

**Zellwandveränderungen durch Modifikationen
der (1,3)- β -Glucansynthase
(FgGSL1) und Deletion der Serin/ Threonin
Proteinkinase gad8 (FgPK1)
in *Fusarium graminearum***

Dissertation

zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik
und Naturwissenschaften,
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Annemarie Glöckner

geb. 07.09.1987 in Osterburg

Hamburg, August 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Hoth

Tag der Disputation: 18.11.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Das Getreidepathogen <i>Fusarium graminearum</i>	1
1.2. Die Bedeutung der pilzlichen Zellwand	3
1.2.1. Struktureller Zellwandaufbau	4
1.2.2. Zellwandbiosynthese von strukturgebenden Polysacchariden	8
1.2.2.1. Die (1,3)- β -Glucanbiosynthese	9
1.2.2.2. Die Chitinbiosynthese	12
1.3. Die Bedeutung von Proteinkinasen in Eukaryonten	14
1.3.1. Funktionsweise von Proteinkinasen	14
1.3.2. Proteinkinasen in Ascomyceten und das Kinom von <i>F. graminearum</i>	16
1.3.3. Die Serin/ Threonin Proteinkinase gad8 FgPK1 von <i>F. graminearum</i>	18
1.4. Zielsetzung dieser Arbeit	20
2. Material und Methoden	22
2.1. Material	22
2.1.1. Allgemeine Chemikalien	22
2.1.2. Kits	22
2.1.3. Oligonukleotide	23
2.1.4. <i>F. graminearum</i> -Stämme und Kultivierungsbedingungen	27
2.2. Methoden	29
2.2.1. Hefe-Rekombinations-Klonierung und deren Anwendung zur Generierung von Transformationsvektoren für <i>F. graminearum</i>	29
2.2.2. Protoplasten-Transformation des <i>F. graminearum</i> Wildtyp-Stammes PH-1	34
2.2.3. Vereinzeln (engl. Single) von Konidien	36
2.2.4. Isolierung genomischer DNA aus <i>F. graminearum</i> -Myzel	37
2.2.5. Southern Blot	38
2.2.6. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzmyzel und cDNA-Synthese	41

2.2.7. Expressionsanalyse mittels Quantitativer Real-Time PCR (qPCR)	42
2.2.8. Phänotypische Charakterisierung der generierten GSL1-Mutanten	43
2.2.9. Infektionsstudien auf Weizenähren	45
2.2.10. Zellwandanalyse von <i>F. graminearum</i>	46
2.2.11. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (engl. CLSM)	49
2.2.12. Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$	50
3. Ergebnisse	55
3.1. Charakterisierung generierter GSL1-Mutanten	55
3.1.1. Generierung und molekularbiologische Charakterisierung der GSL1-Fusionskonstrukte	56
3.1.2. Reduziertes Wachstum der GSL1-Mutanten auf Vollmedium	64
3.1.3. Auswirkungen des fusionierten Fluoreszenzproteins auf die Morphologie der Konidien	66
3.1.4. Mikroskopische Untersuchungen zur Auskeimung von Konidien und primäres Hyphenwachstum der GSL1-Stämme	68
3.1.5. Reduktion der Virulenz auf Weizenähren der GSL1-Mutanten	70
3.1.6. Verschiebung des relativen Chitin- und Glucangehalts in der Zellwand der GSL1-Mutanten	72
3.2. Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$ in Hinblick auf Zellwandmodifikationen und Bildung von blasenartigen Strukturen	75
3.2.1. Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierungen von $\Delta pk1$	75
3.2.2. Wachstumsphänotyp von $\Delta pk1$ auf Voll- und Minimalmedien	78
3.2.3. Mikroskopische Untersuchung der Auskeimungsfähigkeit und primäres Hyphenwachstum von $\Delta pk1$	79
3.2.4. Visualisierung pilzlicher Zellwandpolymere mithilfe spezifisch bindender Fluorophore	82
3.2.5. Dokumentation von Ultrastrukturen in den Blasen von $\Delta pk1$ am Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	84
3.2.6. Hyphen- und Zellwanddurchmesser der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp	86
3.2.7. Visualisierung von Chitin und (1,3)- β -Glucan durch Immunogoldmarkierung	88

3.2.8. Vernetzung zwischen Chitin- und (1,3)- β -Glucan-Filamenten in der Zellwand der blasenartigen Strukturen von $\Delta pk1$	90
3.2.9. Zellwandanalyse der Deletionsmutante und des Wildtyps mittels HPAEC-PAD	93
3.2.10. Expressionsanalyse der Chitinsynthase und (1,3)- β -Glucansynthase-Gene im Pilzmyzel von $\Delta pk1$ und dem Wildtyp	95
4. Diskussion	97
4.1. Bedeutung des Zellwand-Strukturproteins (1,3)- β -Glucansynthase in <i>F. graminearum</i>	97
4.1.1. Klonierungsstrategien zur Generierung eines fluoreszierenden Fusionsproteins der (1,3)- β -Glucansynthase <i>in vivo</i>	98
4.1.2. Fusion von FgGSL1 mit einem Fluoreszenzprotein führt zur Inhibierung des Wachstums sowie zu morphologischen Veränderungen der Konidien	101
4.1.3. Verringertes Wachstums der GSL1-Mutanten verursacht reduzierte Virulenz auf Weizenähren	103
4.1.4. Reduktion des (1,3)- β -Glucansynthase-Transkripts durch RNA-Interferenz führt zu vergleichbaren Phänotypen der GSL1-Mutanten	105
4.2. Zellwandanalyse als Methode zur Identifizierung von Zellwand-defizienten <i>F. graminearum</i> -Mutanten	108
4.3. Erhöhte Genexpression der Chitinsynthase 3 und Deregulation des Aktinnetzwerks als Ursachen für Zellwanddefekte von $\Delta pk1$	111
4.4. Identifizierung von strukturellen Modifikationen der Zellwand mittels hochauflösender Mikroskopiemethoden in $\Delta pk1$	115
4.5. Rekonstruktion des strukturellen Zellwandaufbaus der Deletionsmutante $\Delta pk1$ und des Wildtyps von <i>F. graminearum</i>	119
4.6. Ausblick	122
5. Zusammenfassung	124
6. Abstract	126
7. Literaturverzeichnis	128
8. Anhang	X
Danksagung	XV
Eidesstattliche Erklärung	XVI

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AG	Arbeitsgruppe
<i>A. gossypii</i>	<i>Ashbya gossypii</i>
<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Varianzanalyse)
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. distachyon</i>	<i>Brachypodium distachyon</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	base pairs (Basenpaare)
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
cDNA	komplementäre DNA
<i>C. graminicola</i>	<i>Colletotrichum graminicola</i>
Chs	Chitinsynthase(n)
CLSM	konfokale Laserscanning-Mikroskopie
CM	<i>Complete Media</i> (Vollmedium)
Con A	Concanavalin A
CSPD Phosphatase	Chemilumineszenzsubstrat für alkalische
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DON	Deoxynivaleon
dpi	days post inoculation (Tage nach der Infektion)

<i>dSTORM</i>	direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>F. graminearum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
FHB	<i>Fusarium Head Blight</i> (Ährenfusariose)
<i>F. oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
fwd	forward
GA	GA-Linker (Sequenz zur Klonierung)
gDNA	genomische DNA
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSL	Glucan Synthase Like
HPAEC-PAD	High Performance Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
Hyg	Hygromycin B
kb	kilo base (Kilobase)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PEG	Polyethylenglycol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PK	Proteinkinasen
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
rev	reverse

rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNA	<i>Synthetic Nutrient Poor Agar</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskop(ie)
TMD	Transmembrandomäne(n)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
UTR	untranslatierter Bereich
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WT	Wildtyp
YPD	<i>Yeast Pepton Dextrose</i> (Vollmedium)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Symptome einer <i>F. graminearum</i> -Infektion auf Weizen	1
Abbildung 1-2: Struktureller Aufbau einer pilzlichen Zellwand	5
Abbildung 1-3: Funktionsweise von Proteinkinasen und –phosphatasen	15
Abbildung 1-4: Phylogenetische Analyse der Proteinkinasegene von <i>F. graminearum</i>	17
Abbildung 2-1: Prinzip der Hefe-Rekombinations-Klonierung	30
Abbildung 3-1: Generierung der <i>GSL1-GFP A-1</i> Mutante mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstrukts	55
Abbildung 3-2: Generierung der <i>GSL1-GFP B-1</i> und <i>B-2</i> Mutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstrukts	60
Abbildung 3-3: Generierung der <i>GFP-GSL1 C-1</i> und <i>C-2</i> Mutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstrukts	62
Abbildung 3-4: Generierung der <i>mCh-GSL1 D-1</i> und <i>D-2</i> Mutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstrukts	63
Abbildung 3-5: Hyphenwachstum der generierten <i>GSL1</i> -Mutanten auf Vollmedium	65
Abbildung 3-6: Morphologie und Länge der Konidien der <i>GSL1</i> -Mutanten	67
Abbildung 3-7: Auskeimung und primäres Hyphenwachstum der <i>GSL1</i> -Mutanten	69
Abbildung 3-8: Virulenz der <i>GSL1</i> -Mutanten auf Weizen	71
Abbildung 3-9: Monosaccharid-Bestimmung aus Zellwandextrakten vom <i>F. graminearum</i> -Wildtyp sowie <i>GSL1</i> -Mutanten	74
Abbildung 3-10: Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung von $\Delta pk1$	77
Abbildung 3-11: Hyphenwachstum der Deletionsmutante $\Delta pk1$ auf Minimal- und Vollmedium	79

Abbildung 3-12: Mikroskopische Dokumentation der Auskeimung und primäres Hyphenwachstum der Deletionsmutante $\Delta pk1$ im Vergleich zum Wildtyp 8-1	80
Abbildung 3-13: Mikroskopische Analyse zur Bildung blasenartiger Strukturen v. $\Delta pk1$	81
Abbildung 3-14: Visualisierung von Zellwandpolysacchariden in Hyphen der Deletionsmutante und des Wildtyps	83
Abbildung 3-15: Ultrastrukturen und Zerplatzen einer Blase von $\Delta pk1$	85
Abbildung 3-16: Unterschiede im Hyphen- und Zellwanddurchmesser v. $\Delta pk1$ und 8-1	87
Abbildung 3-17: Immunogoldmarkierung von Chitin und (1,3)- β -Glucan	89
Abbildung 3-18: Hochauflösende <i>dSTORM</i> -Aufnahmen zum Zellwandaufbau der $\Delta pk1$ -Blase und des Wildtyps	92
Abbildung 3-19: Monosaccharid-Bestimmung aus Zellwandextrakten von $\Delta pk1$ und des Wildtyps	94
Abbildung 3-20: Expressionsprofil essentieller Gene zum Aufbau der pilzlichen Zellwand von $\Delta pk1$	95
Abbildung 4-1: Schematische Rekonstruktion der Zellwände von 8-1 und $\Delta pk1$	121
Abbildung 8-1: Generierung der <i>FgGSL1[mCh-GSL1 D-1] E-1</i> und <i>E-2</i> Mutanten	X
Abbildung 8-2: Mikroskopische Analyse des Hyphenwachstums von $\Delta pk1$ auf SNA-Festmedium	XII
Abbildung 8-3: Expressionsniveau der (1,3)- β -Glucansynthase in den <i>GSL1</i> -Mutanten	XII
Abbildung 8-4: Mikroskopische Dokumentation zur Protoplastierung von <i>F. graminearum</i> -Myzel	XIII
Abbildung 8-5: Verteilung und Anordnung von Aktinfilamenten in den Hyphen von 8-1 und $\Delta pk1$	XIV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Kits	22
Tabelle 2-2: Verwendete Primer zur Klonierung verschiedener Fusionskonstrukte von FgGSL1 in den Vektor <i>pRS426</i> bzw. <i>pJET1.2</i>	23
Tabelle 2-3: Verwendete Primer zum Nachweis der homologen Integration klonierter Fusionskonstrukte ins <i>F. graminearum</i> -Genom	25
Tabelle 2-4: Verwendete Primer zum Nachweis der Expression auf Transkriptionsebene transformierter Fusionskonstrukte sowie der Deletionsmutante $\Delta pk1$	25
Tabelle 2-5: Verwendete Primer in der Quantitativen Real-Time PCR (qPCR) zur Amplifikation von <i>FgGSL1</i> , diversen Chitinsynthasen und β - <i>Tubulin</i>	26
Tabelle 2-6: Verwendete <i>F. graminearum</i> -Stämme	27
Tabelle 2-7: Kultivierungsmedien für <i>F. graminearum</i>	28
Tabelle 2-8: Verwendete Fluorophore am CLSM sowie deren Zielstrukturen und Extinktions- und Emissionswerte	49
Tabelle 8-1: Berechnete Werte aus der Monosaccharid-Bestimmung mittels HPAEC-PAD	X

1. Einleitung

1.1. Das Getreidepathogen *Fusarium graminearum*

Der filamentöse Pilz *F. graminearum* Schwabe (Teleomorph: *Gibberella zeae* [Schwein.] Petch) zählt zur Gruppe der Ascomyceten (Echte Schlauchpilze) und ist der Haupterreger der Ährenbleiche (engl. *Fusarium Head Blight*, kurz FHB; Abb. 1-1) bei Getreidearten wie Weizen (*Triticum aestivum*) und Gerste (*Hordeum vulgare*). Des Weiteren ist er maßgeblich für die Entstehung der Kolbenfälle bei Maispflanzen (*Zea mays*) verantwortlich (McMullen *et al.*, 1997). Dieses nekrotroph lebende Pathogen kommt vor allem in den gemäßigten und subtropischen Zonen der Erde vor. Nach einem Befall von Wirtspflanzen kann es zu erheblichen Ernteeinbußen und wirtschaftlichen Verlusten kommen (Goswami und Kistler, 2004).

Darüber hinaus führt die Infektion mit *F. graminearum* zu einer Anreicherung von Mykotoxinen im befallenen Gewebe. Diese hitzestabilen Giftstoffe können die Gesundheit von Mensch und Tier stark beeinträchtigen, weshalb kontaminiertes Erntegut nicht weiterverarbeitet werden kann (Paulitz, 1999; McMullen *et al.*, 1997).



Abbildung 1-1: Symptome einer *F. graminearum*-Infektion auf Weizen. Nach Befall und erfolgreicher Kolonisierung einer Weizenblüte kommt es zum Ausbleichen der gesamten Ähre (*Fusarium Head Blight*; rechts). Links ist zum Vergleich eine nicht infizierte Ähre abgebildet.

Für Fusarienarten sind insbesondere die Mykotoxine aus der Gruppe der Trichothecene charakteristisch (Desjardins und Hohn, 1996), wobei das Deoxynivalenol (kurz DON) den bekanntesten und meist erforschten Vertreter dieser Klasse darstellt. So konnte bereits gezeigt werden, dass DON eine bedeutende Funktion in der anfänglichen Weizenblüteninfektion einnimmt und in den Infektionsstrukturen von *F. graminearum* vermehrt synthetisiert wird (Boenisch und Schäfer, 2011). Ein weiteres Mykotoxin ist das Polyketid Zearalenon (kurz ZEA). Es besitzt ein östrogenähnliches Wirkungsspektrum und ist im Vergleich zu DON nicht essentiell für eine erfolgreiche Weizeninfektion (Gaffoor *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren konnte ein vermehrtes Auftreten des Pflanzenpathogens, insbesondere in den USA, China und Europa, als Folgen des anhaltenden Klimawandels beobachtet werden. Die weltweite Ausbreitung des Erregers stellt zunehmend ein globales Problem dar (McMullen *et al.*, 1997; Magdwick *et al.*, 2011).

Der Lebenszyklus von *F. graminearum* beginnt mit dem Überwintern auf infizierten Ernterückständen im Boden. Unter feucht warmen Witterungsbedingungen bildet der filamentöse Pilz Fruchtkörper (Perithezien), welche die Asci mit den Ascosporen (sexuelle Sporen) beinhalten (Paulitz, 1999; Goswami und Kistler, 2004). Letztere werden nach abgeschlossener Reife aus den Perithezien freigesetzt und durch Wind, Wasser oder Insekten verbreitet. Durch diesen natürlichen Vorgang gelangen die Sporen auf gesunde Wirtspflanzen und beginnen diese an der Wurzel, Halm oder Ähre zu kolonisieren. Kommt es zur Infektion der Weizenblüte, wachsen die Pilzhyphe über die exponierten Antheren in die Blüte und kolonisieren dort zunächst Lemma und Palea (Pritsch *et al.*, 2000). Im weiteren Infektionsverlauf dringt *F. graminearum* in das Leitgewebe der Wirtspflanze ein und ist dadurch in der Lage die gesamte Ähre zu infizieren. Folglich werden Konidien (asexuelle Sporen) auf befallenem Pflanzengewebe gebildet, welche wiederum über Wind, Regen oder Insekten auf gesunde Pflanzen übertragen werden, was zu einer unkontrollierten Ausbreitung des phytopathogenen Pilzes führt (Gilbert und Fernando, 2004; Paulitz, 1999).

1.2. Die Bedeutung der pilzlichen Zellwand

Die Zellwand ist essentiell für die Morphogenese, das Wachstum und Überleben von Pilzen (Bartnicki-Garcia, 1968; Free, 2013). Sie erfüllt eine Vielzahl verschiedener Funktionen, indem sie Schutz vor chemischen und mechanischen Einwirkungen bietet und den intrazellulären osmotischen Druck stabilisiert (Gastebois *et al.*, 2009; Pérez und Ribas, 2013). Des Weiteren reguliert sie bis zum gewissen Grad den Stoffaustausch mit der Umgebung und stellt den Kontakt zur Umwelt her (Farkas, 1985; Smits *et al.*, 1999). Die Zellwand ist ein komplexes, aus Polysacchariden und Proteinen aufgebautes 3D-Netzwerk, deren Biosynthese einer sehr feinen und komplexen Regulation unterliegt. Die grundlegenden Eigenschaften dieser speziellen Struktur, wie Starrheit, Dynamik und Plastizität werden durch ein abgestimmtes Gleichgewicht zwischen zeitlicher und räumlicher Synthese sowie Degradation erreicht (García-Rodríguez *et al.*, 2000).

