTATGCTCCGTACCACGCCAGCCATCTTTACAGC
 238  P  V  P  I  Y  A  P  Y  H  A  S  H  L  Y  S

 856 ATGGATGATGTAGACGAGGTCCTTAGCCTGTCTGCACCTTCTTTT
 253  M  D  D  V  D  E  V  L  S  L  S  A  P  S  F

 901 GCATCAGAGTCCATCATTCCACTCATTTCAAGCTCCTCGGGTGAC
 268  A  S  E  S  I  I  P  L  I  S  S  S  S  G  D

 946 GAGTTACAGCCACTCAAGTATGCAGATCTACTCCGCTGCTGTGTT
 283  E  L  Q  P  L  K  Y  A  D  L  L  R  C  C  V

 991 AGTGATATGCTCATACAGCCACTGGATCTTACCAAGGTCTCACAA
 298  S  D  M  L  I  Q  P  L  D  L  T  K  V  S  Q

1036 GCAGTGGCCCAGCTTCTCGAGGTTAGCTCATCTACACGTGCCATA
 313  A  V  A  Q  L  L  E  V  S  S  S  T  R  A  I

1081 ATAAAGCCTATAGCAACCAGCGTCTCCAACAGTCTAGTGTCTGTT
 328  I  K  P  I  A  T  S  V  S  N  S  L  V  S  V
```

```
1126 TTGGAGCCGACGCTAGCAGAACGATGCGCCGTGGACAACAGCATG
 343  L  E  P  T  L  A  E  R  C  A  V  D  N  S  M

1171 GGGCCCAAAGCCTCGACCAGCCACTCATCAGCAGAGACACAAACC
 358  G  P  K  A  S  T  S  H  S  S  A  E  T  Q  T

1216 GAGTCATCAAGCAAGAACTCCAAAATTGCGATTGTTGCTATGTCT
 373  E  S  S  S  K  N  S  K  I  A  I  V  A  M  S

1261 GGTCGCTTTCCAGACGCAGCTGACTTGAGTGAATTCTGGGATCTT
 388  G  R  F  P  D  A  A  D  L  S  E  F  W  D  L

1306 CTCTACGAAGGTCGCGATGTTCATCGACAAATTCCCGAGGACCGA
 403  L  Y  E  G  R  D  V  H  R  Q  I  P  E  D  R

1351 TTCAACGCAGAGCTCCATTACGACGCTACTGGGCGACGTAAGAAC
 418  F  N  A  E  L  H  Y  D  A  T  G  R  R  K  N

1396 ACCAGCAAGGTCATGAATGGCTGCTTCATCAAGGAACCAGGACTG
 433  T  S  K  V  M  N  G  C  F  I  K  E  P  G  L

        ↓                                  ← iPKS1b
1441 TTCGACGCTAGGTTCTTCAACATGTCTCCAAAGGAAGCTGAGCAG
 448  F  D  A  R  F  F  N  M  S  P  K  E  A  E  Q

        PKS F 600 →
1486 TCGGATCCTGGCCAGCGAATGGCCCTCGAAACAGCTTACGAGGCG
 463  S  D  P  G  Q  R  M  A  L  E  T  A  Y  E  A

1531 CTTGAGATGGCTAGTATCGTACCAGACAGAACACCTTCGACACAG
 478  L  E  M  A  S  I  V  P  D  R  T  P  S  T  Q

1576 AGAGATCGTGTTGGTGTGTTCTACGGCATGACTAGCGATGATTGG
 493  R  D  R  V  G  V  F  Y  G  M  T  S  D  D  W

1621 AGAGAGGTCAACAGTGGGCAGAATGTCGACACTTATTTTATTCCT
 508  R  E  V  N  S  G  Q  N  V  D  T  Y  F  I  P

                                        ← iPKS1
1666 GGTAAGTTGTTTGTTCGCGTTTCACGACAATACTGATTGCAGACT
 523  G                                            C

1711 ACAGGTGGCAACAGAGCGTTCACTCCTGGTCGACTCAACTACTTC
 524        G  N  R  A  F  T  P  G  R  L  N  Y  F

1756 TTCAAGTTCAGTGGGCCTAGCGCTAGTGTTGATACGGCTTGCTCC
 537  F  K  F  S  G  P  S  A  S  V  D  T  A  C  S   1

1801 TCCAGTCTCGTTGGCTTGCACTTGGCTTGTAATTCCCTCTGGAGA
 552  S  S  L  V  G  L  H  L  A  C  N  S  L  W  R
```

```
1846 AATGATTGCGATACAGCTATTGCGGGCGGAACCAATGTCATGACT
 567  N  D  C  D  T  A  I  A  G  G  T  N  V  M  T

                    iPKS2→
1891 AACCCTGACAACTTCGCTGGTTTGGACCGAGGCCACTTCCTATCT
 582  N  P  D  N  F  A  G  L  D  R  G  H  F  L  S

1936 AGAACCGGTAAGTCTCTCACAGATCTTGGAAGCTTCCTTCTTTTT
 597  R  T  G                                      D

1981 AGTGTTTTTACTGACCTTGTTCCAGGCAACTGCAACACCTTTGAC
 600                            N  C  N  T  F  D

                                ← PKS R 600
2026 GATGGAGCAGACGGATACTGTCGAGCTGATGGCGTCGGAACCATC
 606  D  G  A  D  G  Y  C  R  A  D  G  V  G  T  I

2071 ATCCTCAAGCGGCTTGAGGACGCCGAAGCTGACAATGACCCTATT
 621  I  L  K  R  L  E  D  A  E  A  D  N  D  P  I

2116 CTCGGTGTCATTCTGGGCGCTTACACAAACCACTCAGCCGAAGCA
 636  L  G  V  I  L  G  A  Y  T  N  H  S  A  E  A

2161 GTATCCATCACTCGACCACATGCCGGAGCTCAAGAGTACATCTTC
 651  V  S  I  T  R  P  H  A  G  A  Q  E  Y  I  F

2206 TCCAAACTCCTCCGTGAGTCGGGCACCGATCCCTACAACGTTAGC
 666  S  K  L  L  R  E  S  G  T  D  P  Y  N  V  S

                    iPKS2b→      ↓
2251 TACATCGAGATGCACGGCACAGGCACTCAAGCCGGCGACGCAACC
 681  Y  I  E  M  H  G  T  G  T  Q  A  G  D  A  T

2296 GAGATGACATCCGTCCTCAAGACGTTTGCTCCTACCAGCGGCTTC
 696  E  M  T  S  V  L  K  T  F  A  P  T  S  G  F

2341 GGCGGTCGATTGCCTCACCAAAACCTTCACTTGGGTTCAGTCAAG
 711  G  G  R  L  P  H  Q  N  L  H  L  G  S  V  K

2386 GCCAATGTCGGGCACGGTGAATCCGCATCTGGTATCATTGCTCTG
 726  A  N  V  G  H  G  E  S  A  S  G  I  I  A  L

2431 ATCAAGACGCTGCTTATGATGGAGAAGAACATGATCCCGCCGCAT
 741  I  K  T  L  L  M  M  E  K  N  M  I  P  P  H

2476 TGTGGTATCAAGACAAAGATCAATCACCATTTTCCTACGGATCTC
 756  C  G  I  K  T  K  I  N  H  H  F  P  T  D  L

2521 ACTCAGCGCAATGTCCATATCGCCAAAGTTCCGACATCTTGGACA
 771  T  Q  R  N  V  H  I  A  K  V  P  T  S  W  T

2566 AGATCGGGTCAAGCCAATCCACGCATTGCTTTCGTCAATAACTTC
 786  R  S  G  Q  A  N  P  R  I  A  F  V  N  N  F
```

```
2611 TCTGCCGCTGGTGGTAACTCTGCTGTCCTACTGCAAGATGCTCCT
 801  S  A  A  G  G  N  S  A  V  L  L  Q  D  A  P

2656 CAGCCATCGGTAGTTTCGGATGTTACAGACCCTCGCACATCCCAT
 816  Q  P  S  V  V  S  D  V  T  D  P  R  T  S  H

2701 GTTGTCACTATGTCCGCTCGATCAGCAGATTCCCTCAGGAAGAAC
 831  V  V  T  M  S  A  R  S  A  D  S  L  R  K  N

2746 CTCGCCAATCTCAAGGAGCTTGTAGAAGGCCAAGGTGACTCGGAG
 846  L  A  N  L  K  E  L  V  E  G  Q  G  D  S  E

2791 GTCGGCTTCCTGAGCAAGCTGTCCTACACAACCACCGCCAGGCGC
 861  V  G  F  L  S  K  L  S  Y  T  T  T  A  R  R

2836 ATGCATCATCAATTCCGAGCTTCGGTCACAGCACAGACTCGTGAA
 876  M  H  H  Q  F  R  A  S  V  T  A  Q  T  R  E

2881 CAGCTGCTGAAGGGCCTTGATTCCGCCATTGAACGCCAGGATGTG
 891  Q  L  L  K  G  L  D  S  A  I  E  R  Q  D  V

2926 AAGAGGATCCCCGCCGCCGCGCCCTCTGTCGGCTTTGTGTTTAGC
 906  K  R  I  P  A  A  A  P  S  V  G  F  V  F  S

2971 GGCCAAGGCGCCCAATACCGTGGTATGGGCAAGGAGTACTTTACA
 921  G  Q  G  A  Q  Y  R  G  M  G  K  E  Y  F  T

3016 TCTTTCACAGCCTTCCGCTCTGAGATCATGTCTTACGACAGTATC
 936  S  F  T  A  F  R  S  E  I  M  S  Y  D  S  I

3061 GCCCAAGCCCAAGGCTTCCCGTCAATCCTCCCACTGATCCGAGGA
 951  A  Q  A  Q  G  F  P  S  I  L  P  L  I  R  G

3106 GAGGTGGAAGCTGACTCGTTGAGTCCTGTTGAGATCCAGCTGGGT
 966  E  V  E  A  D  S  L  S  P  V  E  I  Q  L  G

3151 CTCACTTGCCTGCAGATGGCACTGGCCAAGCTATGGAAGTCATTC
 981  L  T  C  L  Q  M  A  L  A  K  L  W  K  S  F

3196 GGTGTTGAGCCAGGCTTTGTTCTCGGACACAGCTTAGGCCACTAT
 996  G  V  E  P  G  F  V  L  G  H  S  L  G  H  Y   2

3241 GCTGCTTTACACGTCGCTGGTGTTCTGTCCGCCAATGATACCATT
1011  A  A  L  H  V  A  G  V  L  S  A  N  D  T  I

3286 TACCTCACTGGCATCAGAGCGCAGCTGCTCGTGGATAAGTGCCAG
1026  Y  L  T  G  I  R  A  Q  L  L  V  D  K  C  Q

3331 GCAGGAACCCACTCAATGCTGGCAGTGAGGGCATCCTTACTACAG
1041  A  G  T  H  S  M  L  A  V  R  A  S  L  L  Q
```

```
3376 ATCCAACAGTTCCTCGATGCCAACATTCACGAGGTTGCATGTGTC
1056  I  Q  Q  F  L  D  A  N  I  H  E  V  A  C  V

3421 AATGGTTCACGAGAAGTCGTCATCAGTGGACGCGTTGCCGACATT
1071  N  G  S  R  E  V  V  I  S  G  R  V  A  D  I

3466 GACCAGCTGGTTGGCCTTTTGTCGGCTGACAACATCAAGGCGACC
1086  D  Q  L  V  G  L  L  S  A  D  N  I  K  A  T

3511 CGCGTCAAGGTGCCATTTGCCTTCCACTCAGCGCAGGTTGACCCC
1101  R  V  K  V  P  F  A  F  H  S  A  Q  V  D  P

3556 ATTCTCTCCGACTTGGATACAGCGGCGTCGCGCGTCACCTTCCAC
1116  I  L  S  D  L  D  T  A  A  S  R  V  T  F  H

3601 TCCCTCCAGATTCCTGTTCTTTGTGCCCTTGACAGCTCTGTCATC
1131  S  L  Q  I  P  V  L  C  A  L  D  S  S  V  I

3646 AGCCCTGGAAACCATGGTGTCATTGGTCCCCTTCATCTACAGCGA
1146  S  P  G  N  H  G  V  I  G  P  L  H  L  Q  R

3691 CATTGTCGTGAGACAGTCAACTTTGAGGGTGCTCTACATGCTGCG