Die starre Beschaffenheit der Zellwand ist für pathogene Pilze von größter Bedeutung, da hierdurch die Penetration und Kolonisierung des Wirtorganismus gewährleistet wird. Zudem sind die Plastizität und Dynamik dieser Struktur essentiell, um gegebenenfalls morphologische Umstrukturierungen durchführen zu können. So konnte im Fall des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* gezeigt werden, dass spezifische Infektionsstrukturen, sogenannte Infektionskissen, während einer Pflanzeninfektion gebildet werden (Boenisch und Schäfer, 2011). Infolgedessen treten die Zellen beider Organismen in engen Kontakt, weshalb Molekülen der pilzlichen Zellwand eine bedeutende Rolle in der Wirtsinteraktion zugesagt werden (Schoffemeer *et al.*, 1999; Pérez und Ribas, 2013). Während einer Infektion übernimmt die pilzliche Zellwand zeitgleich zwei Funktionen, einerseits besitzt sie adhäsive Eigenschaften zum Eindringen in das Gewebe des Wirts und andererseits bietet sie Schutz vor wirtsspezifischen Abwehrmechanismen (Free, 2013).

Im Gegensatz zu Hefen, besitzen filamentöse Pilze zwei verschiedene Morphotypen: (I) die Konidien als Vermehrungs- und Verbreitungseinheiten und (II) die aus einem Hyphengeflecht bestehende Form, welche zum vegetativen Wachstum und zur Infektion von Nöten ist. Beide Formen unterscheiden sich, aufgrund ihrer unterschiedlichen Funktionen im Lebenszyklus der Pilze, bezüglich der Zellwandarchitektur und -zusammensetzung (Latgé, 2010; Latgé und Beauvais, 2014). Zudem bilden filamentöse Pilze zytoplasmatisch lokalisierte Zwischenzellwände, sogenannte Septen, in ihren Hyphen und Konidien, die wiederum strukturell und biochemisch anders aufgebaut

sind, verglichen zur nach außen gerichteten, zellbegrenzenden Zellwand (Latgé, 2007; Riquelme *et al.*, 2011).

Ferner kann die Zellwandkomposition auch innerhalb einer Art stark variieren und ist abhängig von der Nährstoffversorgung, dem Lebenszyklus und den Umwelteinflüssen (Mauro und Dietrich, 1981; Klis, 1994; Latgé, 2010). Spontan auftretende Veränderungen in der Umgebung oder externer Stress können Kompensationsreaktionen auslösen, die zu bedeutenden strukturellen Veränderungen der Zellwand und signifikanten Modifikationen hinsichtlich der chemischen Zusammensetzung führen. Diese könnten erhebliche Konsequenzen für die Virulenz oder Fungizidresistenz des Pilzes haben (Latgé und Beauvais, 2014).

Trotz der enormen Bedeutung ist die Zellwandbiosynthese, deren Modifikation und Degradation bislang nur unzureichend charakterisiert. Dies gilt insbesondere für filamentöse pathogene Pilze, da der wissenschaftliche Fokus bei diesen Organismen verstärkt auf der Erforschung der Virulenz und Pathogenität liegt (Latgé und Calderone, 2005; Lesage und Bussey, 2006).

Einen guten Überblick zu bisherigen Erkenntnissen bezüglich des Aufbaus und der Biosynthese von pilzlichen Zellwänden beschreibt Orlean (2012) am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, Free (2013) an diversen Ascomyceten und Latgé und Beauvais (2014) am Beispiel von *Aspergillus fumigatus*. Dabei lassen sich die erworbenen Resultate dieser Organismen auf andere verwandte Arten übertragen (Riquelme *et al.*, 2011; Latgé und Beauvais, 2014; Pérez und Ribas, 2013).

1.2.1. Struktureller Zellwandaufbau

Der allgemeine Aufbau pilzlicher Zellwände ist schon sehr lange bekannt (Wessels und Sietsma, 1981). Aktuelle Studien belegen, dass der strukturelle Aufbau sowie die chemische Zusammensetzung von Zellwänden zwischen systematisch verschiedenen Pilzgruppen, aber auch innerhalb einer Gruppe und sogar innerhalb einer Pilzart stark variieren können (Latgé, 2007). Aufgrund dieser Tatsache werden im folgenden Abschnitt lediglich allgemeine Charakteristika pilzlicher Zellwände erläutert. Von dem Untersuchungsobjekt dieser Dissertation, *F. graminearum*, ist bisher nur eine Publikation zur chemischen Zellwandkomposition veröffentlicht worden (Barbosa und Kimmelmeier, 1993). Aktuelle Erkenntnisse zum strukturellen Zellwandaufbau dieses Pilzes können daher nur aus Untersuchungen verwandter Arten gewonnen werden.

Zahlreiche Aufnahmen vom Transmissionselektronenmikroskop (TEM) belegen den typischen zweischichtigen Aufbau von pilzlichen Zellwänden, bestehend aus einer dunkel erscheinenden, elektronendichten Außenschicht sowie einer transparenten darunterliegenden inneren Schicht (Gow *et al.*, 2012). In der Abbildung 1-2 A sind diese Erkenntnisse am Beispiel der Zellwand des *F. graminearum*-Wildtyps 8-1 deutlich zu erkennen. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Außenschicht aus glykolysierten Proteinen besteht, die meist kovalent an ein Mannanrückgrat gebunden sind (Free, 2013; Schoffemeer *et al.*, 1999; Klis, 1994). Die Zusammensetzung und Stärke dieser Schicht ist sehr divers und individuell für jede Pilzart. Im Fall von *F. graminearum* (Abb. 1-2 A) ist sie weniger ausgeprägt, verglichen zum humanpathogenen Pilz *Candida albicans* (Gow *et al.*, 2012).

In der transparenten Schicht sind Polysaccharide, vor allem (1,3)- β -Glucan und Chitin, lokalisiert, die für die Stabilität der Zellwand essentiell sind (Abb. 1-2 B; Pérez und Ribas, 2013; Barbosa und Kimmelmeier, 1993; Schoffemeer *et al.*, 1999). Die Plasmamembran, die im TEM aufgrund der enthaltenen Lipide und Proteine sehr kontrastreich erscheint, trennt die Zellwand von dem Zytoplasma (Abb. 1-2).

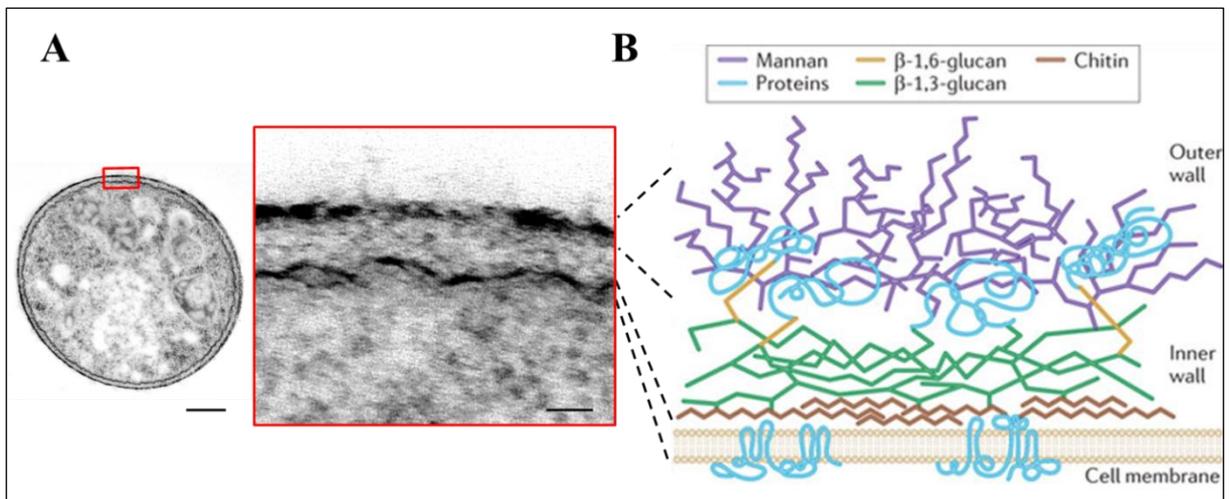


Abbildung 1-2: Struktureller Aufbau einer pilzlichen Zellwand.

A Zweischichtiger Zellwandaufbau von *F. graminearum*. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen eine dunkel gefärbte elektronendichte Außenschicht und eine helle, darunterliegende Schicht. Maßstab: Querschnitt Hyph: 500 nm; Zellwandausschnitt: 50 nm.

B Allgemeiner Zellwandaufbau von Pilzen. Dargestellt sind die universell vorkommenden Polysaccharide (hier gezeigt am Beispiel von *C. albicans*, Gow *et al.*, 2012). In der Zellmembran sind Zellwand-Strukturproteine (blau) verankert. Diese katalysieren die Biosynthese von strukturgebenden Polymeren, wie Chitin und (1,3)- β -Glucan. Die innere Zellwand, im TEM als helle Schicht erkennbar, besteht aus einem Netzwerk von Chitin (braun) und (1,3)- β -Glucan (grün) mit einigen (1,6)- β -Verzweigungen (orange), wohingegen die äußere Zellwand aus Glycoproteinen, zusammengesetzt aus Mannan (lila) und artspezifischen Proteinen (blau), aufgebaut ist.

In der transparenten Schicht sind Polysaccharide, vor allem (1,3)- β -Glucan und Chitin, lokalisiert, die für die Stabilität der Zellwand essentiell sind (Abb. 1-2 B; Pérez und Ribas, 2013; Barbosa und Kimmelmeier, 1993; Schoffemeer *et al.*, 1999). Die Plasmamembran, die im TEM aufgrund der enthaltenen Lipide und Proteine sehr kontrastreich erscheint, trennt die Zellwand von dem Zytoplasma (Abb. 1-2).

Polysaccharide bilden mit bis zu 90 % den Hauptbestandteil von pilzlichen Zellwänden (Pérez und Ribas, 2013; Latgé, 2007; Gow *et al.*, 2012). Um deren Zusammensetzung und strukturellen Aufbau analysieren zu können, müssen diese, zum Beispiel durch den Einsatz von Laugen, löslich gemacht werden. Latgé (2007) gruppiert demnach die Zellwandpolymere in eine alkali-unlösliche, bestehend aus faserartigen Strukturen, und eine alkali-lösliche amorphe Fraktion, die zwischen den strukturegebenden Fasern eingebettet ist. Das Grundgerüst der pilzlichen Zellwand wird vom (1,3)- β -Glucan (Klis, 1994; Latgé und Beauvais, 2014; Gow *et al.*, 2012) mit vereinzelt (1,6)- β -Verzweigungen gebildet (Abb. 1-2 B). Dabei variiert der Anteil an (1,6)- β -Glucan zwischen einzelnen Pilzgruppen erheblich. Die Zellwand der Hefe *C. albicans* kann aus bis zu 20 % dieser Verbindung bestehen (Gow *et al.*, 2012), wohingegen in den filamentösen Pilzen *A. fumigatus* und *Neurospora crassa* das (1,6)- β -Glucan kaum nachzuweisen ist (Fontaine *et al.*, 2000; Riquelme *et al.*, 2011). Dieses Polymer besteht aus weniger Glukosemolekülen als das (1,3)- β -Glucan und bildet keine faserartige Struktur, sondern fungiert als „Linker“ zur stabilen Bindung von Chitin und Glycoproteinen. Somit trägt es zur Bildung des 3D-Polysaccharidnetzwerkes bei (Kollár *et al.*, 1997). Des Weiteren zählt Chitin zu den maßgeblich strukturegebenden Zellwandpolymeren im Reich der Pilze, was sie grundlegend von den Pflanzen und Säugetieren unterscheidet. Der Chitingehalt beträgt bei Hefen etwa 2 % (Klis, 1994; Lesage und Bussey, 2006), indessen bei filamentösen Ascomyceten ein Wert von 10- 20 % angenommen wird (Latgé, 2007). (1,3)- β -Glucan und Chitin sind über kovalente (1,4)- β -Bindungen miteinander verknüpft und nach Latgé (2007) in der alkali-unlöslichen Fraktion wiederzufinden. Die alkali-lösliche Fraktion besteht zum größten Teil aus linearem (1,3)-/(1,4)- α -Glucanketten und (Galakto)mannan an denen die artspezifischen Proteine gebunden sind (Abb. 1-2 B). Das Vorkommen von α -Glucanen wurde in den Modellorganismen *A. fumigatus* (Latgé, 2007; Latgé und Beauvais, 2014; Beauvais *et al.*, 2013) und *N. crassa* (Riquelme *et al.*, 2011) nachgewiesen. Beauvais und Kollegen (2013) konnten eindrucksvoll zeigen, dass die Deletion von allen drei (1,3)- α -Glucansynthasen in *A. fumigatus*, und damit der Verlust des Zellwandpolymeres (1,3)- α -Glucan, eine signifikante Erhöhung des Chitins und

(1,3)- β -Glucans zur Folge hatte. Diese Kompensationsreaktion führte letztendlich zur Avirulenz des Pilzes, da die Zellwandmodifikationen zur Stimulation von wirtsspezifischen Abwehrmechanismen beitragen (Latgé und Beauvais, 2014). Aktuelle bioinformatische Studien belegen, dass im *F. graminearum*-Genom kein homologes Gen zur Expression einer (1,3)- α -Glucansynthase vorliegt und demnach dessen Zellwand eine derartige Verbindung nicht aufweist (Datenbank NCBI, Stand Mai 2016).

Glycoproteine auf der Zellwandoberfläche, meist Mannoproteine in Hefe und Galaktomannan-gebundene Proteine in filamentösen Pilzen, sind zum größten Teil kovalent an das Glucan-Chitin-Netzwerk über kurzkettiges (1,6)- β -Glucan gebunden. Diese Verknüpfung wird meist durch ein GPI-Relikt (GPI: Glycosylphosphatidylinositol) gewährleistet (Klis *et al.*, 2006; Gow *et al.*, 2012). Andererseits wird postuliert, dass diese Proteine auch über einen vollständigen GPI-Anker verfügen können und in der Plasmamembran verankert sind (Stratford, 1994; Free, 2013) oder locker, ohne jegliche kovalente Bindung, in der Zellwand sitzen (Riquelme *et al.*, 2011; Kollár *et al.*, 1997). Dabei übernehmen sie verschiedenste Funktionen, wie die Weiterleitung von externen Signalen ins Zytoplasma und die Umstrukturierung von Zellwandkomponenten (Pérez und Ribas, 2013). Glycoproteine machen, abhängig vom jeweiligen Ascomycet, 10- 30 % der Zellwand aus (Pérez und Ribas, 2013; Riquelme *et al.*, 2011). Bei Hefen, wie *S. cerevisiae*, kann der Anteil sogar bis zu 40 % betragen (Klis, 1994).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Grundstruktur einer pilzlichen Zellwand aus einem Glucan-Chitin-Netzwerk besteht, wohingegen die Zusammensetzung der alkali-löslichen Fraktion eher klassen- oder sogar artspezifisch ist. Auf der strukturgebenden Polysaccharidschicht sind charakteristische Glycoproteine nach außen aufgelagert (Klis, 1994). Ferner können erhebliche Unterschiede bezüglich des strukturellen Zellwandaufbaus zwischen vermeintlich nahverwandten Pilzspezies auftreten (Latgé und Beauvais, 2014).

Nachdem die Hauptkomponenten der Zellwand erläutert wurden, stellen sich folglich die Fragen: (I) wie entstehen Verzweigungen an den neu synthetisierten linearen Polysacchariden und (II) wie entstehen Quervernetzungen zwischen unterschiedlichen Polymeren? Derzeit existieren verschiedene Hypothesen zur Beantwortung dieser Fragen, wobei im Allgemeinen GPI-Proteinen, Proteine mit einem membranständigen Glycosylphosphatidylinositol-Anker, eine bedeutende Rolle in der Elongation, der Verzweigung sowie der Vernetzung von strukturgebenden Polysacchariden nachgesagt

wird (Klis, 1994; Latgé und Beauvais, 2014; Gastebois *et al.*, 2009). In dem Review von Latgé (2007) wird von einer, in *A. fumigatus* identifizierten (1,3)- β -Glucanosyltransferase berichtet, die funktional zur Verlängerung der (1,3)- β -Glucan-Kette beiträgt (Hartland *et al.*, 1996; Mouyna *et al.*, 2000) und über einen GPI-Anker an der Plasmamembran gebunden sein soll. Diese Hypothese steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass diese Proteine mit der enzymatisch aktiven Seite nach außen in den extrazellulären Raum ragen und dort ihre biochemische Funktion vollziehen können. Genom- und Proteomanalysen von sequenzierten Ascomyceten ergaben vier Familien membrangebundener GPI-Proteine, die universell für Pilze sind und funktional an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind (Mouyna *et al.*, 2013). Diese Proteine besitzen eine putative Glycosylhydrolasefunktion zur Spaltung von Polymeren sowie eine Glycosyltransferasefunktion, um anschließend die Zellwandkomponenten durch neu synthetisierte Verbindungen zu vernetzen (Latgé, 2007; Free, 2013).

Abschließend ist zu erwähnen, dass die komplexe Organisation und Vernetzung der verschiedenen Polysaccharide weitestgehend unbekannt sind, da diese Verknüpfungen vor einer Zellwandanalyse durch den Einsatz von Laugen, Säuren oder zellwandabbauenden Enzymen stets entfernt werden. Ein neuartiger Ansatz, um ein besseres Verständnis über die räumliche Anordnung der Zellwandkomponenten zu bekommen, ist die Entwicklung von Antikörpern, die spezifisch Verbindungen zwischen unterschiedlichen Polysacchariden erkennen. Diese Methode wurde bereits für pflanzliche Zellwände etabliert (Knox, 2008).

1.2.2. Zellwandbiosynthese von strukturgebenden Polysacchariden

Im folgenden Abschnitt werden grundlegende Erkenntnisse über die Zellwand-Strukturproteine, die an der Synthese des (1,3)- β -Glucans und Chitins maßgeblich beteiligt sind, erläutert. Das Hauptaugenmerk wird dabei auf die (1,3)- β -Glucansynthese gelegt, da dieses Protein Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Dissertation ist. Neben den allgemein bekannten Modellorganismen, wie *S. cerevisiae*, *A. fumigatus* und *N. crassa*, werden zudem die homologen Gene und deren Enzyme zur Zellwandbiosynthese des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* erläutert.