1161  H  C  R  E  T  V  N  F  E  G  A  L  H  A  A

3736 GAGCACGAGAAGATCATCAACAAGACATCAACTCTATGGATCGAG
1176  E  H  E  K  I  I  N  K  T  S  T  L  W  I  E

3781 ATTGGTCCCCATGTTGTCTGCTCTACCTTCCTCAAGTCCAGCCTT
1191  I  G  P  H  V  V  C  S  T  F  L  K  S  S  L

3826 GGTCCAAGCACACCTGCTATCGCATCGCTTCGCCGAAATGACGAT
1206  G  P  S  T  P  A  I  A  S  L  R  R  N  D  D

3871 TGCTGGAAGGTGTTGGCTGATGGTTTGAGCAGTCTCTACAGCAGC
1221  C  W  K  V  L  A  D  G  L  S  S  L  Y  S  S

3916 GGGTTGACAATTGACTTGAACGAGTATCATCGCGACTTCAAGGCC
1236  G  L  T  I  D  L  N  E  Y  H  R  D  F  K  A

3961 TCTCACCAGGTACTTCGTCTGCCTTGTTACAGCTGGGAGCACAAG
1251  S  H  Q  V  L  R  L  P  C  Y  S  W  E  H  K

4006 AATTACTGGATACAGTACAAGTACGATTGGTCCTTGGCTAAAGGT
1266  N  Y  W  I  Q  Y  K  Y  D  W  S  L  A  K  G

4051 GATCCTCCAATTGCCCCTAACAGCTCGGTTGAAGCAGTCTCAGCT
1281  D  P  P  I  A  P  N  S  S  V  E  A  V  S  A
```

```
4096 TTATCAACACCCTCGGTCCAGAAGATTCTACAGGAGACTTCCCTT
1296  L  S  T  P  S  V  Q  K  I  L  Q  E  T  S  L

                                          tailPKS2c ➔
4141 GATCAGGTATTGACTATCGTTGCTGAGACAGATCTCGCGAGCCCT
1311  D  Q  V  L  T  I  V  A  E  T  D  L  A  S  P

4186 CTATTGTCAGAGGTTGCCCAAGGTCATCGGGTCAACGGTGTCAAA
1326  L  L  S  E  V  A  Q  G  H  R  V  N  G  V  K

                              tailPKS2d ➔
4231 GTCTGCACATCTTCCGTGTACGCTGATGTTGGCTTGACGCTGGGT
1341  V  C  T  S  S  V  Y  A  D  V  G  L  T  L  G

4276 AAGTACATTTTGGACAACTACCGCACCGACTTAGAGGGTTATGCG
1356  K  Y  I  L  D  N  Y  R  T  D  L  E  G  Y  A

                          tailPKS2e ➔
4321 GTCGATGTTCACGGTATTGAGGTCCACAAGCCACTTCTTCTCAAA
1371  V  D  V  H  G  I  E  V  H  K  P  L  L  L  K

4366 GAAGACATGAACGGAACGCCCCAGGCTACACCGTTCCGCATCGAA
1386  E  D  M  N  G  T  P  Q  A  T  P  F  R  I  E

4411 GTGCGATACCCAATCCAGAGCACCACGGCGCTGATGAGCATCTCC
1401  V  R  Y  P  I  Q  S  T  T  A  L  M  S  I  S

4456 ACCACTGGCCCCAACGGTCAGCACATCAAGCATGCTAACTGCGAA
1416  T  T  G  P  N  G  Q  H  I  K  H  A  N  C  E

4501 CTTCGACTCGAGCATCCGTCGCAATGGGAAGCGGAGTGGGATCGC
1431  L  R  L  E  H  P  S  Q  W  E  A  E  W  D  R

4546 CAAGCCTACCTCATCAATCGCAGCGTCAACTGCCTTCTGCAGCGA
1446  Q  A  Y  L  I  N  R  S  V  N  C  L  L  Q  R

4591 TCAGCACAAGGTTTGGACAGCATGTTGGCAACCGGAATGGTCTAC
1461  S  A  Q  G  L  D  S  M  L  A  T  G  M  V  Y

4636 AAGGTCTTCTCCTCCCTCGTCGACTATGCCGATGGCTACAAGGGT
1476  K  V  F  S  S  L  V  D  Y  A  D  G  Y  K  G

4681 CTGCAGGAGGTTGTCTTGCACAGCCAAGAGCTCGAGGGCACAGCA
1491  L  Q  E  V  V  L  H  S  Q  E  L  E  G  T  A

4726 AAAGTGCGCTTCCAAACTCCCTCGGGAGGTTTCGTCTGCAATCCC
1506  K  V  R  F  Q  T  P  S  G  G  F  V  C  N  P

4771 ATGTGGATTGACAGCTGTGGTCAGACGACCGGCTTCATGATGAAC
1521  M  W  I  D  S  C  G  Q  T  T  G  F  M  M  N

4816 TGTCATCAGACTACGCCCAATGACTACGTCTACGTCAATCATGGC
1536  C  H  Q  T  T  P  N  D  Y  V  Y  V  N  H  G
```

```
4861 TGGAAGTCGATGAGATTGGCCAAGGCGTTCCGTGAAGATGGTACC
1551  W  K  S  M  R  L  A  K  A  F  R  E  D  G  T

4906 TATCGGACTTATATCCGGATGAGGCCCATTGATAGCACCAAGTTC
1566  Y  R  T  Y  I  R  M  R  P  I  D  S  T  K  F

                    tailPKS2f →
4951 GCTGGTGACTTGTACATTCTTGATGAGGATGACACTGTGGTTGGT
1581  A  G  D  L  Y  I  L  D  E  D  D  T  V  V  G

               tailPKS2g →
4996 GTTTATGGAGACATAACAATGAGTAACACGAATCTTTGTCAACAA
1596  V  Y  G  D  I  T                            E

                   tailPKS2h →
5041 CAATGCTAACGTAAAGAACAGTTCCAAGGTTTGCCGCGACGAGTT
1601                       F  Q  G  L  P  R  R  V

5086 CTCAACACAGTCTTGCCATCTGCCAACGCGGTTCCAGTTGATGCT
1609  L  N  T  V  L  P  S  A  N  A  V  P  V  D  A

5131 CCCATGGGTCGACGGGACGTGCCTCCATCAAGAATGGATGTGCCT
1624  P  M  G  R  R  D  V  P  P  S  R  M  D  V  P

5176 CCCGTCAGGTCCGGTGAAGGGCCACCCACTTCAGCACCCACGCAG
1639  P  V  R  S  G  E  G  P  P  T  S  A  P  T  Q

5221 CAAGCTATCGCTCTGCCGTTCGCAGCCGATACATCCATGGACTCC
1654  Q  A  I  A  L  P  F  A  A  D  T  S  M  D  S

5266 CGATTGAGACCTCTTCTTCGCATCTTGTCAGAAGAGATCGGTCTC
1669  R  L  R  P  L  L  R  I  L  S  E  E  I  G  L

5311 GGTCTTGACGTTCTTTCGGACGATGAACTCGACTTTGCGGACCAC
1684  G  L  D  V  L  S  D  D  E  L  D  F  A  D  H  3

5356 GGTGTCGACTCACTCCTCTCATTGACCATCACTGGTCGCATGCGT
1699  G  V  D  S  L  L  S  L  T  I  T  G  R  M  R

5401 GAGGAATTGGGTCTCGACGTTGAATCTACAGCATTCATGAACTGT
1714  E  E  L  G  L  D  V  E  S  T  A  F  M  N  C

5446 CCCACTTTGGGCAGCTTTAAATTGTTCCTAGGACTTGTCGATCAG
1729  P  T  L  G  S  F  K  L  F  L  G  L  V  D  Q

5491 GACAATAAGGGCAGCAGCGGCAGTGATGGCAGTGGTAGGAGCAGT
1744  D  N  K  G  S  S  G  S  D  G  S  G  R  S  S

5536 CCAGCACCGGGTACCGAGTCTGGCGCTACTACACCACCTATGAGC
1759  P  A  P  G  T  E  S  G  A  T  T  P  P  M  S
```

```
5581 GAAGAGGACCAGGACAAGATAGTCAGCAGTCACTCGCTTCACCAG
1774  E  E  D  Q  D  K  I  V  S  S  H  S  L  H  Q

5626 TTCCAAGCCAGTTCGACGCTTCTACAGGGCAGTCCCAGTAAAGCT
1789  F  Q  A  S  S  T  L  L  Q  G  S  P  S  K  A

5671 CGCTCGACTTTGTTCTTGCTACCAGATGGCTCGGGATCTGCCACA
1804  R  S  T  L  F  L  L  P  D  G  S  G  S  A  T

5716 TCCTACGCTTCCCTTCCCCCGATCTCTCCAGACGGAGATGTTGCT
1819  S  Y  A  S  L  P  P  I  S  P  D  G  D  V  A

5761 GTCTACGGGTTGAACTGTCCATGGCTGAAGGACTCTAGTTACCTC
1834  V  Y  G  L  N  C  P  W  L  K  D  S  S  Y  L

5806 GTCGAGTTTGGACTCAAGGGCTTGACAGAGCTCTATGTCAACGAG
1849  V  E  F  G  L  K  G  L  T  E  L  Y  V  N  E
                                          Lac197 ➔
5851 ATACTCCGTCGCAAGCCACAGGGTCCTTACAATTTGGGAGGATGG
1864  I  L  R  R  K  P  Q  G  P  Y  N  L  G  G  W   4

5896 TCAGCCGGTGGCATTTGCGCTTATGAAGCTGCCCTGATCCTCACC
1879  S  A  G  G  I  C  A  Y  E  A  A  L  I  L  T

5941 AGAGCAGGACACCAAGTCGATCGCCTTATCTTGATTGACTCTCCC
1894  R  A  G  H  Q  V  D  R  L  I  L  I  D  S  P

5986 AATCCCGTTGGTCTTGAGAAGCTACCTCCTCGCTTGTACGATTTC
1909  N  P  V  G  L  E  K  L  P  P  R  L  Y  D  F

6031 CTCAATTCGCAGAATGTCTTTGGATCAGACAACCCGCACAGCACT
1924  L  N  S  Q  N  V  F  G  S  D  N  P  H  S  T

6076 GCTGGAACAAGCGTCAAAGCTCCAGAATGGCTTCTTGCACATTTC
1939  A  G  T  S  V  K  A  P  E  W  L  L  A  H  F

6121 CTGGCCTTCATTGACGCTCTGGATGCTTATGTCGCAGTGCCTTGG
1954  L  A  F  I  D  A  L  D  A  Y  V  A  V  P  W

6166 GACTCTGGTCTAGTCGGTCTAGCATCACCGCTCCCTGCACCGCCG
1969  D  S  G  L  V  G  L  A  S  P  L  P  A  P  P

6211 CAGACATACATGCTGTGGGCAGAAGACGGAGTTTGCAAAGACTCT
1984  Q  T  Y  M  L  W  A  E  D  G  V  C  K  D  S

6256 GATAGTGCTCGTCCCGAGTACCGTGACGATGACCCACGCGAGATG
1999  D  S  A  R  P  E  Y  R  D  D  D  P  R  E  M

6301 AGATGGCTGTTGGAGAACAGAACAAACTTTGGTCCGAATGGTTGG
2014  R  W  L  L  E  N  R  T  N  F  G  P  N  G  W
```

```
6346 GAGGCGCTACTTGGTGGTAAAGAGGGTTTGTTCATGGATCGGATT
2029  E  A  L  L  G  G  K  E  G  L  F  M  D  R  I

6391 GCGGAAGCGAATCATTTTAGTATGTTGAAGAGAGGACGGAATGCG
2044  A  E  A  N  H  F  S  M  L  K  R  G  R  N  A

                                              ← PKS-N-Stop
6436 GAATATGTCTCTGCATTCCTGGCTCGGGCCTTGGACAATTAGaca
2059  E  Y  V  S  A  F  L  A  R  A  L  D  N  *

       ← Lac198
6481 cgatggagagggctgtttgtgtattatgtttattcttctttgat
6526 gtttgtatttctttgtctttctcatcattcagatagaagcagcag
6571 attgccttcattctttataaatcactacagaaataagtttg
```

Abb. 55: Putative Proteinsequenz der PKS aus *F. graminearum*, abgeleitet von der ebenfalls dargestellten Nukleinsäuresequenz. Im 5'-Bereich sind eine mögliche TATA-Box (fett, nt -91 bis -85) und das Start-Codon (fett, nt 1 bis 3) zu erkennen. Im 3'-Bereich liegen das Stop-Codon (fett, nt 6475 bis 6477), ein mögliches Polyadenylierungssignal (fett, nt 6601 bis 6606) und die Polyadenylierungsstelle (fett, nt 6611). Ferner sind die fünf Intronbereiche (unterstrichen und mit A bis E bezeichnet) zu erkennen: (A) 1. Intron (nt 291 bis 335), (B) 2. Intron (nt 632 bis 685), (C) 3. Intron (nt 1669 bis 1716), (D) 4. Intron (nt 1995 bis 2007) und (E) 5. Intron (nt 5014 bis 5061). Des weiteren sind die folgenden Domänen markiert (unterstrichen und numeriert): (1) β-Ketoacylsynthase (AS 532 bis 560), (2) Acyltransferase (AS 996 bis 1011), (3) Acylträgerprotein (AS 1690 bis 1709) und (4) Thioesterase (AS 1864 bis 1882). Die genannten Domänen wurden nach Feng et al. (2001) und Metz et al. (2001) bestimmt. Ebenfalls dargestellt sind die für die Inverse PCR, die TAIL-PCR und die RT-PCR eingesetzten Primer (fett und beschriftet; in Fällen der Überlappung zweier Primer, fett-kursiv). Der Beginn und das Ende des ursprünglichen 835 bp großen Fragments ist durch Pfeile (von oben nach unten) gekennzeichnet.

```
FgPKS     MTPSMMEVFVFGDQSTRFAPPLKDLLLKGNSPYLTHFVKQVHALLRREISSLPAVQQKLF
wA        -MEDPYRVYLFGDQTGDFEVGLRRLLQAKNHSLLSSFLQRSYHAVRQEISHLPPSERSTF
pks4      -MASSADVYVFGDQSTPVLDKLQALVRVKDNALLTSFLGEAFLAVRREIVSLSSLERKSI
WdPKS     ----MEEVYVFGDQTADCRAFFTKVFTRKDNVLLQSFLERAGEAVRFENQNR-SHPSKAV
                 *::****:      :  :.   :   *  *: .    :* *     .   . .

FgPKS     PNFADIQELVSKSDWGSG-NPALTSALACFYHLCSFIHFYDGQGRTFPSEN—SRIIGLC
wA        PRFTSIGDLLARHCESPG-NPAIESVLTCIYQLGCFINYYGDLGHTFPSHSQ-SQLVGLC
pks4      PEAESLSLLLEGVRRSEP-HAALDSAFVCIYEIG----YY----------------IDRC
WdPKS     PNFSTIQELVDRYYRGDAKDAATESALVCISQFCHFIGAFEERRPSYIQPNSDARLVGLC
          *.   :  *:     .   ..*  *.:.*: .:      :                :. *

FgPKS     VGSLAATAVSCSTSLSELVSAGVDAVRVALHVGLRVWRTTSLFDVPDRPSATWFIIVPEA
wA        TGLLSCAAVSCASNIGELLKPAVEVVVVALRLGLCVYRVRKLFGQDQAAPLSWSALV--S
pks4      C--------HCAKDVFEISRLGVEAATVAFRLGMHVRRRAENLG—YSTPSSWSMIL--S
WdPKS     TGLIAATAVAASDSLTALIPLAVEAVRIAFRAGAHVGKVAQQTEC-DSKTQSWSTIV---
                     .: .:  :   .*:.. :*:: *  * :  .        . :*  ::

FgPKS     VLPRESAQDRLDSFIIEMGLARSSVPYISSVAHHNMTISGPPSVLEKF-IHSISTSPKDS
wA        GLSESEGTSLIDKFTRRNVIPPSSRPYISAVCANTLTISGPPVVLNQF-LDTFISGKNKA
pks4      SNQEELVSEALKEFSKEKNLTYSSRPYISATGPGFTTISGPPSILESV-KSCDTFSGKRL
WdPKS     AADEKSAQEALDAFHKEXGTSPINQLWISVSSATSVTISVPPWTKARLXEESEFFRTQKS
             ..   . :. *  .   .  .  :**       *** **     .         :

FgPKS     LPVPIYAPYHASHLYSMDDVDEVL--SLSAPSFASES-IIPLISSSSGDELQPLKYADLL
wA        VMVPIHGPFHASHLYEKRDVEWILK-SCNVETIRNHKPRIPVLSSNTGELIVVENMEGFL
pks4      YPAPIYGPYHNSSSYSESSLEHGLASILEDVGFLENEMLIPIISCASGSRLDQLSFGNLL
WdPKS     APVSIFAPYHASHXHSQSDLDKILR-PQTKTIFGNTTVRFPVCSSVTGKPFNAENGFELL
            ..*..*:* *  :.  .::  *        : .    :*: *. :*. :   .   :*
```

```
FgPKS           RCCVSDMLIQPLDLTKVSQAVAQLLEVSSSTR-AIIKPIATSVSNSLVSVLEPTLAERCA
wA              KIALEEILLRQMSWDKVTDSCISILKSVGDNKPKKLLPISSTATQSLFNSLKKSNLVNIE
pks4            KNVLSSALSQQIRMDLVTDA---LVETVSGTE-ATLIPVNAQTT---VCSLADWLAKRGA
WdPKS           QAALKEIIIDPLRWDKVLKYC--AAGKASEAKVFAVGPTNLASS—VVSALKASTTKVTL
                :  :.. :   :    * .         .  .   : *     :   .  *