1.2.2.1. Die (1,3)- β -Glucanbiosynthese

(1,3)- β -Glucan ist das am häufigsten vorkommende Polysaccharid in der Zellwand von Ascomyceten (Fontaine *et al.*, 2000; Bowman und Free, 2006; Pérez und Ribas, 2013). Aufgebaut ist das (1,3)- β -Glucan aus einer Vielzahl von Glukosemonomeren, die über (1,3)- β -Verknüpfungen miteinander verbunden sind und eine helikale dreidimensionale Struktur bilden. Zudem befinden sich in dieser Struktur unregelmäßig angeordnete, kurzkettige (1,6)- β -Verzweigungen. Der prozentuale Anteil dieses, als (1,6)- β -Glucan beschriebene Polymer kann zwischen verschiedenen Pilzgruppen erheblich variieren (Gow *et al.*, 2012; Fontaine *et al.*, 2000; Pérez und Ribas, 2013).

Generell wird das (1,3)- β -Glucan von einem integralen und Plasmamembran lokalisiertem Proteinkomplex, bestehend aus einer (1,3)- β -Glucansynthase (kurz GSL; engl. *Glucan Synthase Like-Protein/ Gen*) und regulatorischen Untereinheiten, synthetisiert. Als Substrat dienen aktivierte, UDP-gebundene Glukosemoleküle (UDP: Uridindiphosphat) (Douglas, 2001; Beauvais *et al.*, 2001). (1,3)- β -Glucansynthasen sind universell vorkommende Proteine, die nicht nur in den Zellwänden von Hefen und filamentösen Pilzen (Douglas, 2001), sondern auch in höheren Pflanzen und Bakterien entdeckt wurden (Stone und Clark, 1992). Alle GSLs besitzen N- und C-terminale Transmembrandomänen (TMD), welche zur Verankerung des Proteins in der Plasmamembran unerlässlich sind. Zudem wird angenommen, dass diese TMD eine Pore in der Plasmamembran bilden, durch diese die lineare (1,3)- β -Glucankette in den extrazellulären Raum transportiert wird, wo weitere Modifikationen des Polymers stattfinden (Beauvais *et al.*, 2001; Free, 2013). Getrennt werden die Transmembrandomänen durch einen zytoplasmatisch lokalisierten Bereich, der aufgrund von hohen Sequenzhomologien annotierter GSLs, als katalytische Untereinheit des Proteins beschrieben wird (Beauvais *et al.*, 2001; Sánchez-León und Riquelme, 2015; Johnson und Edlind, 2012). Es wird postuliert, dass allein in diesem Abschnitt die Biosynthese des (1,3)- β -Glucans stattfindet (Douglas, 2001; Inoue *et al.*, 1995). Diese Annahme konnte von Voigt und Kollegen für die in *Arabidopsis thaliana* vorkommende stressinduzierte (1,3)- β -Glucansynthase PMR4 (Jacobs *et al.*, 2003; Nishimura *et al.*, 2003) *in vitro* nachgewiesen werden (Naumann und Sode, unveröffentlicht). Dazu wurde der hydrophile, zytoplasmatisch lokalisierte Bereich des Proteins heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, anschließend über Affinitätschromatographie isoliert und in einem geeigneten Reaktionspuffer die Aktivität des Enzyms nachgewiesen (Sode, 2015). Dieser Versuchsansatz wurde auch auf die pilzliche GSL von *F. graminearum*, FgGSL1, angewandt, wobei der Nachweis der (1,3)- β -Glucansynthaseaktivität des heterolog

exprimierten Teilproteins bislang ausblieb (Glöckner und Schwolow, unveröffentlicht). Die identifizierte FgGSL1 entspricht in Größe (etwas 220 kDa) und Proteinstruktur (16 Transmembrandomänen, sechs N-terminal und zehn C-terminal lokalisiert sowie inmitten die katalytische Domäne) den beschriebenen (1,3)- β -Glucansynthasen anderer Ascomyceten, wie FKS1 von *S. cerevisiae* (Douglas *et al.*, 1994), GSL1 von *Colletotrichum graminicola* (Oliveira-Garcia und Deising, 2013), FKS-1 von *N. crassa* (Tentler *et al.*, 1996; Sánchez-León und Riquelme, 2015) sowie AffKS1 von *A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2001).

Die Biosynthese des (1,3)- β -Glucans ist sehr komplex und unterliegt einer strengen Regulation, die, im Gegensatz zu der PMR4 des Modellorganismus *A. thaliana* (Hong *et al.*, 2001; Verma und Hong, 2006; Ellinger *et al.*, 2014), in filamentösen Pilzen wenig untersucht ist. Es wird vermutet, dass zumindest eine GTPase zur Aktivierung von pilzlichen (1,3)- β -Glucansynthasen essentiell ist (Lesage und Bussey, 2006; Free, 2013). Ein entsprechender Nachweis gelang bereits vor 20 Jahren in der Hefe *S. cerevisiae*, wobei über die aktivierte, GTP-gebundene GTPase Rho1p die Regulation der FKS1 erfolgt (Qadato *et al.*, 1996; Inoue *et al.*, 1999). Auch im Maispathogen *C. graminicola* wurde eine entsprechende CgRHO1 als essentielle Untereinheit der GSL1 beschrieben (Oliveira-Garcia, 2013; Lange *et al.*, 2014). Des Weiteren konnten bei Untersuchungen der (1,3)- β -Glucansynthase des filamentösen Humanpathogens *A. fumigatus* drei assoziierte Proteine identifiziert werden. Neben einer bereits postulierten GTPase bestand der isolierte Proteinkomplex aus einer membranständigen H⁺-ATPase, auch als Protonenpumpe bekannt, und einem ABC-Glucantransporter (Beauvais *et al.*, 2001). Ein entsprechendes bildgebendes Modell wird in der Dissertation von Dr. Oliveira-Garcia (2013) vorgestellt. Zudem konnte in *N. crassa* ein regulatorisches Protein mit der Bezeichnung GS-1 identifiziert werden, welches maßgeblich in der (1,3)- β -Glucanbiosynthese involviert ist. Die genaue Funktion dieses Enzyms konnte bis heute nicht geklärt werden (Enderlin und Selitrennikoff, 1994; Tentler *et al.*, 1997).

Die Anzahl an GSL-codierenden Genen und deren essentielle Bedeutung für den jeweiligen Organismus variieren zwischen verschiedenen Pilzgruppen. Für die Hefen *S. cerevisiae* (Ishihara *et al.*, 2007) und *C. albicans* (Mio *et al.*, 1997) wurden drei und für *Schizosaccharomyces pombe* (Cortés *et al.*, 2005 und 2007) vier Gene zur Expression einer (1,3)- β -Glucansynthase identifiziert. Im Pflanzenreich sind es im Fall von *A. thaliana* sogar 12 (Hong *et al.*, 2001) und beim Modellorganismus der Monokotyledonen, *Brachypodium distachyon*, 11 putative GSL-Gene (Blümke, 2013). Dabei wird jeder

(1,3)- β -Glucansynthase eine entwicklungs- und gewebsspezifische Funktion zugeordnet (Chen und Kim, 2009). Im Gegensatz dazu besitzen bisher sequenzierte filamentöse Ascomyceten nur ein Gen zur Kodierung einer funktionalen GSL (Mouyna *et al.*, 2004). Folglich konnte im *F. graminearum*-Genom nur ein Gen, die *FgGSL1*, identifiziert werden. Eine Deletion dieser Gene führt zur Letalität des Organismus (Latgé, 2007). Um trotzdem funktionale Charakterisierungen des essentiellen Zellwandproteins durchführen zu können, wird vermehrt die Methode der RNA-Interferenz (kurz RNAi) angewandt. Bereits vor 20 Jahren wurden die ersten RNAi-Transformanten der FKS-1 in *N. crassa* generiert. Diese Mutanten wiesen eine Inhibierung des radialen Wachstums auf, bildeten stark verzweigte Hyphen und besaßen eine reduzierte enzymatische (1,3)- β -Glucansynthaseaktivität (Tentler *et al.*, 1996). Ähnliche phänotypische Modifikationen wurden bei RNAi-Transformanten der GSL von *Fusarium oxysporum* entdeckt (Ha *et al.*, 2006). Im Maispathogen *C. graminicola* führt die Inhibierung der (1,3)- β -Glucansynthase durch den Einsatz von RNAi zu einer Reduktion des Glucans in der Zellwand, was zu einer Inhibierung bezüglich des Wachstums und der Virulenz führt. *C. graminicola*-Mutanten mit konstitutiver GSL1-Expression besaßen hingegen eine exponierte (1,3)- β -Glucanschicht auf der Zellwandaußenseite, die während einer Pflanzeninfektion frühzeitige wirtsspezifische Abwehrmechanismen aktivierte und letztendlich eine Avirulenz des Pilzes verursachte (Oliveira-Garcia und Deising, 2013). Obwohl die Funktion und Regulation von (1,3)- β -Glucansynthasen seit mehr als 40 Jahren intensiv studiert und erforscht werden, konnten diese bis heute in keinem Organismus vollständig aufgeklärt werden. Insbesondere in filamentösen Pilzen werden kaum Fortschritte erlangt. Aus diesem Grund widmet sich ein bedeutender Teil dieser Dissertation der biologischen Charakterisierung der *FgGSL1*, der (1,3)- β -Glucansynthase des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum*.

1.2.2.2. Die Chitinbiosynthese

Chitin ist neben (1,3)- β -Glucan das bedeutendste strukturgebende Polymer, bestehend aus (1,4)- β -glykosidisch verbundenen N-Acetyl-Glucosaminmonomeren (Roncero, 2002). Dieses unverzweigte, langkettige Polysaccharid ist in der pilzlichen Zellwand kovalent an (1,3)- β -Glucan gebunden und wird von Chitinsynthasen (kurz: Chs) synthetisiert. Diese Proteine sind, ebenso wie (1,3)- β -Glucansynthasen, integrale Membranproteine deren Substrat aktivierte UPD-assoziierte N-Acetyl-Glucosamineinheiten darstellen (Roncero, 2002; Free 2013).

Im Gegensatz zur vorab erläuterten (1,3)- β -Glucansynthase, besitzen Ascomyceten mehr als ein Gen zur Expression von Chitinsynthasen (Free, 2013). Die Anzahl variiert zwischen verschiedenen Pilzgruppen, wobei der Chitingehalt in der Zellwand einer Spezies nicht direkt mit der Anzahl an Chs-Genen korreliert (Latgé, 2007). Verschiedene Chitinsynthasen besitzen redundante Funktionen, werden aber auch gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert (Roncero, 2002). In einem Review von Gastebois *et al.* (2009) werden die unterschiedlichen Funktionen von acht Chitinsynthasen des Humanpathogens *A. fumigatus* ausführlich erläutert. Ebenso viele Chs-Gene besitzt *Aspergillus nidulans* (Horiuchi, 2009) und auch *F. graminearum* (Kim *et al.*, 2009), wobei momentan drei als „hypothetical protein“ annotiert sind. Diese drei Proteine besitzen putative Chitinsynthasedomänen und fünf bis sechs TMD (NCBI – Blast Protein; CBS – TMHMM Server v. 2.0; Stand Mai 2016). Folglich handelt es sich um potentielle Chitinsynthasen von *F. graminearum*. Im Genom von *N. crassa* konnten sieben Chs-Gene lokalisiert werden (Riquelme und Bartnicki-Garcia, 2008). Obwohl die Zellwand der Hefe *S. cerevisiae* nur 1- 2 % Chitin enthält, ist die Chitinbiosynthese in diesem Modellorganismus am besten charakterisiert (Lesage und Bussey, 2006). Sieben Chs-Gene sind für die Expression von nur drei verschiedenen Chitinsynthaseaktivitäten verantwortlich (Cabib *et al.*, 2001; Roncero, 2002). Für Chs1 wird eine Reparaturfunktion postuliert (Cabib *et al.*, 1992), die Chs2 ist für die Bildung des primären Septums während der Knospung verantwortlich (Bulawa, 1992) und Chs3 synthetisiert hauptsächlich das strukturell gebundene Chitin in der Zellwand (Cos *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1991).

Die meisten Chs-Gene sind nicht essentiell (Schmidt, 2004; Mellado *et al.*, 2003). Andererseits konnten Munro und Kollegen (2001) zeigen, dass die *Chs1* von *C. albicans* überlebenswichtig für die Hefe ist. Kim *et al.* (2009) beschreiben phänotypische Veränderung von *F. graminearum* nach einer Deletion der *Chs5* und *Chs7*. Demnach sind

beide Chitinsynthesen unerlässlich für die Stabilität der Zellwand, der Entwicklung von Perithezien, der Pathogenität auf Gerste sowie für das apikale Hyphenwachstum.

Anhand von Sequenzvergleichen werden Chitinsynthesen in sechs Klassen eingeteilt, wobei die Klassen III, V und VI universell in filamentösen Ascomyceten vorkommen (Munro und Gow, 2001; Choquer *et al.*, 2004). Daher wird vermutet, dass diesen Chs-Klassen eine bedeutende Funktion im apikalen Spitzenwachstum zukommen (Gastebois *et al.*, 2009).

Der allgemeine strukturelle Aufbau von Chitinsynthesen beläuft sich auf einem weniger konservierten hydrophilen N-terminalen Bereich, einem neutralen mittleren Abschnitt und einem hoch konservierten C-Terminus mit fünf bis sechs TMD. Trotz der geringen Homologie von Chitinsynthesen, konnte ein QRRRW-Motif in der zytosolisch lokalisierten Glycosyltransferasedomäne identifiziert werden. Anhand von Mutagenestudien konnte die essentielle Bedeutung dieses Bereichs bestätigt werden (Cos *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* wurde durch partielle Deletion der Chitinsynthesen Chs1 und Chs2 gezeigt, dass der N-Terminus weder *in vivo* noch *in vitro* für die Aktivität von Nöten ist, wohingegen geringe Verkürzungen des C-Terminus diese erheblich beeinträchtigte (Ford *et al.*, 1996).

Eine Besonderheit phytopathogener Pilze ist die Möglichkeit exponiertes Chitin an der Zelloberfläche in Chitosan umzuwandeln. Dadurch werden die Infektionsstrukturen des Pilzes während einer Penetration des Wirtorganismus von dessen Chitinasen nicht angegriffen. Diese Art „Tarnung“ ermöglicht dem Pilz eine erfolgreiche Kolonisierung und konnte bereits in einigen Rostpilzen sowie *C. graminicola* nachgewiesen werden (El Gueddari *et al.*, 2002). Chitosan besteht zu mehr als 50 % aus deacetylierten Glucosamineinheiten. Katalysiert wird diese Reaktion von der Chitindeacetylase im extrazellulären Raum (Araki und Ito, 1975; Free, 2013).

Die Funktion und Lokalisation von vermeintlich homologen Chitinsynthesen verschiedener Pilzgruppen können sehr unterschiedlich sein, weshalb die Erkenntnisse von einem Ascomycet nicht auf weitere übertragen werden können (Latgé, 2007). Es wird vermutet, dass Chitinsynthesen überlappende Funktionen im Lebenszyklus eines Organismus einnehmen können (Roncero, 2002). Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass Deletionen von einzelnen Chs-Genen meist keine phänotypischen Veränderungen hervorrufen. Aufgrund dessen ist es nicht verwunderlich, weshalb trotz jahrzehntelanger Forschung die Regulation und biochemische Funktionsweise von Chitinsynthesen bisher unzureichend verstanden sind.

1.3. Bedeutung von Proteinkinasen in Eukaryonten

In eukaryotischen Organismen bilden Proteinkinasen (kurz: PK) eine der größten und bedeutendsten Proteinfamilien. Etwa 2 % aller Gene kodieren für Proteinkinasen. Die Gesamtheit aller Kinasen eines Organismus wird als Kinom bezeichnet (Manning *et al.*, 2002). Nahezu 30 % aller Proteine in eukaryotischen Zellen liegen phosphoryliert vor, weshalb die Proteinphosphorylierung, die von PK vollzogen wird, zu einer der häufigsten posttranslationalen Modifikationsform zählt (Cohen, 2000; Manning *et al.*, 2005).

Die Phosphorylierung von Proteinen ist entscheidend für die Regulation von Wachstums- und Entwicklungsprozessen sowie für entsprechende Reaktionen der Zelle auf abiotische und biotische Umweltfaktoren (Wang *et al.*, 2011). Dabei beeinflussen PK die Aktivität, die Lokalisation und die Bindungsaffinität weiterer Komponenten ihres jeweiligen Substrats (Zielproteins) (Cohen, 2000). Von zahlreichen Studien ist bekannt, dass PK eine bedeutende Rolle in der Signalweiterleitung innerhalb einer Zelle, sogenannten Signaltransduktionswegen, einnehmen und diese zu angepassten Stoffwechselprozessen oder Genexpressionen führen (Manning *et al.*, 2002). Die Bestimmung der exakten Funktion und Lokalisation von PK in einem Signalweg ist meist schwierig, da aufgrund von sogenannten „*Cross-talk*-Reaktionen“ die Inaktivierung einer definierten PK zu mehreren morphologischen Veränderungen des Organismus führen kann. Ein resultierender Phänotyp kann ein direktes Ergebnis der modifizierten/ deletierten PK sein, aber auch als Folge sekundärer nachgeschalteter Effekte entstehen. Diese Komplexität und Vernetzung von Signalwegen innerhalb einer Zelle erschwert die wissenschaftliche Untersuchung von PK erheblich.

Die Phosphorylierung von Proteinen ist meist reversibel. Eine entsprechende Dephosphorylierung wird von Proteinphosphatasen vollzogen (Cohen, 1976). Demnach sind sowohl Proteinkinasen als auch -phosphatasen essentiell für die Regulation von biologischen und biochemischen Prozessen in der Zelle (Cohen, 2000).

1.3.1. Funktionsweise von Proteinkinasen

Proteinkinasen sind genauer betrachtet Phosphoryltransferasen. Deren enzymatische Funktion besteht darin, eine Phosphatgruppe von einem Nukleosidtriphosphat, meist Adenosintriphosphat (ATP), auf die Hydroxylgruppe (OH) spezifischer Aminosäuren zu übertragen (Abb. 1-3, rechts, grüne Pfeile). Daraus ergeben sich Konformations- und/ oder

Ladungsänderungen, die zu einer funktionellen Veränderung des Zielproteins führen. Die meisten PK phosphorylieren die Aminosäuren Serin oder Threonin, dementsprechend als Serin/ Threonin Proteinkinasen bezeichnet, oder die OH-Gruppe von Tyrosin (Tyrosinkinase). Des Weiteren existieren Kinasen, die sowohl Serine, Threonine als auch Tyrosine phosphorylieren können (Dhanasekaran und Reddy, 1998). Proteinphosphorylierungen sind meist reversibel und können durch substratspezifische Phosphatasen rückgängig gemacht werden (Abb. 1-3, links, blaue Pfeile). Diese Enzyme entfernen durch eine Hydrolyse den Phosphatrest des Zielproteins. Eine Proteinphosphorylierung oder -dephosphorylierung führt zur Aktivität oder Inhibierung des Zielproteins (Cohen 2002).

Die Aktivität von Proteinkinasen unterliegt einer sehr sensiblen Regulation. PK selbst können durch Phosphorylierung anderer Kinasen aktiviert oder deaktiviert werden. Bei einigen PK ist eine Autophosphorylierung bekannt. Ferner können sie Bindungen mit Effektoren oder Kofaktoren eingehen und dadurch stimuliert werden (Manning *et al.*, 2002).

Mutationen oder Fehlfunktionen von Proteinkinasen spielen eine bedeutende Rolle in der Entstehung von Krankheitsbildern des Menschen. Aufgrund dessen unterliegen die menschlichen PK einer intensiven pharmazeutischen und medizinischen Bedeutung in Hinblick auf therapeutische Maßnahmen (Hunter, 2000; Manning *et al.*, 2002). So werden in der Krebstherapie Inhibitoren von PK eingesetzt, um das Wachstum und die Ausbreitung von Tumorzellen zu unterbinden (Deininger *et al.*, 2005; Cohen, 1999).

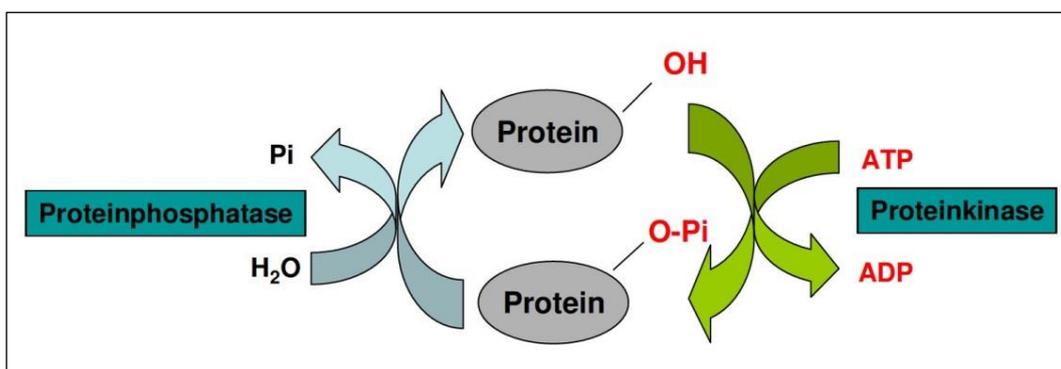


Abbildung 1-3: Funktionsweise von Proteinkinasen und -phosphatasen (Schäfer, 2009).

Der Phosphorylierungszustand eines Zielproteins wird durch Kinasen und Phosphatasen bestimmt. Proteinkinasen übertragen ein Phosphatrest (Pi) vom ATP (Phosphordonor) auf die Hydroxylgruppe (-OH) von Aminosäuren (rechts, grüne Pfeile). Die umgekehrte Reaktion, bei der es zu einer Abspaltung des Phosphats kommt, wird von Proteinphosphatasen katalysiert (links, blaue Pfeile). Abhängig vom Phosphorylierungszustand ist das Zielprotein aktiv und an der funktionalen Regulation diverser zellulärer Prozesse beteiligt.

1.3.2. Proteinkinasen in Ascomyceten und das Kinom von *F. graminearum*

Bis heute wurden bereits über 40 Genome von filamentösen Pilzen sequenziert. Diese Fülle von Daten ist essentiell für die Identifizierung von arttypischen Proteinkinasen. Durch *in silico* Analysen und Sequenzvergleiche pilzlicher PK können zelluläre Funktionen und putative Zielproteine identifiziert werden (Wang *et al.*, 2011).

Derzeit wird angenommen, dass 1 % des Genoms von filamentösen Pilzen für Proteinkinasen kodiert (Ma *et al.*, 2010; Cuomo *et al.*, 2007). Im Fall von *S. cerevisiae* sind es 127 PK-Gene und anteilig 2 % aller Gene (Wang *et al.*, 2011).

Mittels Mutagenesestudien konnten bisher einige Proteinkinasen in den Modellorganismen *N. crassa* und *A. nidulans* identifiziert werden, die eine bedeutende Rolle im apikalen Hyphenwachstum einnehmen. Am Beispiel der Proteinkinase COT1 von *N. crassa* wird die Komplexität und das Wirkungsspektrum von PK deutlich. Dieses, zu den Serin/Threonin PK zählende Enzym, ist unter anderem in der Ausbildung von Lufthyphen, der Konidienproduktion und der Zellwandbiosynthese involviert. Mutationen verschiedener putativer Phosphorylierungsstellen von COT1 führen zu diversen phänotypischen Veränderungen (Seiler *et al.*, 2006; Ziv *et al.*, 2009), auch als Pleiotropie bezeichnet (Purves *et al.*, 2006).

In phytopathogenen Pilzen werden die Wirkungsweise und -orte von PK vor allem in Hinblick auf die Pathogenität untersucht. Eine besondere Bedeutung wird in diesem Zusammenhang den MAP Kinasen (Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, kurz: MAPK) zugewiesen (Lev *et al.* 1999; Mey *et al.*, 2002, Jenczmionka *et al.*, 2003). In einem Minireview von Zhao *et al.* (2007) werden die Signaltransduktionswege von MAPK verschiedener human- und phytopathogener Pilze beschrieben und verglichen. Diese PK sind vor allem in der Weiterleitung von extrazellulären Signalen verantwortlich und an entwicklungspezifischen Prozessen beteiligt (Xu, 2000). In der Arbeitsgruppe von Schäfer und Kollegen wurde die stressinduzierte MAPK FgOS-2, eine Orthologe der MAPK HOG1 aus *S. cerevisiae*, des filamentösen Pilzes *F. graminearum* funktional charakterisiert. Die phänotypischen Veränderungen der entsprechenden Deletionsmutante $\Delta FgOS-2$ führt zur Annahme, dass diese Proteinkinase in einer Vielzahl von entwicklungspezifischen Prozessen beteiligt ist. Demnach soll sie maßgeblich in der Ausbildung von Perithezien und Ascosporen, der Pathogenität gegenüber Mais und Weizen und der zellulären Antwort auf reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sein (Nguyen *et al.*, 2012). Später konnte gezeigt werden, dass einige der $\Delta FgOS-2$ - Phänotypen durch den nachgeschalteten Transkriptionsfaktor FgAtf1 vermittelt werden (Nguyen *et al.*, 2013).

Im Vergleich mit *S. cerevisiae* besitzt *F. graminearum* weniger PK, genaugenommen konnten 19 Hefe-spezifische Proteinkinasen im pilzlichen Kinom nicht identifiziert werden. Andererseits wurden 28 pilzliche PK entdeckt, die keine orthologen Kinasen in *S. cerevisiae* aufweisen und daher als spezifisch für filamentöse Pilze gelten (Wang *et al.*, 2011).

Durch *in silico* Ansätze und bioinformatische Studien konnte ein putatives Netzwerk der PK untereinander sowie Kinase-Substrat-Interaktionen hervorgesagt werden. Einige dieser postulierten Protein-Protein-Interaktionen wurden mithilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems oder der Co-Immunopräzipitation bestätigt (Wang *et al.*, 2011).

Die, aus der Arbeit von Wang und Kollegen resultierenden Phänotypen aller generierter Proteinkinase-Deletionsmutanten sind in der frei verfügbaren Datenbank fgkinome.nw-suaf.edu.cn zusammengefasst.

1.3.3. Die Serin/ Threonin Proteinkinase gad8 FgPK1 von *F. graminearum*

Die Proteinkinase FgPK1 des filamentösen Ascomyceten *F. graminearum* ist Untersuchungsobjekt dieser Dissertation und wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

In silico Analysen ergaben, dass diese PK zur Familie der AGC Proteinkinasen zählt. Deren Bezeichnung ist abgeleitet von den Mitgliedern, der Proteinkinasen A (PKA), der Proteinkinasen G (PKG) und der Proteinkinasen C (PKC). Auch die Phosphoinositid-abhängigen Kinasen (PDK), die Proteinkinasen B (PKB) sowie die ribosomalen S6-Phosphorylierungskinasen gehören zu dieser Familie (Hanks und Hunter, 1995; Sobko, 2006). AGC PK regulieren eine Vielzahl von zellulären Prozessen, die vor allem Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphologie des Organismus haben. Dazu zählen die Speicherung und Freisetzung von Kohlenhydraten, die Synthese von DNA und Proteinen, Autophagie und Apoptose. AGC Proteinkinasen werden meist durch die Phosphorylierung an dem Serin- oder Threoninrest von anderen PK aktiviert und sind wichtige Regulatoren in komplexen Signaltransduktionswegen (Sobko, 2006).

Erkenntnisse zu FgPK1 sind bis heute nicht veröffentlicht worden, weshalb deren Bedeutung an postulierten homologen Proteinkinasen der Hefe erläutert wird.

Nach derzeitigem Wissen ist die orthologe Proteinkinase zu FgPK1 die YPK1/ YPK2 in *S. cerevisiae* und die Gad8 in *S. pombe* (Wang *et al.*, 2011). YPK1 weist 56 % und Gad8 52 % Sequenzhomologie zu FgPK1 auf. Die Proteinkinase Gad8 ist essentiell zur Bewältigung von abiotischen Stresssituationen sowie zur sexuellen Reproduktion (Matsuo

et al., 2003). Die PK YPK1 und YPK2 wurden vor mehr als 25 Jahren entdeckt (Maurer, 1988). Chen und Kollegen generierten Deletionsmutanten von YPK1 und YPK2 in *S. cerevisiae*, wobei $\Delta YPK1$ eine reduzierte Wachstumsrate aufwies. $\Delta YPK2$ besaß keinen abweichenden Phänotyp verglichen zur Ausgangslinie. Die Doppelmutante $\Delta\Delta YPK1/YPK2$ hingegen war letal (Chen *et al.*, 1993), weshalb die FgPK1 von *F. graminearum* als essentielle Proteinkinase eingestuft wurde (Wang *et al.*, 2011). YPK1 und YPK2 nehmen eine bedeutende Rolle in der Zellwandbiosynthese ein (Roelants *et al.*, 2002). Lange wurde angenommen, dass YPK1 und die Proteinkinase PKC1 (eine Mitogen-aktivierte Serin/Threonin Proteinkinase), aufgrund von ähnlichen Phänotypen beider Deletionsmutanten, in einem Signalweg agieren. Diese Annahme konnten Chen und Kollegen (1993) widerlegen. Jedoch ergaben unabhängige Studien, dass PKC1 und YPK1 durch dieselbe Proteinkinase (PKH1 der AGC Familie) phosphoryliert und aktiviert werden (Casamayor *et al.*, 1999; Inagaki *et al.*, 1999). Infolgedessen wird vermutet, dass diese PK in parallel verlaufenden Signalwegen lokalisiert sind (Roelants *et al.*, 2002). Funktional ist die PKC1 in der Zellwandbiosynthese sowie in der Organisation von Aktinfilamenten involviert (Heinisch *et al.*, 1999). Eine bedeutende Funktion von YPK1 in der Sphingolipid-Homeostase von *S. cerevisiae* wurde durch die Identifizierung entsprechender Substrate belegt. Demnach phosphoryliert YPK1 die integralen Membranproteine des endoplasmatischen Retikulums Orm1 und Orm2, die eine Schlüsselfunktion in der Sphingolipidbiosynthese einnehmen. Ein entsprechender Nachweis konnte *in vitro* bestätigt werden (Roelants *et al.*, 2011). Sphingolipide sind essentielle Strukturkomponenten von Plasmamembranen, deren prozentualer Anteil über die Fluidität von Membranen bestimmt. Zudem fungieren sie als bedeutende Moleküle in diversen Signaltransduktionswegen (Futerman und Hannun, 2004). Je niedriger der Sphingolipidgehalt in der Zelle ist, desto höher ist die Kinaseaktivität von YPK1. Dies führt zu einer verstärkten Phosphorylierung der Orm-Proteine und letztendlich zur Aktivierung der Sphingolipidbiosynthese (Roelants *et al.*, 2011). Sphingolipide wirken inhibierend auf YPK1, was als negative Rückkopplung dieses Signalwegs beschrieben wird.

Die orthologe Proteinkinase zu YPK1, und demnach auch zu FgPK1, ist in Säugetieren die SGK. Die Expression dieser Proteinkinase im Hefestamm $\Delta\Delta YPK1/YPK2$ komplementiert die beobachtete Letalität (Casamayor *et al.*, 1999).

Erste Untersuchungen der Proteinkinase FgPK1 wurden in der Masterarbeit von Frau Dr. Katja Schäfer (2009) vorgenommen. Die Generierung einer entsprechenden Deletionsmutante $\Delta pk1$ (durchgeführt von Dr. Christian Voigt) *in vivo* resultierte in einer

erheblichen Wachstumsreduktion und Verringerung der Virulenz auf Weizen. Der reduzierte Wachstumsphänotyp der $\Delta YPK1$ in *S. cerevisiae* konnte durch die Expression von FgPK1 komplementiert werden, was die Homologie beider Proteinkinasen in Hinblick auf die Funktionalität bestätigt.

Aktuelle Analysen von Transkriptomdaten des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* lassen vermuten, dass FgPK1 essentiell für das vegetative Hyphenwachstum (*in vitro* Flüssigkultur) ist, jedoch während einer Weizeninfektion keine bedeutende Rolle einnimmt (Mentgen, unveröffentlicht).

1.4. Zielsetzung dieser Arbeit

In der vorliegenden Dissertation steht die biologische Charakterisierung des membrangebundenen Proteins (1,3)- β -Glucansynthase von *F. graminearum* im Mittelpunkt. Dieses Enzym (FgGSL1) katalysiert die Synthese des bedeutenden Zellwandpolymers (1,3)- β -Glucan. *F. graminearum* besitzt nur ein essentielles Gen zur Expression dieses Strukturproteins. Die Deletion von *FgGSL1* führt zur Letalität, was die Charakterisierung des Proteins erheblich erschwert.

Zunächst ist das Ziel, FgGSL1 mit verschiedenen fluoreszierenden Proteinen (mCherry und GFP) zu fusionieren, um Lokalisationsstudien *in vivo* unter ausgewählten abiotischen und biotischen Stressoren durchführen zu können. Mithilfe des Hefe-Rekombinationssystems sollen die Klonierungskonstrukte erstellt und anschließend homolog in den nativen *FgGSL1*-Genlokus von *F. graminearum*-Protoplasten transformiert werden. Die erhaltenen Primärtransformanten werden daraufhin über die eingefügte Resistenzkassette selektiert, mikroskopisch auf eine Detektion des Fluoreszenzsignals untersucht und anschließend umfassend charakterisiert. Da FgGSL1 maßgeblich an dem Zellwandaufbau beteiligt ist, wird in dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf die Identifizierung von auftretenden strukturellen und biochemischen Zellwandmodifikationen gelegt. Hierzu soll eine effiziente Methode zur quantitativen Bestimmung von Zellwandmonosacchariden mittels HPAEC-PAD (engl. High Performance Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Ampereometric Detection) etabliert werden.

Mithilfe dieser Methode soll eine weitere *F. graminearum*-Mutante ($\Delta pk1$) mit auffallenden phänotypischen Veränderungen bezüglich des Hyphenwachstums und der Zellwand charakterisiert werden. Diese Deletionsmutante der Serin/ Threonin

Proteinkinase FgPK1 wurde von Dr. Christian Voigt generiert und molekularbiologisch untersucht. Die Auswirkungen dieser Gendeletion sind vielschichtig, wobei das Phänomen von spontan auftretenden Verdickungen an den Hyphenspitzen sowie deren Zellwandkomposition genauer analysiert werden soll. Dabei kommen diverse mikroskopische Methoden zum Einsatz. Die Auskeimung der Konidien und das primäre Hyphenwachstum, wie auch die Entstehung der blasenartigen Strukturen sollen in einer Zeitreihe im Lichtmikroskop dokumentiert werden. Zellwandspezifische Analysen, insbesondere in den blasenartigen Verdickungen, sollen einerseits durch die fluoreszenzbasierte Markierung der Zellwandpolymere am konfokalem Laserscanning-Mikroskop (CLSM) und andererseits durch den Einsatz der hochauflösenden *dSTROM*-Methode (direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie) erreicht werden. Zusätzlich werden die Ultrastrukturen im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert. Durch eine spezifische Markierung der strukturgebenden Zellwandpolysaccharide (1,3)- β -Glucan und Chitin mit Gold-gekoppelten Antikörpern sollen diese im TEM dokumentiert werden. Die Ergebnisse aller Mikroskopiemethoden, CLSM, *dSTROM* und TEM, sollen Aufschluss über strukturelle Modifikationen der Zellwand in den blasenartigen Verdickungen geben und zur weiteren Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$ beitragen. Demnach dient diese *F. graminearum*-Mutante lediglich als Untersuchungsobjekt, um die Anwendung diverser Mikroskopiemethoden etablieren zu können. Die funktionale Charakterisierung der FgPK1 ist nicht das primäre Ziel dieser Arbeit, sondern ein positiver Nebeneffekt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Allgemeine Chemikalien

Eingesetzte Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders beschrieben, von den Herstellern Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis, MO, USA), Th. Geyer GmbH & Co. KG (Renningen, Deutschland), Merck kGaA (Darmstadt, Deutschland) und Duchefa Biochemie B. V. (Haarlem, Niederlande) bezogen. Diese entsprechen dem Reinheitsgrad „zur Analyse“. Hergestellte Lösungen und Medien wurden mit doppelt deionisiertem Wasser (ddH₂O) angesetzt und werden zu Beginn jeder Methodenbeschreibung extra aufgeführt.