FgPKS           VDNSMGPKASTSHSSAETQTESSSKNSKIAIVAMSGRFPDAADLSEFWDLLYEGRDVHRQ
wA              VDGGISDFAAETQLVNQT---GRAELSKIAIIGMSGRFPEADSPQDFWNLLYKGLDVHRK
Pks4            TTRIGPTLESLTKDRAEPN-LAPGDENKIAIIGFSGRFPEADNLDEFWDLLIRGLDVHKP
WdPKS           EDHSTWSTVPPQGTRHSK---READ---IAIVGFSGRFPDAADNELFWQLLERGLDVHRP
                         .      .      ..   ***:.:*****:* . . **:** .* ***:

FgPKS           IPEDRFNAELHYDATGRRKNTSKVMNGCFIKEPGLFDARFFNMSPKEAEQSDPGQRMALE
wA              VPEDRWDADAHVDLTGTATNTSKVPYGCWIREPGLFDPRFFNMSPREALQADPAQRLALL
pks4            VPEERF-ARDHYDPTGQRKNTSQVQYGCWLKSAGYFDTQFFHMSPKEAMQTDPAQRLALL
WdPKS           VPPDRFPVESHTDPSGKKKNTSHTPFGNFIEKPGLFDARFFNMSPREAAQTDPMQRLMLT
                :* :*: .  * * :*  .***:.  * ::...* **.:**:***:** *:** **: *

FgPKS           TAYEALEMASIVPDRTPSTQRDRVGVFYGMTSDDWREVNSGQNVDTYFIPGGNRAFTPGR
wA              TAYEALEGAGFVPDSTPSTQRDRVGIFYGMTSDDYREVNSGQDIDTYFIPGGNRAFTPGR
pks4            TAYEALEMAGVVPDRTPSTQRNRVGVYYGTTSNDWGEVNSSQDVDTYYIPGANRAFIPGR
WdPKS           TGYXAMEMAGIVPGXTPSTXHDRIGTFYGQTSXXWREVNAAXDIDTYFISGGVRAFGPGR
                *.* *:* *..**. **** ::*:* :** **  : ***:. ::***:*.*. *** ***

FgPKS           LNYFFKFSGPSASVDTACSSSLVGLHLACNSLWRNDCDTAIAGGTNVMTNPDNFAGLDRG
wA              INYYFKFSGPSVSVDTACSSSLAAIHLACNSIWRNDCDTAITGGVNILTNPDNHAGLDRG
pks4            VNYFFKFTGPSIAVDTACSSSLAAINLAITSLKNRDCNTAIAGGTNVMTNPDNFAGLDRG
WdPKS           INYFFKFSGPXFSVDTACSSSLAAMNVAITSLRANECDTVFTGGANVLTNSDIFSGLSRG
                :**:***:**  :*********..:::* .*:  .:*:*.::**.*::**.* .:**.**

FgPKS           HFLSRTGNCNTFDDGADGYCRADGVGTIILKRLEDAEADNDPILGVILGAYTNHSAEAVS
wA              HFLSRTGNCNTFDDGADGYCRADGVGTVVLKRLEDALADNDPILGVINGAYTNHSAEAVS
pks4            HFLSRTGNCKAFNDGADGYCRADGIGTLILKRLPDAIADSDPIFGVILGAHTNHSAESVS
WdPKS           HFLSKTGSCKTWDNDADGYCRGDGVCTVIMKRLDDALADRDPVLGVIRGIGTNHSAEAVS
                ****:**.*::::::.******.**: *:::*** ** ** **::*** *  ******:**

FgPKS           ITRPHAGAQEYIFSKLLRESGTDPYNVSYIEMHGTGTQAGDATEMTSVLKTFAPTSGFGG
wA              ITRPHVGAQAFIFKKLLNEANVDPKNISYIEMHGTGTQAGDAVEMQSVLDVFAPDHRRG-
pks4            ITRPLADAQEYLFKKLLNETGIHPHDVSYVEMHGTGTQAGDAVEMRSVLNSFAFDHSRP-
WdPKS           ITHPCAENQAFLFDKVLKECNVHCNDVNYVEMHGTGTQAGDGIEMESVSSVFAPRQPRR-
                **:* .  * ::*.*:*.* . .  ::.*:***********. ** ** . **

FgPKS           RLPHQNLHLGSVKANVGHGESASGIIALIKTLLMMEKNMIPPHCGIKTKINHHFPTDLTQ
wA              --PGQSLHLGSAKSNIGHGESASGVTSLVKVLLMMKENMIPPHCGIKTKINHNFPTDLAQ
pks4            --RDKSLYLGSVKANVGHAESASGVLAIIKVLLMMQKNTIPPHCGIKTKINQGFPKDLDH
WdPKS           -RPDQPLYVGAVKSNIGHGEAVSGVSALIKVLLMLQKNKIPPHTGIKKQINKNFAPDLKE
                    : *::*:.*:*:**.*:.**: :::*.***:::* **** ***.:**: *. ** .

FgPKS           RNVHIAKVP-TSWTRSGQANPRIAFVNNFSAAGGNSAVLLQDAPQPSVVSDVT--DPRTS
wA              RNVHIALQP-TAWNRPSFGKRQI-FLNNFSAAGGNTALLLEDGPVSDPEGE----DKRRT
pks4            RGVRIALKDSVDWSRPEGGKRRV-LVNNFSAAGGNTSLLLEDGPAVHPARQHQDGDARTE
WdPKS           RNVNIAFQT-TPFPRPPGGKRTV-FINNFSAAGGNTAMLLQDGPEVPTEPSS---DPRST
                *.*.**    . : *.  .:  : ::*********:::**:*.*      .    * *

FgPKS           HVVTMSARSADSLRKNLANLKELVEGQ----GDSEVGFLSKLSYTTTARRMHHQFRASVT
wA              HVITLSARSQTALQNNIDALCQYISEQEKTFGVKDSNALPSLAYTTTARRIHHPFRVTAI
pks4            HVVAVSARSTKALEENLKALEAYIANS----WAPEGELLSQLSYTTTARRVHHSRRVAFV
WdPKS           HVVTXSAKSLAAFKRTLAKYEAYLNAH-------PNVGLPDLAYTVTARRAHYSLPRRFP
                **:: **:*  ::...:      :              *..*:**.**** *:

FgPKS           AQTREQLLKGLD-SAIERQDVKRIPAAAPSVGFVFSGQGAQYRGMGKEYFTSFTAFRSEI
wA              GSSFQEMRDSL--IASSRKEFVAVPAKTPGIGFLFTGQGAQYAAMGKQLYEDCSHFRSAI
pks4            TNGLDDLRKSLLKAATDAGQVKGIPAVSPKVGFLFTGQGAQETAMAIGYYKSFSSFRSDI
WdPKS           VQSISQLQASLR--AIQDQTHNPIPLASPQIAMAFTGQGSQYTGMGQKLFETSKQFRQDI
                 .  .::  .*   * .      :*  :* :.: *:***:*  .*.   :   . **. *
```

```
FgPKS           MSYDSIAQAQGFPSILPLIRGEVEADSLSPVEIQLGLTCLQMALAKLWKSFGVEPGFVLG
wA              EHLDCISQGQDLPSILPLVDGSLPLSELSPVVVQLGTTCVQMALSSFWASLGITPSFVLG
pks4            HQLDSIATLQGLPSVLPLIHGTTPVEDLSAVVVQLGTCIIQISLARFWISLGITPQYVIG
WdPKS           EEFNEIALRQGLPSIMPLIDGSVEVQHLPPTVVQLGMCCIQMALTHLWSTWGIQPSVVIG
                   : *:  *.:**::**: *    . *... :***   :*::*: :* : *: *  *:*

FgPKS           HSLGHYAALHVAGVLSANDTIYLTGIRAQLLVDKCQAGTHSMLAVRASLLQIQQ-FLDAN
wA              HSLGDFAAMNAAGVLSTSDTIYACGRRAQLLTERCQPGTHAMLAIKAPLVEVKQ-LLNEK
pks4            HSLGEYAALQIAGVLSVNDAIFLCGHRAALLDKKCTAYTHGMVAVKAAADDLRQ-HISSD
WdPKS           HSLGEYAALQAAGVLSIADTIYLVGKRAQLLEQKCTAGTHAMLAVRSPVGGLQDVVANSH
                ****.:**:: *****  *:*:  * ** ** .:* . **.*:*:::.   :::   . .