2.1.2. Kits

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden diverse Kits eingesetzt, welche in der folgenden Tabelle aufgelistet sind.

Tabelle 2-1: Verwendete Kits.

Anwendungsbereich	Bezeichnung	Hersteller
Isolation von Plasmid-DNA	High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid (bezogen über DNA Cloning Service, Hamburg)
DNA-Extraktion aus einem Agarosegel	NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
RNA-Isolation	peqGOLD TriFast [™]	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
cDNA-Synthese	Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)
Quantitative Real-Time PCR	LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)

2.1.3. Oligonukleotide

Die Synthese der in dieser Arbeit relevanten Oligonukleotide (im Folgenden Primer genannt) erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland). Zur virtuellen Erstellung der Primer wurde die Software *Clone Manager Professional 9* (Scientific & Educational Software) genutzt. In den folgenden Tabellen sind die Oligonukleotide nach ihrem Anwendungsbereich aufgelistet. Eine detaillierte Beschreibung der jeweils verwendeten Primer ist im Methodenteil wiederzufinden.

Tabelle 2-2: Verwendete Primer zur Klonierung verschiedener Fusionskonstrukte von FgGSL1 in den Vektor *pRS426* bzw. *pJET1.2*. Kleingeschriebene Sequenzen kennzeichnen zur Klonierung benötigte Überhänge. C-GFP I/ II: Fusion des *GFP* am C-Terminus; N-GFP: Fusion des *GFP* am N-Terminus; N-mCh: Fusion von *mCherry* am N-Terminus; K-mCh: Komplementationskonstrukt von *mCherry-FgGSL1*.

Primerkennung	Sequenz in 5'-3' Orientierung	Beschreibung/ Zielsequenz
C-GFP I 1 (fwd)	ttgtaaacgacggccagtgagcgcgct GAGTCACCTCTCCCTAAGCCA	Promotor (Flanke) <i>FgGSL1</i> mit Überhang zu <i>pRS426</i>
C-GFP I 2 (rev)	gttgaccaccgcccggatatcccgacat GTTGAGTTATTAGATTATCTG	Promotor (Flanke) <i>FgGSL1</i> mit Überhang zu gDNA <i>FgGSL1</i>
C-GFP I 3 (fwd)	caatctctacagataatctaataactcaac ATGTCGGGATATCCGGG	gDNA <i>FgGSL1</i> mit Überhang zum Promotor von <i>FgGSL1</i>
C-GFP I 4 (rev)	TCTTGGTTGGCATCGATGAGC	Interner Primer in <i>FgGSL1</i>
C-GFP I 5 (fwd)	CATCGTCATCTCCATGTATCG	Interner Primer in <i>FgGSL1</i>
C-GFP I 6 (rev)	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctcc AAACAGCTTGATCTTGCCAGTA	gDNA <i>FgGSL1</i> mit GA- Linker (grau unterlegt)
C-GFP I 7 (fwd)	agctggtgcagcgcctggagccggtgcc ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	GFP mit Überhang zum GA-Linker (grau unterlegt)
C-GFP I 8 (rev)	CGGTCGGCATCTACTCTATTC	Amplifikation von GFP- Hyg-Kassette aus <i>pRS426::Tub</i>
C-GFP I 9 (fwd)	caaaggaatagagtagatgccgaccga CCGCGAAAAAAGACTGGGAGACA	3'UTR (Flanke) von <i>FgGSL1</i> mit Überhang zur Hyg-Kassette
C-GFP I 10 (rev)	cgctctagaactagtggatccccgggctg CAAGGTAGGATGTGGGCTGA	3'UTR (Flanke) von <i>FgGSL1</i> mit Überhang zum <i>pRS426</i>

C-GFP II 1 (fwd)	gttgtaaacgacggccagtgagegcgcgt GCTGTTGTAACGATTCTGCC	gDNA <i>FgGSL1</i> (1 kb Flanke) mit Überhang zum <i>pRS426</i>
C-GFP II 2 (rev)	cgctctagaactagtgatccccgggctg TGAGGCTTGCTCAATGATGT	3'UTR (1 kb Flanke) von <i>FgGSL1</i> mit Überhang zum <i>pRS426</i>
N-GFP 1 (fwd)	ttgtaaacgacggccagtgagegcgcgt TCCACGCTTCATGATCTGACG	5'UTR (1 kb Flanke) von <i>FgGSL1</i> mit Überhang zum <i>pRS426</i>
N-GFP 2 (fwd)	ctctaggatctaaagatgggatgggatgga GAGCGAGGTGGGTGATGTAG	Start der Hyg-Kassette mit Überhang zum 5'UTR <i>FgGSL1</i>
N-GFP 3 (rev)	cgctccttctttgctccggctggccca CGGTCGGCATCTACTCTATTC	Ende der Hyg-Kassette mit Überhang zum Promotor <i>FgGSL1</i>
N-GFP 4 (fwd)	agggcaaaggaatagatgtagatccgaccg TGGGGCCAGCCGGAGCAAAG	Promotor von <i>FgGSL1</i> mit Überhang zur Hyg-Kassette
N-GFP 5 (rev)	ggtgaacagctcctcgcccttgetcaccat GTTGAGTTATTAGATTATCT	Ende des Promotors <i>FgGSL1</i> mit Überhang zum GFP
N-GFP 6 (fwd)	caatcttacagataatctaataactcaac ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	Start des GFPs mit Überhang zum Promotor <i>FgGSL1</i>
N-GFP 7 (rev)	ggcaccggctccagcgcctgcaccagctcc CTTGACAGCTCGTCCATGC	GFP mit Überhang zum GA-Linker (grau unterlegt)
N-GFP 8 (fwd)	ggagctggtgcagggcctggagccgggtgcc TCGGGATATCCGGGCGGTGG	<i>FgGSL1</i> (1 kb Flanke) mit Überhang zum GA-Linker (grau unterlegt)
N-GFP 9 (rev)	cgctctagaactagtgatccccgggctga GATCCTGTAAAGTCTCGGC	<i>FgGSL1</i> (1 kb Flanke) mit Überhang zum <i>pRS426</i>
N-mCh 1 (fwd)	atctctacagataatctaataactcaac ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG	Start mCherry mit Überhang zum Promotor <i>FgGSL1</i>
N-mCh 2 (rev)	gcaccggctccagcgcctgcaccagctcc CTTGACAGCTCGTCCATGCC	mCherry mit Überhang zum GA-Linker (grau unterlegt)
K-mCh 1 (fwd)	CGACGCGTCGGAT ATCATCGATGAATTCAT	Amplifikation von <i>nptII</i> -Kassette mit <i>MluI</i> -Schnittstelle

K-mCh 2 (rev)	CCCGAAACGCGTTTTATTCTTG	Amplifikation von <i>nptII</i> -Kassette mit <i>MluI</i> -Schnittstelle
K-mCh 3 (fwd)	ataagaatgcgggccgctaaactat ACGCTTCATGATCTGACGAA	5'UTR (1 kb Flanke) von <i>FgGSLI</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstelle und Überhang zum <i>pJET1.2</i>
K-mCh 4 (rev)	ataagaatgcgggccgctaaacta TGTAAGTCTCGGCTTCACTG	3'UTR (1 kb Flanke) von <i>FgGSLI</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstelle und Überhang zum <i>pJET1.2</i>

Tabelle 2-3: Verwendete Primer zum Nachweis der homologen Integration klonierter Fusionskonstrukte ins *F. graminearum*-Genom. Jeweils ein Primer jedes Primerpaars bindet auf der genomischen Sequenz von *FgGSLI* und der andere in dem transformierten Konstrukt. Die Primer wurden so gewählt, dass sie das *GFP* oder *mCherry* umschließen. Dadurch wird sowohl für die Transformanden als auch für den Wildtyp PH-1 ein PCR-Produkt generiert.

Beschreibung/ Zielsequenz	Primerkennung	Sequenz in 5'-3' Orientierung
Nachweis der homologen Integration von <i>FgGSLI</i> - <i>GFP</i>	C-GFP_integr_fwd C-GFP_integr_rev	GAAACAGTCCAAGCTTAGAAG GCTAACACCCATATCTTACAG
Nachweis der homologen Integration von <i>GFP</i> - <i>FgGSLI</i> / <i>mCherry</i> - <i>FgGSLI</i> sowie der Komplementationsmutante	N-GFP_integr_fwd N-GFP_integr_rev	ACGGTATCTTACAGCCACAC TGAGATAATCATCGGCACAC

Tabelle 2-4: Verwendete Primer zum Nachweis der Expression auf Transkriptionsebene transformierter Fusionskonstrukte sowie der Deletionsmutante $\Delta pk1$. Im Fall der *FgGSLI*-Konstrukte generieren die designten Primerpaare ein PCR-Produkt, welches den Übergang vom Fluorophor und *FgGSLI* beinhaltet. Dadurch soll gezeigt werden, dass das gewünschte Fusionskonstrukt als Transkript vorliegt.

Beschreibung/ Zielsequenz	Primerkennung	Sequenz in 5'-3' Orientierung
Nachweis von <i>FgGSLI</i> - <i>GFP</i>	C-GFP_cDNA_fwd C-GFP_cDNA_rev	ACAGCACCTTGGCAACTGGT TGTTCTGCTGGTAGTGGTCG
Nachweis von <i>GFP</i> - <i>FgGSLI</i>	N-GFP_cDNA_fwd N-GFP_cDNA_rev	ACGACGGCAACTACAAGAC AGTAGCCTCCGTCATGTTGA

Nachweis von <i>FgGSL1</i>	von <i>mCherry-</i>	N-mCh_cDNA_fwd N-GFP_cDNA_rev	GGGAGCGCGTGATGAACTTC AGTAGCCTCCGTCATGTTGA
Nachweis von $\Delta pk1$		cDNA_PK1_fwd cDNA_PK1_rev	GGATCTCCTCACCAAACCTTC GGTTCTGCATAGTCTGTGAC

Tabelle 2-5: Verwendete Primer in der Quantitativen Real-Time PCR (qPCR) zur Amplifikation von *FgGSL1*, diversen Chitinsynthasen und β -Tubulin. In den eckigen Klammern sind die FGSG-Nummern der jeweiligen Gene angegeben. Genutzt wurde die Webseite des *Broad Institute* (Cambridge, MA, USA) (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group), Stand Feb. 2016. Die annotierte Chitinsynthase *chs X* besitzt im Gegensatz zu allen anderen keine Nummerierung.

Beschreibung/ Zielsequenz	Primerkennung	Sequenz in 5'-3' Orientierung
<i>FgGSL1</i> [FGSG_07946]	qGSL1 fwd	GCTATGCCATCCTCTACTTC
	qGSL1 rev	CGGTGTAAGTGGGTTCTTG
β -Tubulin [FGSG_06611]	qTub fwd	TGTCGACGACCAGTTCTCAGC
	qTub rev	CGATGTCGGCGTCTTGGTAT
<i>Fgchs 1</i> [FGSG_03418]	qchs1 fwd	CCGTCGTGGAAGAAATTGAG
	qchs1 rev	CCGAGAGAGCTAAAGTCGTC
<i>Fgchs 2</i> [FGSG_02483]	qchs2 fwd	CAAGAGTGTCGGAACCTACC
	qchs2 rev	TTGAGTGTCAAACGCACTCG
<i>Fgchs 3</i> [FGSG_10327]	qchs3 fwd	GGAGACTTGGATGCGCAATA
	qchs3 rev	TCTTCCTTGGTGCTGATTTCG
<i>Fgchs 4</i> [FGSG_01272]	qchs4 fwd	GCAGGTATTCATTCCACAGG
	qchs4 rev	CGAGTGGGCAACATAGAAAG
<i>Fgchs 6</i> [FGSG_13029]	qchs6 fwd	TCGTCCCAGTTTCACCATGT
	qchs6 rev	CGTCGACGTTGAGACAACAA
<i>Fgchs X</i> [FGSG_01964]	qchsx fwd	TTATCTTCATCTTGCGCCGC
	qchsx rev	TGGTACTCCTCCCCTTCTT

2.1.4. *F. graminearum*-Stämme und Kultivierungsbedingungen

In dieser Doktorarbeit wurde der *F. graminearum* Wildtyp-Stamm PH-1 zur Charakterisierung der (1,3)- β -Glucansynthase (FgGSL1; FGSG_07946, *Broad Institute*, Stand 02/16) verwendet. Dazu wurde dieser mit verschiedenen Konstrukten transformiert. Durch die zielgerichtete homologe Rekombination wurde das native Gen *FgGSL1* durch eines der in Tabelle 2-6 aufgelisteten Fusionskonstrukte ersetzt. Ziel dieser Transformationsmethode war die Generierung von *F. graminearum*-Mutanten, die sich aufgrund der Fusion von FgGSL1 mit einem fluoreszierenden Protein für Lokalisationsstudien eignen.

Des Weiteren wurde die Deletionsmutante $\Delta pk1$ (FGSG_05845, Serin/ Threonin Proteinkinase *gad8*, *Brod Institute*, Stand 02/16) in Hinblick auf Zellwandveränderungen untersucht. Diese wurde von Dr. Christian Voigt (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek) generiert und zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-6: Verwendete *F. graminearum*-Stämme.

Ausgangsstamm	Benennung der Mutante	Insert	Resistenzkassette
PH-1	<i>GSL1-GFP A-1</i>	<i>FgGSL1-GFP</i>	Hygromycin B
PH-1	<i>GSL1-GFP B-1/B-2</i>	<i>FgGSL1-GFP</i>	Hygromycin B
PH-1	<i>GFP-GSL1 C-1/ C-2</i>	<i>GFP-FgGSL1</i>	Hygromycin B
PH-1	<i>mCh-GSL1 D-1/ D-2</i>	<i>mCherry-FgGSL1</i>	Hygromycin B
<i>mCh-GSL1 D-1</i>	<i>FgGSL1 [mCh-GSL1] E-1/ E-2</i>	<i>FgGSL1</i>	Geneticin
8-1	$\Delta pk1$ #1/ $\Delta pk1$ #2	Deletion von <i>FgPK1</i>	Hygromycin B

Der Wildtyp (WT) sowie die Mutantenstämme wurden zur Anzucht in einem flüssigen Vollmedium kultiviert (Tab. 2-7, CM-Medium oder YPD-Medium). Hierfür wurden 20 ml Medium zusammen mit den jeweiligen Konidien (etwa 20.000 Konidien) in einen 100 ml Rundhalskolben gegeben und bei 28 °C schüttelnd (140 rpm) für zwei bis drei Tage inkubiert. Zum Ernten des gewachsenen Pilzmyzels wurde dieses durch einen 100 μ m Sieb filtriert und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen.

Die Produktion von Konidien wurde durch Inokulation kleiner Myzelblöcke in Weizen-Flüssigmedium (Tab. 2-7) induziert. Es erfolgte eine Inkubation bei 28 °C schüttelnd für 10 bis 14 Tage. Zur Trennung der gebildeten Konidien vom Myzel wurde die Suspension

durch ein 40 µm Sieb filtriert. Die Konidien konnten nun abzentrifugiert und in etwa 5 ml sterilem Wasser resuspendiert werden. Zur dauerhaften Lagerung der Konidien wurden diese aliquotiert und bei - 70 °C aufbewahrt.

Tabelle 2-7: Kultivierungsmedien für *F. graminearum*. Aufgelistet sind die Chemikalien zur Herstellung für 1 l Flüssigmedium; durch Zugabe von 10 % Agar entstehen entsprechende Festmedien zur Anzucht des Pilzes in Petrischalen.

Medium	Zusammensetzung	Anwendungsbereich
CM-Medium (engl. <u>C</u> omplete <u>M</u> edium, Leach <i>et al.</i> , 1982)	Zu 800 ml autoklaviertem ddH ₂ O folgende Lösungen steril hinzugeben: - 10 ml Lösung A (100g/ l Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O) steril filtriert) - 10 ml Lösung B (20g/ l KH ₂ PO ₄ ; 25g/ l MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 15g/ l NaCl (pH 5,3) steril filtriert) - 50 ml Hefe-Extrakt-Casein-Mix (20g/ l Hefe-Extrakt; 20g/ l Casein, autoklaviert) - 50 ml 20 % Glukose (autoklaviert) - 1 ml MNS (60 g/ l H ₃ BO ₃ ; 390 mg/ l CuSO ₄ x 5 H ₂ O; 13 mg/ l KI; 60 mg/ l MnSO ₄ x H ₂ O; 51 mg/ l (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O; 548 mg/ l ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 932 mg/ l FeCl ₃ x 6 H ₂ O). - mit sterilem ddH ₂ O auf 1l auffüllen	Plattenwachstums- versuche Generierung von Proben zur RNA- Isolierung
YPD-Medium (engl. <u>Y</u> east <u>P</u> epton <u>D</u> extrose)	- 10 g Hefe-Extrakt - 20 g Pepton - 20 g Glukose - alle Bestandteile in 1 l ddH ₂ O zusammen autoklavieren	Anzucht zur Isolierung von gDNA Zellwandanalyse
Weizen-Flüssigmedium	- in 1l ddH ₂ O 16 g frische, zerkleinerte Weizenblätter geben - autoklavieren und abkühlen lassen - Lösung durch 8-Lagen Gaze filtrieren - erneut autoklavieren	Anzucht und Generierung von Konidien

2.2. Methoden

Im folgenden Abschnitt sind die durchgeführten Untersuchungsmethoden zu den generierten GSL1-Stämmen und der Deletionsmutante $\Delta pk1$ getrennt voneinander dargestellt. Beginnend mit den Mutanten zur Charakterisierung der (1,3)- β -Glucansynthase (2.2.1.- 2.2.11.) werden anschließend die für diese Arbeit relevanten Methoden zur $\Delta pk1$ (2.2.12.) beschrieben.

2.2.1. Hefe-Rekombinations-Klonierung und deren Anwendung zur Generierung von Transformationsvektoren für *F. graminearum*

Virtuelle Generierung von Vektoren

Die Grundlage zum Erstellen von Plasmiden zur *F. graminearum*-Transformation stellt die Methode der Hefe-Rekombination-Klonierung dar (Colot *et al.*, 2006). Hierzu werden die gewünschten DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Als Template dienten sowohl die genomische DNA des WT PH-1, als auch verschiedene Plasmide (zur Amplifikation der Sequenzen von fluoreszierenden Proteinen und der Resistenzkassetten). Diese PCR-Produkte besitzen sogenannte Überhänge (etwa 30 Basenpaare) zu den jeweils angrenzenden Fragmenten (Abb. 2-1). Das erste und letzte Fragment besitzen überlappende Sequenzen zum geöffneten *pRS426* Vektor (Christianson *et al.*, 1992), um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen. Die virtuelle Klonierung und das Generieren der Primersequenzen erfolgten mit der Software *Clone Manager Professional 9* (siehe 2.1.3.). Das geschnittene Plasmid sowie jegliche DNA-Fragmente werden in den *S. cerevisiae*-Stamm *FY834* (Winston *et al.*, 1995) kotransformiert und durch die Hefe-Rekombinationsmaschinerie zu einem geschlossenen funktionalen Vektor ligiert (Abb. 2-1). Zur Charakterisierung von FgGSL1 war die Durchführung einer homologen Rekombination in dem nativen Genlokus nötig. Dazu wurde im Zuge der Fusarium-Transformation das Gen *FgGSL1* mittels eines Doppelten-Crossingover-Prozesses durch das gewünschte klonierte Konstrukt ausgetauscht. Um diesen Vorgang zu ermöglichen, mussten flankierende Sequenzen (etwa 1 kb) zur genomischen DNA des *F. graminearum* Wildtyp-Stammes PH-1 amplifiziert werden.

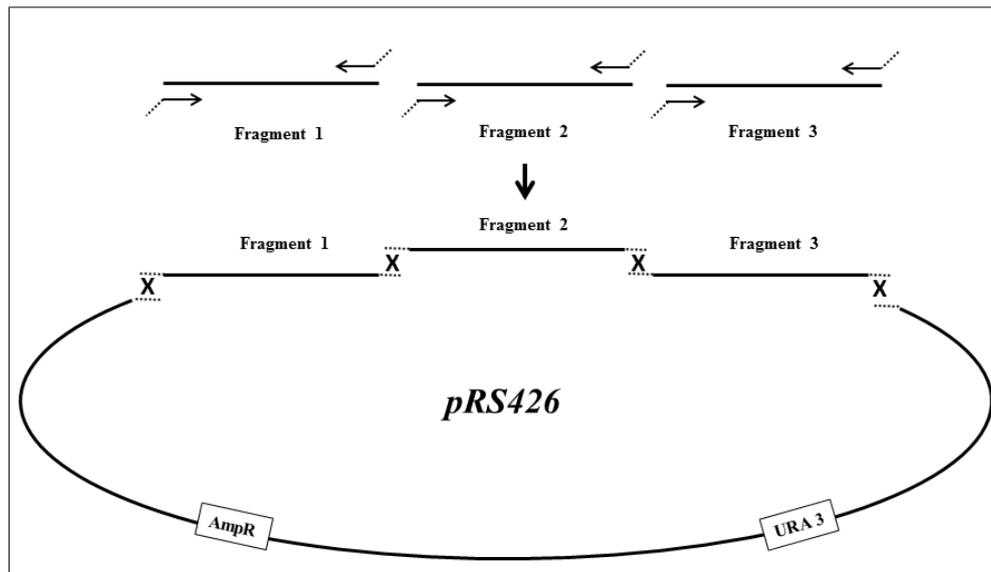


Abbildung 2-1: Prinzip der Hefe-Rekombinationsklonierung. Der geöffnete *pRS426* Vektor und die amplifizierten PCR-Fragmente werden in den *S. cerevisiae*-Stamm *FY834* transformiert. Die Primer (Pfeile) beinhalten Sequenzen (30 bp) des jeweils benachbarten Fragments (Überhänge, gestrichelte Linie an Pfeilen). Letztere ermöglichen der hefespezifischen Rekombinationsmaschinerie eine gerichtete Ligation aller Fragmente zu einem funktionalen Plasmid. *Amp^R*: Resistenzkassette für Ampicillin; *URA3*: Gen zur Uracil-Synthese.

Die zur Klonierung der jeweiligen *FgGSL1*-Fusionskonstrukte verwendeten Primer und deren Sequenzen sind der Tabelle 2-2 zu entnehmen. Die PCR-Bedingungen variierten je nach Primerkombination und Länge der entstandenen Fragmente. Zur Gewährleistung eines fehlerfreien Amplikons kam stets die *PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase* (Aligent Technologies, CA, USA) zum Einsatz. Alle PCR-Produkte wurden über ein 1 %iges Agarosegel aufgetrennt und anschließend extrahiert. Mithilfe des *Nano Vue Plus Spektrophotometers* (GE Healthcare GmbH, Solingen, Deutschland) wurde die DNA-Konzentration der aufgereinigten Fragmente bestimmt.

Hefe-Rekombinationsklonierung im *S. cerevisiae*-Stamm *FY834*

SD-Uracil-Medium	2 % Glukose
(pH 5,8)	0,67 % Difco [®] Hefe-Stickstoff ohne Aminosäuren
	0,077 % Clontech –Ura Zusatz (Clontech Laboratories, CA, USA)
	(1,6 % Agar)
	pH-Wert auf 5,8 einstellen und autoklavieren

1 M Lithiumacetat	1,02 g Lithiumacetat in 10 ml ddH ₂ O lösen steril filtrieren
50 % PEG 3350	5 g PEG 3350 in 5 ml ddH ₂ O unter Wärmezufuhr lösen anschließend mit ddH ₂ O auf 10 ml auffüllen steril filtrieren

Zur Generierung der Fusionskonstrukte von FgGSL1 (Tab. 2-6) wurden die aufgereinigten und vermessenen PCR-Produkte mittels Hefe-Rekombinationsklonierung in das *pRS426* Plasmid kloniert.

Zunächst wurde der zirkuläre Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* über Nacht bei 37 °C hydrolysiert. Das linearisierte Plasmid wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Daraufhin erfolgte eine 30-minütige Dephosphorylierung mithilfe der *Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

Am Vortag der Hefe-Transformation wurde eine Übernachtskultur des *FY834*-Stammes in 5 ml YPD-Medium (siehe Tab. 2-7) angeimpft und bei 28 °C schütteln inkubiert. Eine Hauptkultur bestehend aus 50 ml YPD-Flüssigmedium und 3 ml Vorkultur wurde am Folgetag angelegt und für fünf Stunden bei 28 °C schütteln kultiviert. Die Hefe-Zellen wurden anschließend bei 2000 rpm für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 25 ml sterilem ddH₂O resuspendiert und erneut bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Hefe-Zellen in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen. Die Suspension wurde erneut durch Zentrifugation pelletiert und abschließend die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat gelöst. Hiernach wurde Lachssperma-DNA (10 mg/ml) für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend auf Eis runtergekühlt. Für die Hefe-Rekombinationsklonierung wurden nachfolgende Ansätze in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert:

Klonierung des Zielkonstrukts	Positivkontrolle	Negativkontrolle
240 µl 50 % PEG 3350	240 µl 50 % PEG 3350	240 µl 50 % PEG 3350
36 µl 1 M Lithiumacetat	36 µl 1 M Lithiumacetat	36 µl 1 M Lithiumacetat
0,1- 0,2 µg linearisierter <i>pRS426</i>	1 µg zirkulärer <i>pRS426</i>	0,2 µg linearisierter <i>pRS426</i>
600 ng von jedem PCR-Produkt		

Die Reaktionsansätze wurden mit sterilem ddH₂O auf ein Endvolumen von 360 µl aufgefüllt. Von der denaturierten Lachssperma-DNA wurden 10 µl zu jedem Ansatz pipettiert. Abschließend wurden jeweils 50 µl der Hefe-Zellen hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden vorsichtig gemischt und für 30 min bei 30 °C auf dem Heizblock inkubiert. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 45 °C. Danach wurden die Zellen in einer Tischzentrifuge bei 2000 rpm für 2 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl sterilem ddH₂O resuspendiert. Von dieser Suspension wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt (20 µl konzentrierte Hefe-Zellen in 180 µl Wasser). Sowohl der gesamte unverdünnte Ansatz, als auch die Verdünnungen wurden auf SD-Uracil-Agarplatten ausgestrichen. Des Weiteren wurden 20 µl der untransformierten Hefe-Zellen auf das Selektionsmedium ausplattiert, um die Uracil-Auxotrophie des *FY834*-Stammes zu überprüfen. Die Platten wurden für drei bis vier Tage im Inkubationsschrank bei 30 °C kultiviert. Die gewachsenen Transformanden wurden jeweils in 20 ml SD-Uracil-Flüssigmedium überführt und bei 28 °C und 140 rpm für zwei Tage kultiviert.

Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* FY834

Hefe-Lysis-Puffer	2 % Triton X-100 1 % SDS 100 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM TRIS
TRIS-EDTA-Puffer (pH 8,0)	10 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
3 M Natriumacetat (pH 5,5)	246 g Natriumacetat in 100 ml ddH ₂ O lösen pH-Wert angleichen und autoklavieren
4 M Ammoniumacetat	30,8 g Ammoniumacetat in 100 ml ddH ₂ O lösen autoklavieren

Die in SD-Uracil-Medium kultivierten Hefe-Zellen wurden bei 1500 rpm für 5 min pelletiert, der Überstand verworfen und die Transformanden in 500 µl ddH₂O resuspendiert. Diese Lösung wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Zellen kurz zentrifugiert (14.000 rpm, 30 Sekunden) und der Überstand verworfen. Die Hefe-Zellen wurden anschließend in 200 µl Hefe-Lysis-Puffer resuspendiert, mit 200 µl Phenol-

Chlorform-Isoamylalkohol (25:24:1) und etwa 300 mg Säure-behandelter Glasperlen versetzt und 15 min auf einem Tischschüttler des Modells *IKA VIBRAX VXR-S1* (IKA®-Werke GmbH und Co. KG, Staufen, Deutschland) inkubiert. Zu den lysierten Hefe-Zellen wurden anschließend 200 µl TRIS-EDTA-Puffer (pH 8,0) hinzugegeben, der gesamte Ansatz für 5 min und 13.000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Zur Fällung der Plasmide wurde 1/10 Volumenanteil 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und 1 ml 96 % Ethanol zu der Lösung gegeben. Der Ansatz wurde gut invertiert und für 30 min bei - 20 °C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einer Tischzentrifuge bei 13.000 rpm für 20 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl TRIS-EDTA-Puffer (pH 8,0), versetzt mit 4 µl *RNase A* (10 mg/ ml), gelöst. Die enzymatische *RNase A*-Behandlung wurde für 30 min bei 37 °C vollzogen. Im Anschluss wurden 4 µl 4 M Ammoniumacetat und 1 ml 96 % Ethanol zum Ansatz gegeben. Dieser wurde invertiert und für 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das sichtbare Pellet wurde einmal mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 12 µl ddH₂O gelöst.

Transformation und Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

SOC-Medium (engl. <i>Super Optimal Broth with Catabolic Repression</i>)	2 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefe-Extrakt 10 mM NaCl in ddH ₂ O lösen, autoklavieren und auf RT abkühlen lassen. Anschließend hinzufügen: 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 0,4 % Glukose
LB-Agar (engl. <i>Lysogeny Broth</i>)	40 g/ l LB-Agar (Luria/ Miller) in ddH ₂ O lösen autoklavieren
LB-Flüssigmedium	25 g/ l LB-Medium (Luria/ Miller) in ddH ₂ O lösen autoklavieren

Die isolierten Plasmide wurden zu deren Amplifikation in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes *One Shot® OmniMAX™ 2 TI^R* (Invitrogen) transformiert. Hierfür wurden 6 µl Plasmidlösung zur Transformation von 100 µl kompetenten Bakterienzellen eingesetzt. Die *E. coli* und das Plasmid wurden gemischt und auf Eis für 30 min inkubiert.

Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 42 °C für 90 Sekunden. Die nun transformierten Zellen wurden kurz auf Eis abgekühlt, mit 500 µl sterilem *SOC*-Medium versetzt und zur Regeneration für 45 min bei 37 °C auf dem Heizblock inkubiert. Die transgenen *E. coli*-Zellen wurden auf Selektionsmedium (LB-Agar versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden 4 ml LB-Flüssigmedium mit Einzelkolonien beimpft und für 24 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte mit dem *High-Speed Plasmid Mini Kit* (Geneaid, Tab. 2-1) nach Angaben des Herstellers. Durch den Einsatz von Restriktionsenzymen und abschließender Sequenzierung (durchgeführt von StarSEQ® GmbH, Mainz, Deutschland) konnte die erwartete Sequenzabfolge und Zuverlässigkeit der Klonierungsmethode überprüft werden.

2.2.2. Protoplasten-Transformation des *F. graminearum* Wildtyp-Stammes PH-1

YEPD-Medium	0,3 % Hefe-Extrakt 1 % Bacto-Pepton 2 % Glukose in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Enzymmix (10 ml je Transformation)	2,5 % Driselase® von Basidiomycetes sp. (Sigma-Aldrich) 0,5 % Lytische Enzyme von <i>Trichoderma harzianus</i> (Sigma-Aldrich) in 1,2 M Kaliumchlorid lösen steril filtrieren
STC-CO-Puffer	20 % Saccharose 10 mM TRIS-HCl (pH 8,0) 50 mM CaCl ₂ in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
PEG-CO-Puffer	40 % PEG 4000 (autoklaviert) 60 % STC-CO-Puffer
TB3-Puffer	20 % Saccharose 0,3 % Hefe-Extrakt 0,3 % Säure-hydrolysiertes Casein in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
TB3-Agar	TB3-Puffer mit 1,5 % Agar versetzt autoklavieren

Die klonierten Transformationsvektoren wurden mit ausgewählten Restriktionsenzymen so geschnitten, dass das gewünschte Insert vom Plasmid *pRS426* isoliert werden konnte. Nur das Insert mit den passenden flankierenden Sequenzen zum WT-Genom PH-1 wurde zur Transformation benötigt. Eine homologe Rekombination im nativen Genlokus von *FgGSL1* wurde durch ein Doppelpes-Crossingover ermöglicht.

Am ersten Tag der Protoplasten-Transformation musste eine Vorkultur bestehend aus 50 ml YEPD-Medium mit 1×10^6 Konidien PH-1 beimpft werden. Diese Kultur wurde über Nacht bei 28 °C und 150 rpm inkubiert. Am Folgetag wurde das gewachsene Pilzmyzel mithilfe eines 40 µm Siebes vom Medium getrennt und mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Myzel auf einem Stapel sterilem Filterpapier getrocknet. Ein Enzymmix (siehe oben) bestehend aus zellwandabbauenden Reagenzien wurde angesetzt und für 30 min gerührt. Anschließend wurde diese Lösung bei 4100 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. Zur Protoplastierung wurden 0,5 g des Pilzmyzels eingewogen und mit dem hergestellten Enzymmix gemischt. Diese Suspension wurde anschließend in einem kleinen Erlenmeyerkolben für 2,5 Stunden bei 30 °C und 80 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die entstandenen Protoplasten wurden erst durch ein 100 µm Sieb und anschließend durch ein 40 µm Sieb von dem restlichen Myzel getrennt. Zwischendurch wurden die Protoplasten mit 10 ml einer 1,2 M Kaliumchlorid-Lösung gewaschen. Im Anschluss wurden die Protoplasten bei 2000 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet vorsichtig mit 10 ml STC-CO-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (2000 rpm, 10 min) und die Protoplasten in einer Konzentration von 1×10^8 je ml STC-CO-Puffer aufgenommen. Für eine Transformation wurden 200 µl (2×10^7 Protoplasten) benötigt und mit dem geschnittenen Plasmid (3- 10 µg) versetzt. Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG-CO-Puffer zum Ansatz pipettiert, dieser gründlich gemischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. 5 ml TB3-Puffer wurden zur Regeneration der Protoplasten zu dem Ansatz gegeben und für 30 min inkubiert. Schließlich wurden 50 ml 1,5 % Agar in TB3-Puffer (abgekühlt auf etwa 50 °C) zu der Lösung gegeben und diese auf fünf Petrischalen (Durchmesser 96 mm) verteilt. Zur vollständigen Regeneration der transformierten Protoplasten wurden die Platten über Nacht bei 28 °C gelagert. Letztere wurden am nächsten Tag mit jeweils 10 ml einer 1,5 %igen Wasseragar-Lösung, versetzt mit dem entsprechenden Antibiotikum (Hygromycin B 250 µg/ ml; Geneticin 100 µg/ ml), überschichtet. Die Platten wurden für weitere zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert. In

dieser Zeit wuchsen die Transformanden durch den Selektionsagar an die Oberfläche, wurden anschließend vereinzelt und auf kleine Petrischalen, gefüllt mit selektivem CM-Agar (Tab. 2-7), transferiert.

Die beschriebene *F. graminearum*-Transformation wurde stets von den technischen Assistentinnen Birgit Hadelor und Cathrin Kröger (AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek) durchgeführt.

2.2.3. Vereinzeln (engl. Single) von Konidien

SNA-Agarplatten	1 g KH ₂ PO ₄
(engl. <u>S</u> ynthetic <u>N</u> utrient <u>P</u> oor	1 g KNO ₃
<u>A</u> gar)	0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O
	0,5 g KCl
	0,2 g Glukose
	0,2 g Saccharose
	22 g Agar
	in 1 l ddH ₂ O lösen und autoklavieren

Das Vereinzeln von Konidien dient dem Ziel, *F. graminearum*-Kolonien zu generieren, die lediglich aus einer einzigen Konidie hervorgegangen sind. Eine Kontamination etwa mit WT-Konidien soll dadurch verhindert werden.