FgPKS           IH-EVACVNGSREVVISGRVADIDQLVGLLSADNIKATRVKVPFAFHSAQVDPILSDLDT
wA              VH-DMACINSPSETVISGPKSSIDELSRACSEKGLKSTILTVPYAFHSAQVEPILEDLEK
pks4            LKVEIACVNGAEDTVLSGPNADIESLCGKLTQAGYKLHKLEIPFAFHSSQVDPILDDLEE
WdPKS           GKIENCGINGVSDTVLSGTMGDIDTVAQKLADAGQKCTKLKLPFAFHSSQVDPILADFEK
                 : : . :*.  :.*:**  ..*: :    :  . *   : :*:****:**:*** *::

FgPKS           AASRVTFHSLQIPVLCALDSSVISPGNHGVIGPLHLQRHCRETVNFEGALHAAEHEKIIN
wA              ALQGITFNKPSVPFVSALLGEVITEAGSNILNAEYLVRHCRETVNFLSAFEAVRNAKL-G
pks4            LASQVGFHEPKLPIVSPLLRTLLTG---DTLGPQYIRRHCRETVDFLGAIKMAESQGI-M
WdPKS           LASSVNYHPPRVPVISPLLSDVVSVG--GVFDAFYLSRHCRKTVDFVGGLSAGMSTAT-I
                  . : ::   :*.:..*   :::    . :.. :: ****:**:* ..:

FgPKS           KTSTLWIEIGPHVVCSTFLKSSLGPSTPAIASLRRNDDCWKVLADGLSSLYSSGLTIDLN
wA              GDQTLWLEVGPHTVCSGMVKATLGPQTTTMASLRRDEDTWKVLSNSLSSLYLAGVDINWK
pks4            DRSGMCIEIGAHPILTRMVKSIIGQDFRCLASLRRKEDHFKTLADSLCALHLAGFSVNWD
WdPKS           SDTSLWLEVGGHPLCASMIKSCL--SVPTLATMRRDEDPWKIISASMAGLYTAGKSLNWD
                    : :*:* * : : ::*: :  .   :*::**.:* :* :: .:..*: :*  :: .

FgPKS           EYHRDFKASHQVLRLPCYSWEHKNYWIQYKYDWSLAKGDPPIAP------NSSVEAVSA-
wA              QYHQDFSSSHRVLPLPTYKWDLKNYWIPYRNNFCLTKGSSMSAA------SASLQPT---
pks4            EYHRDFASSRNVLQLPKYSWQLANYWMQYKYSWCLTKGDAPVENGPV---GAVVQARAL-
WdPKS           AFHKENESLRVLNDLPFYGFDEKNYWLQYTGDWLLYKGDYPKAIAPAPAAAAAARPAKAR
                 :*::  : : :  ** * ::  ***: *  .: * **.            :  ..

FgPKS           -LSTPSVQKILQETSLDQVLTIVAETDLASPLLSEVAQGHRVNGVKVCTSSVYADVGLTL
wA              -FLTTSAQRVVESRDDGLTATVVVHNDIADPDLNRVIQGHKVNGAALCPSSLYADSAQTL
pks4            -RLSDSVHNVIEQVHGDKRSSITVESDMHDPSLLAIAQNHRVNGLTMAPSTLFADIAFTL
WdPKS           KYLSTSVQGIVSEEVKGKTVTIVAESDFAHPKLFPVIAGHLVNGSGLCPSTLYADMAYTL
                   : *.: ::..   .   ::....*:  * *  :  .* ***  :..*:::** . **

FgPKS           GKYILDNYRTDLEGYAVDVHGIEVHKPLLLKEDMNGTPQATPFRIEVRY-PIQSTTALMS
wA              AEYLIEKYKPELKGSGLDVCNVTVPKPLIAKT---GKEQ---FRISATANWVDKHVSVQV
pks4            AKHLIQNHGLDTHTNLPSINNMAVEKALIVGET---GPQL—FRASLDMDWTTMRGSVRI
WdPKS           GQLGVGLLKPGEKVD-INIGTMDNPAPLLLKN--INQPE---SQIVQMTMKIDLDARKAD
                .:  :       .    .:  :    .*:         :    :

FgPKS           ISTTGP-NGQHIKHANCELRLEHPSQWEAEWDRQAYLINRSVNCLLQRSAQGLDSMLATG
wA              FSVTAE-GKKLIDHAHCEVKLFDCMAADLEWKRGSYLVKRSIELLENSAVKGDAHRLRRG
pks4            FSVGAN-GKQTTLHAVCDVAVENPSSHRESWQSNAYLIQRGIKQLVQGASDGSAHMMRRG
WdPKS           FAVTSNNGKKDVTHAKCVIVFEDAAVWKEQWSKTSYLIQSRIDMLKHKMENGEADKVSRA
                ::. .  . :   ** * : . .      .*.  :**::  :. * :   .*    :  .

FgPKS           MVYKVFSSLVDYADGYKGLQEVVLHSQELEGTAKVRFQTP--SGGFVCNPMWIDSCGQTT
wA              MVYKLFSALVDYDENYQSIREVILDSEHHEATALVKFQAP--QANFHRNPYWIDSFGHLS
pks4            LLYKIFSNSVQYGSAFQGIEQVWFDSEGLEGTGKVFMPSG--KDTFALNPYCCDSLGHIT
WdPKS           MAYKLFGALVDYADIFQGMQNVVFDGPEFEATSNIKFRAGPNDGDFYFSPYFIDSACHLS
                : **:*.  *:* . ::.:.:* :..   *.*. : : :   .  *  .*   **  : :

FgPKS           GFMMNCHQTTPN-DYVYVNHGWKSMRLAKAFREDGTYRTYIRMRPI--DSTKFAGDLYIL
wA              GFIMNASDGTDSKSQVFVNHGWDSMRCLKKFSADVTYRTYVRMQPW--RDSIWAGNVYIF
pks4            GFIMNCSDSLDLDDHVYINHGWRTLRLVEPYQCDVQYQTYVKMQAVGSDDSTYSGDVHVL
WdPKS           XFTVXATVXPQD--ECYISHGWSSLRFIEPLQHDQQYYAYLKMQPVS-GSKXRAGDVYVF
                 * : .          ::.*** ::*  :    *  * :*::*:.    ..  :*:::::
```

```
FgPKS           DEDDTVVGVYGDITFQGLPRRVLNTVLP----------SANAVPVDAP---MGRRDVPPS
wA              EGDD-IIAVFGGVKFQALSRKILDIALP----------PAG----------LSKAQTSPI
pks4            RDGK-IIGICGGVTFKKVARKVLEMLLPK---------PSGAKAKHGV---VKHVAPEPV
WdPKS           NADKXVLRLAGGVRFQCIPRKLMDVMMPKPKANAKAASPASATPKAAPTVKASSNLAAPA
                  .. :: : *.: *: :.*::::  :*          .:.                 *

FgPKS           RMDVPPVRSGEGPPTSAPTQQAIALPFAADTSMDSRLRPLLRILSEEIGLGLDVLSDDEL
wA              QSSAPQKPIETAKPTSRPAPPVTMKSFVKKSAGPSVVVRALNILASEVGLSESDMSDD-L
pks4            KHVVLTPPSTTSHSVGTTSPPEPTESPVGSASG--LIQKALEIIADEIGVDISQLTDT-T
WdPKS           SVELPTPKVKAKKPVKAQKIKAPAPPKQASSGS--LVVRAFEIIAKEIDVDQSELNDD-I
                            ..          .   .:.    :   :.*::.*:.:. . :.*

FgPKS           DFADHGVDSLLSLTITGRMREELGLDVESTAFMNCPTLGSFKLFLG-LV------DQDNK
wA              VFADYGVDSLLSLTVTGKYREELNLDMDSSVFIEHPTVGDFKRFVTQLS------PSVAS
pks4            LLADLGVDSLMSLTILGNFREELDLDIPAAQFYEFSTVQDLKSFLG----------ANDQ
WdPKS           QWADMGVDSLMSLTISGKFREDLDLEVXSTLFTDYASVGALRKHLSGMSGPEPIATGDAS
                  ** *****:***: *. **:*.*:: :: * : .::  :: .:             .