Zur Durchführung dieser Methode wurden kleine Agarblöcke von Primärtransformanden zur Induktion der Konidienproduktion in 20 ml flüssigem Weizenmedium (siehe Tab. 2-7) angeimpft und schüttelnd bei 28 °C für 10- 14 Tage inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Konidien durch ein 40 µm Sieb vom Myzel getrennt und mittels Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Eine 1:100 und 1:1000 Verdünnung der Konidien in wässriger Lösung wurde hergestellt und jeweils 20 µl auf SNA-Agarplatten ausgestrichen. Letztere wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am Folgetag konnten die ausgekeimten Konidien mithilfe eines Stereomikroskops (*Leica MZ6*, Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland) identifiziert werden. Unter sterilen Bedingungen wurden einzelne Konidien ausgeschnitten und auf kleine selektive CM-Agarplatten transferiert. Diese wuchsen für zwei bis drei Tage bei 28 °C. Die erzeugten *F. graminearum*-Kolonien standen nun für alle weiteren molekularbiologischen und phänotypischen Charakterisierungen zur Verfügung.

2.2.4. Isolierung genomischer DNA aus *F. graminearum*-Myzel

CTAB-Puffer	2 % CTAB
(Cetyltrimethylammoniumbromid)	100 mM TRIS-HCl (pH 8,0)
	20 mM EDTA
	1,4 M NaCl
	in ddH ₂ O lösen und autoklavieren

Zu Beginn jeder molekularbiologischen Charakterisierung generierter *F. graminearum*-Transformanten wurde die genomische DNA der Mutanten mittels der CTAB-Puffer-Methode (modifiziert nach dem Original von Murray und Thompson, 1980) isoliert. Hierfür wurde das Luftmyzel einer Pilzkolonie von der Oberfläche einer Agarplatte mit einem sterilen Skalpell abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß mit 700 µl YPD-Medium (siehe Tab. 2-7) transferiert. Der Ansatz wurde schüttelnd über Nacht bei 28 °C inkubiert. Am Folgetag wurde das Pilzmyzel in einer Tischzentrifuge pelletiert (13.000 rpm, 10 min) und zweimal mit je 500 µl ddH₂O gewaschen. Die Überstände wurden stets verworfen. Im Anschluss wurde mithilfe einer Pinzette ein kleines Loch in den Deckel des Reaktionsgefäßes gestochen und das Myzel in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Proben wurden für mindestens sechs Stunden lyophilisiert, wobei die sublimierende Flüssigkeit durch das Loch im Deckel entweichen konnte. Anschließend wurde das Myzel mit einem Pistill zerkleinert, in 700 µl CTAB-Puffer resuspendiert und für 60 min bei 65 °C und 300 rpm im Heizblock inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Durch die Zugabe von 700 µl Chloroform, 10-fachem Invertieren und anschließender Zentrifugation (13.000 rpm, 10 min) wurde eine Phasentrennung erreicht. Die obere wässrige Flüssigkeit wurde wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl vorgekühltem Isopropanol versetzt. Die Lösung wurde gut invertiert und bei -20 °C für eine Stunde inkubiert. Die ausgefallene genomische DNA wurde durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4 °C, 30 min) präzipitiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Im Anschluss wurde die DNA luftgetrocknet und in 100 µl sterilem ddH₂O, versetzt mit 2 µl *RNase A* (10 mg/ml), auf dem Heizblock bei 37 °C für 30 min gelöst.

2.2.5. Southern Blot

Depurinationslösung	0,25 M HCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
Neutralisierungslösung	0,5 M TRIS-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
20 x SSC-Lösung	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
2 x SSC-Lösung	hergestellt aus 20 x SSC, 1:10 Verdünnung mit ddH ₂ O
5 x B1-Puffer	0,5 M Maleinsäure 0,75 M NaCl pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen und autoklavieren
10 % Blockingreagenz	10 g Blocking Reagent (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) in 100 ml 1 x B1-Puffer lösen aliquotieren (10 ml) und bei - 20 °C aufbewahren
Prähybridisierungslösung	5 x SSC-Lösung 0,1 % N-Lauryl-Sarkosin 0,2 % SDS 2 % Blockierungsreagenz
Hybridisierungslösung	25 ml Prähybridisierungslösung versetzt mit denaturierter Sonde
W1-Puffer	2 x SSC-Lösung 0,1 % SDS in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
W2-Puffer (vorgewärmt auf 68°C)	0,2 x SSC 0,1 % SDS in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
WP-Puffer	1 x B1-Puffer 0,3 % Tween 20 in ddH ₂ O lösen und autoklavieren
B2-Puffer	1 x B1-Puffer 1 % Blockingreagenz

Antikörperlösung	B2-Puffer versetzt mit 1:10.000 verdünntem Antikörper (<i>Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments</i> , Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)
B3-Puffer	100 mM TRIS-HCl (pH 9,5) 100 mM NaCl

Die molekularbiologische Methode der Southern Blot Analyse ermöglicht die Identifizierung bestimmter Sequenzabschnitte in einem komplexen DNA-Gemisch durch den Einsatz einer genspezifischen Sonde. Des Weiteren kann mithilfe dieser Untersuchungsmethode die Häufigkeit der Integration eines gesuchten DNA-Fragmentes bestimmt werden.

Die Southern Blot Analyse wurde in dieser Arbeit zum Nachweis positiv transformierter *F. graminearum*-Mutanten und zur Identifizierung von Transformanden mit gewünschten Einzelintegrationen angewandt.

Zunächst wurde die genomische DNA des Wildtyps PH-1 und der Transformanden isoliert (siehe 2.2.4.). Der gesamte Ansatz wurde über Nacht mit dem Restriktionsenzym *HindIII* hydrolysiert, am Folgetag gefällt und in 30 µl ddH₂O aufgenommen. Mittels Gelelektrophorese wurden die restringierten DNA-Fragmente in einem 0,8 %igen Agarosegel ihrer Größe nach aufgetrennt (120 V; 2,5 Stunden). Anschließend wurde das Gel sukzessive für jeweils 10 min in Depurinations-, Denaturierungs- und Neutralisierungslösung inkubiert. Hierbei wurde die DNA in Einzelstränge gespalten und für den Transfer auf die Nylonmembran (Amersham Hybond-NX, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) vorbereitet. Der Blot wurde folgendermaßen aufgebaut (Orientierung von unten nach oben): auf eine Plastikschiene gefüllt mit 20 x SSC-Lösung wurde eine Glasscheibe gelegt und ein langer Streifen aus Whatman-Papier als „Feuchte-Brücke“ darauf fixiert (Enden des Streifen reichten in die 20 x SSC-Lösung). Anschließend wurde das mit den Taschen nach oben zeigende Agarosegel auf die Brücke gelegt, gefolgt von der Nylonmembran. Abschließend wurden vier in 2 x SSC-Lösung getränkte Whatman-Papiere luftblasenfrei auf die Membran platziert. Der Blotaufbau wurde durch das Auflegen eines Stapels saugfähigem Papier vollendet. Gewichte (z. B. Kataloge) beschwerten den Blot. Der Kapillartransfer der DNA auf die Nylonmembran fand über Nacht statt. Am darauffolgenden Tag wurde der Blot abgebaut, die Membran kurz in 2 x SSC-Lösung gespült und die DNA mithilfe des UV-Crosslinkers (Stratagene, La Jolla, CA, USA) auf der Membran fixiert. Letztere wurde in eine Hybridisierungsröhre transferiert, wiederum kurz mit 2 x SCC-Lösung gewaschen und mit

25 ml der Prähybridisierungslösung versetzt. Es erfolgte eine Inkubation von mindestens vier Stunden bei 68 °C rotierend im Hybridisierungsofen. Im Anschluss wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und durch die Hybridisierungslösung, welche die DIG-markierte Sonde passend zum gesuchten Zielgen enthält, ersetzt. Vorab wurde die Sonde bei 95 °C für 10 min denaturiert und im Eisbad abkühlt. Die Generierung der Sonde erfolgte nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht, ebenfalls bei 68°C rotierend im Hybridisierungsofen. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungslösung in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei - 20 °C bis zum Wiedergebrauch gelagert. Die Hybridisierungsröhre wurde inklusive Membran aus dem Hybridisierungsofen geholt und mit 50 ml W1-Puffer gewaschen. Dafür wurde die Röhre bei Raumtemperatur für 5 min auf einem Rotationsschüttler (Modell: *Stuart Roller Mixer SRT1*, Bibby Sterilin, UK) inkubiert. Ein zweiter Waschschrift der Membran mit neuem W1-Puffer (50 ml) folgte. In der Zwischenzeit wurde der Puffer W2 im auf 68 °C vorgewärmt. Der W1-Puffer wurde verworfen und die Membran zweimal mit jeweils 50 ml W2-Puffer im Hybridisierungsofen für 15 min bei 68 °C gewaschen. Ein abschließender Waschschrift bei Raumtemperatur mit dem WP-Puffer für 5 min schloss sich an. Darauffolgend wurde die Membran mit 20 ml des Blockingpuffers B2 für 60 min auf dem Rotationschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde diese Lösung verworfen und die Antikörperlösung hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von exakt 30 min. Im Folgenden wurde der Antikörper entfernt und die Membran dreimal für jeweils 20 min mit 50 ml WP-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 10 min mit 15 ml B3-Puffer äquilibriert. Auf eine Plastikfolie wurden 500 µl CSPD-Lösung (Chemilumineszenzsubstrat; 1:100 verdünnt in B3-Puffer, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) getropft, die Membran anschließend mit der DNA-behafteten Seite auf die Lösung gelegt und diese gleichmäßig verteilt. Es folgte eine Inkubation für 5 min im Dunkeln. Daraufhin wurde die Membran in eine neue Plastikhülle eingeschweißt und für weitere 15 min bei 37 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Entwicklung der Membran erfolgte am *Fujifilm LAS 3000-Imager* (Fuji Photo Film Co., Tokio, Japan) und die Auswertung der detektierten Signale mit der zugehörigen *Fujifilm Image-Reader* Software.

2.2.6. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pilzmyzel und cDNA-Synthese

Alle verwendeten Lösungen, Puffer, Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen waren RNase-frei. Hergestellte Reagenzien wurden stets mit DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, USA) angesetzt, um die Inaktivierung vorhandener RNAsen zu gewährleisten. Des Weiteren erfolgten die Arbeitsschritte stets unter dem Abzug, welcher vorab gründlich gereinigt wurde. Durch das Einhalten dieser Maßnahmen konnte eine Kontamination der Proben mit RNAsen minimiert bzw. verhindert werden.

Zur RNA-Isolierung aus Pilzmyzel wurde eine Kultur bestehend aus 30 ml CM-Medium (Tab. 2-7) und 30.000 Konidien des jeweiligen *F. graminearum*-Stamms in einem 100 ml Rundhalskolben angesetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei 28 °C schüttelnd für 24 Stunden. Das Myzel wurde am Folgetag mithilfe eines 100 µm Siebes filtriert und zweimal mit sterilem ddH₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pilzmyzel in ein kleines Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden über Nacht lyophilisiert. Am darauffolgenden Tag wurden zum getrockneten Myzel zwei kleine sterile Stahlkugeln gegeben und die Proben in einer Schwingmühle (*MM200*, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) mit 30 Hz für 3 min zu feinem Pulver zermahlen. Letzteres wurde anschließend mit 500 µl *peqGOLD TriFastTM* (siehe Tab. 2-1) versetzt und homogenisiert. Die Suspension wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzupipettiert, die Mischung gut invertiert und für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Lösung für 5 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, wobei es zu einer Phasentrennung kam. Die obere wässrige Phase, welche die Gesamt-RNA beinhaltet, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und nach 10-fachem Invertieren zur Fällung der Nukleinsäure 20 min im Eisbad inkubiert. Die RNA wurde anschließend durch Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 75 % eiskaltem Ethanol gewaschen und im Eisbad für etwa 30 min luftgetrocknet. Die Gesamt-RNA wurde abschließend in 50 µl DEPC-Wasser gelöst.

Um eine Kontamination der isolierten RNA mit genomischer DNA auszuschließen, schloss sich nach der RNA-Isolierung eine *DNase I*-Behandlung an. Hierzu wurden zu jedem Ansatz 10 µl 10-fach *DNase I* Puffer, 5 µl *DNase I* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) und 0,5 µl *RiboLock RNase Inhibitor* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pipettiert. Ein Gesamtvolumen von 100 µl wurde durch die Zugabe von 34,5 µl DEPC-Wasser erreicht. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37 °C auf einem

Heizblock inkubiert. Anschließend wurden 10 µl ETDA (RNase-frei, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) zur Inaktivierung der *DNase I* hinzugegeben und die Reaktion für 10 min bei 65 °C abgestoppt. Zur Fällung der isolierten RNA wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 5 µl Glykogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) sowie 315 µl Ethanol zum Ansatz pipettiert. Dieser wurde anschließend gut invertiert und über Nacht bei -70 °C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde die RNA durch Zentrifugation (30 min, 13.000 rpm, 4 °C) erneut präzipitiert, einmal mit 70 % Ethanol gewaschen und auf Eis luftgetrocknet. Abschließend wurde die RNA in 50 µl DEPC-Wasser gelöst und deren Konzentration photometrisch ermittelt.

Zur anschließenden cDNA-Synthese wurde das *Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR* (siehe Tab. 2-1) nach Herstellerangaben angewandt. Dabei wurden exakt 1 µg isolierte Gesamt-RNA eingesetzt. Abschließend wurde die synthetisierte cDNA auf eventuelle Verunreinigung genomischer DNA mithilfe einer spezifischen PCR überprüft. Hierbei wird ein Fragment des Gens FGSG_00845 (60S ribosomal protein L15, *Broad Institute*, Stand 02/16) mit den Primern Screen_fwd (GTTGATCTGTGACCCTTGAG) und Screen_rev (GATGTCGTTGCCTTCCTCCT) amplifiziert. Letztere binden an zwei benachbarte Exonbereiche des Gens, welche durch ein 277 bp großes Intron voneinander getrennt werden. Liegt genomische DNA als Template vor, wird ein Produkt von 772 bp erhalten. Binden die Primer hingegen an die Sequenz der cDNA, wird ein 495 bp Amplikon generiert.

Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -70 °C und die cDNA bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7. Expressionsanalyse mittels Quantitativer Real-Time PCR (qPCR)

Zur Expressionsanalyse essentieller Gene der pilzlichen Zellwandbiosynthese (1,3)- β -Glucansynthase *FgGSL1* und Chitinsynthasen (Primersequenzen siehe Tab. 2-5) wurde die generierte cDNA (siehe 2.2.6.) in einem Verhältnis von 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die fluoreszenzbasierte Methode der quantitativen Echtzeit-PCR ermöglicht die Bestimmung der relativen Expressionstärke eines Gens. Hierfür wurde stets das Referenzgen β -*Tubulin* (FGSG_06611) in jeder Messung und von jeder Probe mitgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* interkaliert während der andauernden PCR in die synthetisierten doppelsträngigen DNA-Fragmente. Dadurch wird ein Signal erzeugt, welches nach jedem Zyklus gemessen wird und sich proportional zur DNA-Konzentration

verhält. Abschließend muss eine Schmelzkurvenanalyse der Amplifikate durchgeführt werden, um eine Generierung unspezifischer PCR-Produkte bzw. Primerdimere zu kontrollieren. Die cDNA-Proben wurden mit dem *LightCycler[®] 480 SYBR Green I Master* (siehe Tab. 2-1) und den benötigten Primern auf Eis wie folgt pipettiert:

2 x <i>SYBR Green I Master</i>	10 µl
Primer (10 µM, fwd)	1 µl
Primer (10 µM, rev)	1 µl
cDNA (1:20)	5 µl
ddH ₂ O	3 µl

Es wurden von jeder Probe drei technische Replikate angefertigt. Eine Verifizierung der gemessenen Werte erfolgte durch zwei weitere Wiederholungen biologischer Replikate. Die PCR-Reaktion wurde im *LightCycler[®] 480* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) mit folgendem Temperaturprofil vollzogen:

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
Denaturierung	95 °C	15 s	45
Anlagerung	55 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Schmelzkurve	58 °C- 95 °C	5 s/ °C	1

Am Ende der qPCR wurden die *C_p* (engl. *Crossing point*)-Werte jeder Probe sowie die Schmelzkurven in der *LightCycler[®] 480* Software (Version 1.5) im Analyse-Tool algorithmisch berechnet. Die Ermittlung relativer Expressionsunterschiede zwischen dem *F. graminearum*-Wildtypen und diverser Mutanten erfolgte mit dem Programm *REST-384* (Relative Expression Software Tool, Pfaffl *et al.*, 2002).

2.2.8. Phänotypische Charakterisierung der generierten GSL1-Mutanten

Die in dieser Doktorarbeit erzeugten *F. graminearum*-Transformanten (siehe Tab. 2-6) wurden nach der erfolgten molekularbiologischen Analyse nun einer phänotypischen Charakterisierung unterzogen. Im Folgenden werden alle durchgeführten Untersuchungsmethoden beschrieben.

Untersuchung des Myzelwachstums auf Festmedium

Zur Analyse der Wachstumsrate der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp PH-1 wurden vor Beginn des Versuchs CM-Agarplatten (siehe Tab. 2-7) angefertigt. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass jede Petrischale mit genau 7 ml Medium gefüllt wurde, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Zunächst wurden die zu testenden Stämme auf CM-Festmedium für zwei bis drei Tage bei 28 °C angezogen. Unter sterilen Bedingungen wurden anschließend gleichgroße kreisförmige Myzelblöcke ausgestanzt und jeweils einer in die Mitte der vorab gegossenen CM-Agarplatten platziert. Von jedem Stamm wurden zwei Replikate angefertigt. Die Platten wurden randomisiert auf einem Tablett angeordnet und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Nach dem ersten Inkubationstag wurden die CM-Agarplatten auf dem Tablett neu angeordnet, um eventuelle externe Einflüsse (wie beispielsweise Licht und Feuchtigkeit) auf das Wachstumsverhalten ausschließen zu können. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die gewachsenen Kolonien mit einem handelsüblichen Scanner dokumentiert.