FgPKS           GSSGSDGSGRSSPAPGTESGATTP--P-----------------MSEE---DQDKIVSSH
wA              DSSSTDRESEYSFNGDSCSGLSSPASP----------------GTVSP---PNEKVIQIH
pks4            DFSSSNSEAESS---ASSAASTSP---------------------SD----HGDDVVEEV
WdPKS           SVESTDSGSESDED-TVESGITTPDTEXFPAKXQEQGKSAAVEAMAQPPSAEGQDMIETI
                . ..::  .. .      :. ::*                      .      :.::.

FgPKS           S------------------------------------------------------------
wA              ENGT---------------------------------------------------------
pks4            KPVV---------------------------------------------------------
WdPKS           RVVIAQEMEMDLAEITDXTDLSNLGMDSLMALTVLGKLREDHDIDLDPTILADNPTLAHL


FgPKS           -----------------------------------LHQFQASSTLLQG-SPSKARSTLFL
wA              -----------------------------------MKEIRAIIADEIGVSADEIKSDENL
pks4            -----------------------------------AEIPRSTSTILQG--TKHCSQTLFL
WdPKS           RKALGLEKAKPAPAPKQXVRTNVVVAPAAPPVXVVVXXPPATSVLLQG-NPKTATXNLFL
                                                      :  .   *  ..       *

FgPKS           LPDGSGSATSYASLPPISPDGDVAVYGLNCPWLKDSSYLVEFGLKGLTELYVNEILRRKP
wA              NELGMDSLLSLTVLGKIRESLDMDLPG-------------EFFIENQTLDQIETALDLKP
pks4            FPDGAGSATSYVTLPSISS--DMRVIGLNSPYLTKP-HEFNCALQDITGSYLNEVRRRQP
WdPKS           FPDGSGSATSYVSIPAIDSX-NLAVYGLNCPFMKDP-TSYTCGIXSVSXLYLEKVLXRQP
                   * .*  * . :  *    :: : *                : . :   ::     :*

FgPKS           QGPYNLGGWSAGGICAYEAALILTRAG-------HQVDRLILIDSPNPVGLEKLPPRLYD
wA              KAVPTAVPQSQ------PITLPQSQST-------KQLSTRPTSSSDN------HPP----
pks4            QGPYHLAGWSAGGVSAFDAARQLVSEG-------EVVESLILIDSPNPVGLGKLPKRMYD
WdPKS           NGPYILXGWSASGVFAYXITXQLXDLQXLHPDKNYTVEKLNLIXSPCPIRLEPLPARLHH
                :.       *         :                :.      *         *

FgPKS           FLNSQNVFGSDNPHSTAGTSVKAPEWLLAHFLAFIDALDAYVAVPWDSGLVGLASPLPAP
wA              ---ATSILLQGNPRTASKT--------LFLFPDGSGSATSYATIPGVSPNVAVYG-LNCP
pks4            FLEKSGIFGAFEMGEEAQAP---PDWLFQHFCVFIEALDRYVPEPFEHGMAPKTT-----
WdPKS           FFDEIGLLGTG----TGKT----PNWLLPHFEYSIKALTAYRPELKSTRDFNAPP-----
                     .::        . :        :  *     :   * .

FgPKS           PQTYMLWAEDGVCKDSDSARPEYRDDDPREMRWLLENRTNFGPNGWEALLGGKEGLFMDR
wA              ---YMKAPEKLTCS-LDSLTTPYLAEIRR--------RQPTGPYN----LGG-----WSQ
pks4            ----IIWAADGVCKNPDDPRPEAQPDDPRGMNWLLNNREDFGPNGWDEFIGAG-NISTMA
WdPKS           --TLLIWATDGVCGKPGDPRPPPQADDPKSMKWLLENRTDFGPNGWDKLLGA--EVCKMV
                    :  . . .*   ..  .    :  :        *   ** .    :*.


FgPKS           IAEANHFSMLKRGRNAEYVSAFLARALDN------
wA              AGSA---------HTTRHASSYCSRAK--------
pks4            IENANHFT----MMREPIASALCAKIRETMGVN--
WdPKS           TVVGNHFT----MMKPPVAKGVGQYIRESLSMXRA
                   .              ...
```

Das mit ClustalX erzeugte Alignment zeigt die folgenden statistischen Werte der Übereinstimmung zwischen den Proteinstrukturen:

	FgPKS	wA	pks4	WdPKS	
FgPKS	100%				Identität
	0%				Juxtaposition größer als Null
	0%				Aligned mit Lücken
wA	43%	100%			Identität
	60%	0%			Juxtaposition größer als Null
	5%	0%			Aligned mit Lücken
pks4	43%	39%	100%		Identität
	60%	56%	0%		Juxtaposition größer als Null
	5%	7%	0%		Aligned mit Lücken
WdPKS	37%	35%	37%	100%	Identität
	54%	51%	53%	0%	Juxtaposition größer als Null
	10%	12%	10%	0%	Aligned mit Lücken

Abb. 55: Alignment der PKS aus *F. graminearum* (FgPKS) mit PKSs aus *A. nidulans* (wA), *G. fujikuroi* (pks4) und *W. dermatitidis* (WdPKS). Zeichen in der Consensusreihe: `*`, identische Aminosäuren in allen Sequenzen des Alignments; `:`, konservierte Substituenten; `.`, semikonservierte Substituenten.

Danksagung

Ich möchte den folgenden Personen herzlich danken:

Herrn Prof. Wilhelm Schäfer für die Überlassung des Themas, seine intensive Betreuung und die dauernde Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Horst Lörz für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Der BASF AG für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung. Dort besonders Dr. Annette Freund, Dr. Thierry Lacour und Dr. Jan Rether sowie den zahlreichen, nie kennen gelernten Mitarbeitern.

Frank (mit dem komischen Dialekt) für die brillante Einführung in die Arbeit mit *Fusarium graminearum*, der wie er ein Schwabe ist. Und für die vielen Späßle, die ich mit ihm machen konnte. Es war immer wieder lustig, von ihm hereingelegt zu werden und um so lustiger, es ihm heimzuzahlen. Unvergessen bleiben seine Feschtle (besonders das mit diesem vergorenen Apfelsaft!).

Anke, die (wie ich) normales Hamburgisch spricht, für die zahlreichen, oft sehr langen, aber immer sehr nützlichen Ratschläge und Diskussionen. Die einen schon manchmal mit ihren stand up Kolloquien an den Rand der Verzweiflung führen kann ("Warum darf man NaOH nicht in der Glasflasche lagern?"), die aber, berühmt auch durch die Einführung der General Points, (fast) alles am Laufen hält und es letztlich immer gut meint und immer wieder Aufbauarbeit leistet (zur Not auch musikalisch z.B. mit "The Roots of Robert Johnsen" DANKE!!!). Vielen Dank auch für das Lesen der Rohfassung dieser Arbeit!

Willi (auch mit einem komischen Dialekt, den ich aber meist verstanden habe) für seinen andauernden Glauben an mich (auch wenn ich ihn mal verloren hatte). Für seine guten Ideen; wie schön wäre es gewesen, diese alle umsetzen zu können. Und letztlich natürlich für seine tollen Partys. Nie werde ich das Fass vergessen, aus dem zunächst nur Schaum, aber dann auch 'ne Menge Bier kam. Und z.T. ist auch die Musik, die er hört, ganz O.K. (einige Stücke sind sogar richtig gut!).

Katrin für ihre umfassende Kompetenz (die sie vor allem an zahlreiche *E. coli* - Zellen weiter gegeben hat). Für ihre immer vorhandene Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit im Labor (und das meine ich jetzt vollkommen ernst!). Für den super Humor und so manch lustige Transformationswettrunde. Beeindruckend auch ihre Furchtlosigkeit (abgesehen von Spinnen, Tomaten und natürlich Paul: "Ups, der ist ja ganz schön groß!"). Aber auch ihr Können, eine Bierflasche (fast) ohne weitere Hilfsmittel zu öffnen. "Willste noch 'n Wartburg?"

Nicole (Lassie) für den gemeinsamen Kampf gegen einen Pilz, der so häufig menschliche Züge annahm ("Mein Gott, ist der wieder zickig!"). Für unsere gemeinsame Ratlosigkeit über das merkwürdige Verhalten des Pilzes. Für das gegenseitige Mutzusprechen in kniffligen Situationen. Für den ein oder anderen putzigen Versprecher und die extrem schnellen Reaktionen auf einige kurze Fragen ("Las mich kurz nachdenken.....[und weg war sie

erst mal auf längere Zeit] ....."). Auch Dir, vielen Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit und die sehr hilfreichen Anregungen.

Meike für die nette Zusammenarbeit. Für die Zuverlässigkeit im Labor ("... ja dann mach doch am besten... Ach, das hast Du schon gemacht, hm, prima, danke, O.K.") und vor allem für den Humor und die trockenen Sprüche ("J., Du bist ja echt 'ne Pfeife!"). Auch dafür, endlich noch einen Menschen (außer Jasna) zu kennen, der Schildkröten liebt und versteht (so kommt auch Paul nicht nur immer bei Hausschuhen zum Zug...).

Cathrin einfach dafür, dass sie da war. Immer zu einem lustigen Schwätzchen oder einer kurzen Schlägerei bereit. Doch auch ernste Gespräche waren möglich (wie mit allen bisher und im folgenden genannten Personen). Unvergessen auch unser Exkurs in die Comic-Welt mit dem legendären Ovidio ("...ähh, mal sehen, ähh, keine Ahnung..."). Legendär auch der plötzliche Themenwechsel, wenn ein prekäres Thema aufkam. Aber statt diesen Themenwechsel ernsthaft weiter zu betreiben, wurde lieber mit hochrotem Kopf weiter gelacht. Ach ja, und Cathrin mit ihrem immer wieder gern gewählten Brgrrrgrggg (so heißt das doch, oder?).

Brigitte für die unermüdliche Bestellung aller notwendigen Dinge (Primer und alles, was man so braucht). Für den Humor und die großartige Fähigkeit, über sich selbst zu lachen und Zwergenspäße nicht übelzunehmen. Dafür ist sie auch der einzige Mensch, der sich im Stehen hinter dem Fotokopierer verstecken kann.

Birgit, die einfach immer mit Rat und Tat zur Verfügung stand, und einem die Erfahrung von mehreren hundert Jahren Laborarbeit weitergeben konnte. Auch hier wollen wir den Humor nicht vergessen, der meist recht trocken, aber immer sehr gut war. Ordentlich zurückschießen ist ihre Devise, hat immer Spaß gemacht!

Törppela-Attila, der erste Ungar, den ich kennen gelernt habe. Aber was für einer! Die ersten zusammenhängenden Sätze, die ich von ihm (in fast perfekten Deutsch!!!) gehört habe, bildeten den Teekännchen Witz!!! Na ja, dann war alles klar. Wir hatten viel Spaß!!!

Einen großen Dank auch an den Rest der AMP IIIer!!!!

Und schließlich, selbstverständlich einen großen Dank an Franky. Vielen Dank für die lustigen und auch aufbauenden Gespräche (besonders in sehr schwierigen Phasen). Vielen Dank dafür, dass aus der ursprünglichen Zusammenarbeit eine echte Freundschaft geworden ist! Vielen Dank für den gemeinsamen Sport (wird wiederkommen!!!). Vielen Dank für die Momente einer kurzen Cola (ACHTUNG, KEIN WECHSELGELD) auf der Bank (ich sage nur: "Zzzzzhh, aaaahhhh"). Wo immer so grandiose Filme abliefen. Wo man nie sicher sein konnte, ob wieder die -70iger Truhe aufgegangen war. Wo so manche Statistik der Zusammensetzung dieser Welt durch hypermäßige Abweichungen vom Mittelwert *ad absurdum* geführt wurden. Wo wir wirklich ALLES besprechen konnten (was wäre nur sonst aus uns geworden??). Und auch die zwangsweisen Ausweichmanöver zum Gartenkiosk (weil mal wieder der Automat machte: ssshhhh, klick, klong..... und Nu?) waren immer wieder ein Highlight der Labortage. Auch dort, zwischen den Füllungen zahlreicher -70iger Truhen, war es immer wieder schön!!

Ein weiterer Dank gilt Janbo. Vielen Dank, dass Du immer da warst, wenn man Dich gebraucht hat. Du bringst es immer wieder fertig, dass es einem besser geht, wenn man mit Dir geredet hat. Aber nicht nur in schlechten, auch in den guten Zeiten, ist es einfach Gold wert, Dich einen Freund nennen zu können. Ich glaube, du weißt, was ich Dir in diesen wenigen Worten sagen will?!

Last but not least, mein allergrößter Dank gilt meinem Ein und Alles, Jasna. Trotz einer sehr schweren Zeit, hat sie letztlich zu mir gehalten. Sie hat mich schließlich sogar geheiratet, wofür ich ihr sehr dankbar bin. Dies alles, trotzdem es nicht immer einfach war mit mir, und ich auch sehr häufig den Frust und die Sorgen aus dem Labor nach Hause gebracht habe. Sie hat mir (fast) alles nachgesehen, hat mich tagtäglich unterstützt und mir immer wieder Mut gegeben. Sie hat mich in allen Entscheidungen beraten, mir aber immer die Freiheit gelassen, diese letztlich selbst zu treffen. So vieles hat sie mir abgenommen, hat mir den Rücken frei gehalten. Hat sich immer und immer wieder tausendundeine Laborgeschichte angehört. Vielen, vielen lieben Dank!!! Und alles in allem, was haben wir auch gelacht (und tun das weiter), über und mit uns. Und auch vielen, vielen Dank für die Unterstützung in der Endphase dieser Arbeit, für das Korrekturlesen und die kritischen Ratschläge (besonders, was die langen Sätze anging, hätte ich früher auf Dich hören sollen!!). Und dafür, dass Du mir nicht längst verboten hast, *Fusarium graminearum* auch nur zu denken. Dafür, dass Du mich sogar darin unterstützt, mit diesem lästigen Pilz weiterzuarbeiten. Und für einfach alles, was Du für mich getan hast und tust, dass Du immer an mich glaubst und für mich da bist.