Untersuchung der Konidienmorphologie

Bereits beim Vereinzeln von Konidien der Primärtransformanten vielen phänotypische Veränderungen der Mutanten auf. Dieses Phänomen wurde, wie im Folgenden beschrieben, weiter analysiert. Hierzu wurden Konidien der Transformanten im Durchlicht eines Mikroskops dokumentiert und anschließend deren Länge bestimmt. Zum Vergleich wurde der Wildtyp PH-1 mitgeführt. Je *F. graminearum*-Stamm wurden 30 Konidien vermessen, aus den erhaltenen Daten ein Mittelwert sowie die Standardabweichung mit der *Microsoft Office Software Excel 2010* (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) ermittelt.

Untersuchung der Auskeimungsfähigkeit und des Hyphenwachstums

Des Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern die morphologisch auffälligen Konidien in der Lage sind auszukeimen und ob das primäre Hyphenwachstum verglichen zu PH-1 Unterschiede aufweist. Dazu wurden etwa 50 Konidien des zu untersuchenden Stammes mit 150 µl CM-Flüssigmedium (siehe Tab. 2-7) gemischt. Auf einem Objektträger wurde ein doppelseitiger Kleberahmen (Gene Frame 125 µl, 1,7 x 2,8 cm, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) fixiert und die Konidien suspension hineinpipettiert. Mit einem Deckglas wurde anschließend die Lösung luftdicht verschlossen. Der

Objektträger wurde auf dem Objektisch des Mikroskops *Axio Imager.Z1* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) eingespannt und für 10 min ruhen gelassen, damit sich die Konidien absetzen konnten. Anschließend wurde eine Konidie im Durchlicht des Mikroskops anvisiert und alle 10 min für insgesamt 15 Stunden das Auskeimen und Hyphenwachstum dokumentiert (Einstellungen (engl.): Multidimensional Acquisition, Channel: Brightfield, Z-Stack: 30 Slices, Time: interval 10 min, duration: 20 h). Die nachträgliche Bearbeitung der einzelnen Aufnahmen erfolgte mithilfe der Software *Image J* (*National Institutes of Health*, Bethesda, MD, USA). Zur Verdeutlichung von Wachstumsunterschieden zwischen Mutante und Wildtyp wurden lediglich einige ausgewählte Aufnahmen in dieser Arbeit dargestellt.

2.2.9. Infektionsstudien auf Weizenähren

Zur Untersuchung der Virulenz generierter *F. graminearum*-Stämme wurde das Weizenkultivar *Nandu* (KWS Lochow GmbH, Bergen-Wohlde, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden die Pflanzen in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen (20 °C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit, 16 h Lichtperiode) kultiviert. Zur Inokulation der Weizenährchen wurden die Konidien auf eine Konzentration von 50 Konidien/ μl eingestellt, aliquotiert und bei - 70 °C bis zur Verwendung gelagert. Es wurde eine Punktinokulation von einzelnen Weizenblüten vorgenommen, indem 500 Konidien mithilfe einer Pipette zwischen Lemma und Palea pipettiert wurden. Dazu mussten die Weizenähren das richtige Entwicklungsstadium besitzen (zwischen halb abgeschlossener und vollendeter Anthese; Zadoks Maßstab: 65-69; Zadoks *et al.*, 1974). Je Ähre wurden etwa mittig zwei sich gegenüberliegende Blüten punktinkuliert. Wasser diente als Negativkontrolle. Abschließend wurden die infizierten Ähren für drei Tage mit befeuchteten Plastiktüten umhüllt, um die benötigte Feuchtigkeit zur Auskeimung der Konidien zu gewährleisten. Die Weizenähren wurden nach 21 Tagen geerntet und ausgewertet. Dazu wurden die Ährchen mit *Fusarium Head Blight*-Symptomen (Nekrosenbildung und Ausbleichen) gezählt und in Relation zu der Gesamtanzahl an Ährchen pro Ähre gesetzt. Je *F. graminearum*-Mutante wurden vier bis fünf Weizenähren inokuliert und insgesamt zwei unabhängige Versuche durchgeführt.

2.2.10. Zellwandanalyse von *F. graminearum*

Das (1,3)- β -Glucan, welches von der (1,3)- β -Glucansynthase FgGSL1 synthetisiert wird, ist neben Chitin das bedeutendste Polysaccharid in der pilzlichen Zellwand. Mit der im Folgenden beschriebenen Zellwandanalyse und Bestimmung der Monosaccharide sollen eventuell auftretenden Unterschiede in der Zusammensetzung der Zellwandzucker identifiziert werden.

Polysaccharid-Extraktion durch chemische Hydrolyse

72 % Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	2,8 ml ddH ₂ O 7,2 ml 96 % H ₂ SO ₄ langsam zum Wasser gießen, unter dem Abzug, Lösung auf Raumtemperatur abkühlen lassen
233 mM Bariumhydroxid (Ba(OH) ₂), gesättigt	8 g Ba(OH) ₂ in 200 ml ddH ₂ O unter Rühren lösen, unter dem Abzug arbeiten

Zur Generierung des Probenmaterials wurden Konidien (10.000 Konidien/ 10 ml Medium) der *F. graminearum*-Mutanten sowie des Wildtyps PH-1 in 30 ml YPD-Flüssigmedium (siehe Tab. 2-7) angeimpft und für zwei Tage bei 28 °C schüttelnd kultiviert. Das gewachsene Myzel wurde über ein 100 μ m Sieb vom Medium getrennt und solange mit Wasser gespült, bis der Durchfluss farblos war. Das Pilzmyzel wurde anschließend auf einem Papierstapel getrocknet, in Aluminiumfolie verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mithilfe eines Mörsers und Pistills (vorgekühlt auf - 20 °C) wurde das Myzel unter flüssigem Stickstoff zu Pulver gemahlen. Letzteres wurde anschließend in der Lyophilie über Nacht gefriergetrocknet. Am Folgetag wurden 10 mg des Pulvers in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss gegeben.

Grundlage für die im Folgenden beschriebene chemische Hydrolyse der Polysaccharide stellt die Veröffentlichung von Jean Marie François dar (François, 2007). Zu dem abgewogenen Myzelpulver wurden 150 μ l 72 % Schwefelsäure pipettiert und die Suspension gut gemischt. Die Lösung verblieb für exakt drei Stunden bei Raumtemperatur, wobei die Proben alle 30 min nochmals gut durchmischt wurden. Anschließend wurden zu den Reaktionsgefäßen 1,9 ml ddH₂O pipettiert und das Gesamtvolumen von nun 2 ml auf zwei neue 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss verteilt. Letztere wurden für genau vier Stunden bei 100 °C im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Lösungen auf Raumtemperatur abkühlt und in 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Suspension wurde

nochmals durch die Zugabe von 2 ml ddH₂O verdünnt und anschließend der pH-Wert mittels gesättigter Bariumhydroxid-Lösung auf 6,0 bis 8,0 eingestellt. Dabei kam es zur Bildung eines weißlichen Niederschlags, das Bariumsulfat. Abschließend wurden die Proben zur vollständigen Fällung über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden die Lösungen auf Raumtemperatur erwärmt, gemischt und der pH-Wert kontrolliert (sollte zwischen 6,0 und 8,0 liegen). Anschließend wurde das Volumen aller Proben durch die Zugabe von ddH₂O angeglichen (auf 20- 25 ml). Es erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min. 1 ml der oberen wässrigen Phase wurde mit einem 0,45 µm Filter in ein neues kleines Reaktionsgefäß steril filtriert, um kleinste Schwebepartikel zu entfernen. Die Proben wurden bis zur Monosaccharid-Bestimmung mittels HPAEC-PAD (engl. High Performance Anion Exchange Chromatography mit Pulsed Amperometric Detection) bei - 20 °C aufbewahrt.

Analyse von Monosacchariden aus Zellwandextrakten mittels HPAEC-PAD

Standard-Lösungen	1 mg/ ml Glukose 1 mg/ ml Galaktose 1 mg/ ml Glukosamin 1 mg/ml Mannose in ddH ₂ O lösen, steril filtrieren und bei -20 °C lagern
1 M Natriumhydroxid-Lösung	1 l MilliQ-Wasser entgasen, 52 ml MilliQ-Wasser entnehmen und 52 ml HPLC-geeignete 50 % NaOH-Lösung hinzugeben, durch Rollen mischen

Die Messung der Monosaccharide erfolgte an einer HPLC (engl. High Performance Liquid Chromatography) des Modells *Dionex ICS-5000* mit EC und RI Detektor (Dionex, Corporation, Sunnyvale, CA, USA). Die in den Proben enthaltenen Monosaccharide wurden nach ihrer Laufzeit identifiziert und über die Peakflächen quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte durch den Vergleich der Chromatogramme von extern mitgeführten Standards. Die filtrierten Proben (siehe oben) wurden im Verhältnis 1:10 mit sterilem ddH₂O verdünnt und 500 µl in ein HPLC-Glasfläschchen (ND8, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) überführt, Luftblasen durch Schnippen entfernt und diese Gefäße mit einem geschlitzten Septum und Kappe verschlossen (VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland). Als Standard wurden 1 mg/ ml Lösungen

von Glukose, Galaktose, Glucosamin und Mannose hergestellt und ebenfalls steril filtriert. 200 µl jeden Standards und 200 µl ddH₂O wurden in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gut durchmischt. Beginnend mit dieser Stammlösung wurden weitere serielle Verdünnungen hergestellt und als Standardreihe in der Messung eingesetzt (verwendete Verdünnungen: 25 µg/ ml, 12,5 µg/ml, 10 µg/ ml, 6,25 µg/ml, 5 µg/ ml, 2,5 µg/ ml und 1,25 µg/ ml). Als Blindprobe diente reines ddH₂O. Die Auftrennung der Monosaccharide erfolgte über eine *Carbo Pac*[®] PA 20 Säule (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Die Elution der Einfachzucker wurde über einen Gradienten von 2,8 mM bis 45 mM Natriumhydroxid-Lösung erreicht. Dazu mussten zwei Eluenten vorbereitet werden. Hierzu wurden zwei 1 l Schottflaschen jeweils mit 1000 ml frischem MilliQ-Wasser befüllt und im Ultraschallbad unter kontinuierlichen Ultraschallstößen für mindestens 45 min entgast (Modell: *Bandelin Sonorex Digitec DT 31*, Einstellung: Degas). Anschließend wurden aus einer der beiden Schottflaschen genau 52 ml MiliQ-Wasser entnommen. Letzteres wurde durch die Zugabe von 52 ml HPLC-geeigneter Natriumhydroxid-Lösung wiederum auf 1000 ml aufgefüllt (Endkonzentration ist 1 M) und durch vorsichtiges Rollen auf dem Labortisch gemischt. Die hergestellten Eluenten wurden an die entsprechenden Vorrichtungen der HPLC angeschlossen und während des Messvorgangs durch eine stetige Stickstoffzufuhr entgast. Die Bedienung der HPLC und die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgten mit der *Dionex Chromelon Software* (Version 6.8). Das verwendete Programm „Monosaccharide A+C“ wurde von Dr. Dorothea Ellinger (ehemals AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek) erstellt. Nachdem die benötigten Kapillare der HPLC mit beiden Eluenten gespült wurden, erfolgte die Äquilibration der *Carbo Pac*[®] PA 20 Säule mit 2,8 % NaOH-Lösung. Die Messung der Proben wurde bei 30 °C und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/ min durchgeführt. Nach dem Ende der Sequenz musste die HPLC zeitnahe manuell ausgestellt werden, um ein Trockenlaufen der Säule zu vermeiden.

2.2.11. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (engl. CLSM)

Jegliche mikroskopischen Untersuchungen von *F. graminearum*-Transformanten wurden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop *CLSM 780* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und der *ZEN 2010* Software durchgeführt. Hierbei wurde insbesondere der Aufbau der pilzlichen Zellwand analysiert. Dazu wurden die verschiedenen Polysaccharide mit unterschiedlichen Fluorophoren angefärbt und mit den in der nachfolgenden Tabelle aufgelisteten Extinktions- und Emissionswellenlängen detektiert.

Tabelle 2-8: Verwendete Fluorophore am CLSM sowie deren Zielstrukturen und Extinktions- und Emissionswerte.

Fluorophor	Zielstruktur	Extinktion (nm)	Emission (nm)
ABF (Aniline Blue Fluorochrome, Biosupplies Australia)	(1,3)- β -Glucan	390	480
WGA-CF TM 488A (Wheat Germ Agglutinin, Biotium, CA, USA)	Chitin	490	515
Con A- CF TM 594 (Concanavalin A, Biotium, CA, USA)	Mannoproteine	593	614
GFP	Fusion mit FgGSL1	488	525
mCherry	Fusion mit FgGSL1	561	680

Die Farbstoffe wurden nach Herstellerangaben und den empfohlenen Konzentrationen angewandt. Eine 10-minütige Inkubation je Fluorophor und ein anschließender Waschschrift mit 20 mM TRIS-HCl (pH 7,5) wurden vorgenommen. Zur Fixierung der Proben wurde 0,2 % Agarose eingesetzt.

2.2.12. Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$

Die *F. graminearum*-Transformante $\Delta pk1$ (FGSG_05845, Serin/Threonin Proteinkinase gad8) wurde von Dr. Christian Voigt generiert und mittels molekularbiologischer Untersuchungsmethoden, wie PCR und Southern Blot, bestätigt. Weitere biologische Charakterisierungen, wie das Wachstum auf Vollmedien und die Virulenz auf Weizenähren, wurden von der technischen Assistentin Cathrin Kröger durchgeführt. Diese Ergebnisse wurden zur lückenlosen Beschreibung der Mutante in diese Arbeit aufgenommen.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde der Fokus auf die blasenartigen Strukturen des wachsenden Pilzmyzels der Deletionsmutante gelegt. Diese wurden bereits vor einigen Jahren von Dr. Christian Voigt entdeckt und sollten nun hinsichtlich Zellwandveränderungen und strukturellem Zellwandaufbau analysiert werden.

Zunächst wurde das Hyphenwachstum mikroskopisch untersucht und dokumentiert (siehe 2.2.8. Untersuchung der Auskeimungsfähigkeit und des Hyphenwachstums). Ein besonderer Fokus galt dabei der Bildung und dem Aufplatzen der blasenartigen Strukturen. Diese sollten näher analysiert werden. Dazu wurde flüssiges CM-Medium (Tab. 2-7) mit $\Delta pk1$ -Konidien beimpft und 5 Stunden schüttelnd bei 28 °C inkubiert. Diese ausgekeimten Pilzkulturen wurden anschließend auf ein Objektträger überführt und wie unter 2.2.8. beschrieben über Nacht dokumentiert. Der untransformierte *F. graminearum*-Wildtyp 8-1 diente als Kontrolle und wurde ebenfalls unter den eben beschriebenen Bedingungen mitgeführt.

Eine Expressionsanalyse essentieller Gene zum Zellwandaufbau, wie die (1,3)- β -Glucansynthase und Chitinsynthasen, sollte zeigen, ob ein verändertes Expressionsniveau auf Transkriptionsebene verglichen zum Wildtyp-Stamm 8-1 vorliegt. Hierzu wurden 30.000 Konidien der Deletionsmutante und des Wildtyps in 30 ml CM-Medium in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Falcon) angeimpft. Diese Kulturen wurden horizontal auf einen Schüttler befestigt und für 24 Stunden bei 28 °C und 140 rpm inkubiert. Somit konnte ein gleichmäßiges Myzelwachstum gewährleistet und die Bildung von unerwünschtem Luftmyzel verhindert werden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Myzel, wie unter 2.2.6. beschrieben, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die cDNA-Synthese sowie die anschließend durchgeführte qPCR wurden unter denselben

Bedingungen, wie bereits für die *GSL1*-Mutanten beschrieben, durchgeführt (siehe 2.2.6. und 2.2.7.). Das Expressionsmuster wurde von zwei unabhängigen $\Delta pk1$ -Mutanten in drei biologischen Replikaten untersucht.

Des Weiteren wurde $\Delta pk1$ einer Zellwandanalyse unterzogen (siehe 2.2.10.). Hierzu wurden die Konidien in YPD-Flüssigmedium (Tab. 2-7) angeimpft und das gewachsene Pilzmyzel, wie oben beschrieben, aufgearbeitet. Die Messung der Monosaccharide erfolgte ebenfalls an der HPLC mit demselben Programm und Versuchsbedingungen. Es wurden zwei unabhängige Deletionsmutanten analysiert. Zum Vergleich der erhaltenen Ergebnisse diente der Wildtypstamm 8-1.

Abschließend wurde die Deletionsmutante mikroskopisch untersucht. Dazu wurde unter anderem das konfokale Laserscanning-Mikroskop genutzt (siehe 2.2.11.). Hierbei wurden insbesondere die blasenartigen Strukturen dokumentiert. Dafür wurden die drei Hauptzellwandbestandteile, (1,3)- β -Glucan, Chitin und Mannoproteine, wie oben beschrieben visualisiert.

Zusätzlich wurden die blasenartigen Strukturen im Transmissionselektronenmikroskop (kurz TEM) dokumentiert. Am Standort des Biozentrums Klein Flottbek bestand die Möglichkeit die Deletionsmutante $\Delta pk1$ an einem TEM des Modells *LEO 906 E* (LEO, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet mit einer MultiScan CCD-Kamera (Modell 794) von Gatan (München, Deutschland) unter der Verwendung der Software *Digital Micrograph Version 2.02* von Gatan zu untersuchen. Hierbei sollten hochauflösende Aufnahmen der Zellwand sowie der Ultrastrukturen der Blasen generiert werden. Die Bilder wurden bei 100 kV aufgenommen. Die Probenaufbereitung und Bedienung des TEM wurde stets von der technischen Assistentin Elke Wölken (Biozentrum Klein Flottbek, AG Aquatische Ökophysiologie und Phykologie) durchgeführt. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper und anschließender Immunogoldmarkierung konnten Zellwandpolymere detektiert und vergleichend zum Wildtyp dargestellt werden. Untersuchungsobjekt waren 24 Stunden Proben von $\Delta pk1$ sowie 8-1. Diese wurde mit 4 % Paraformaldehyd (Merck kGaA, Darmstadt, Deutschland) und 0,5 % Glutaraldehyd (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 50 mM Cacodylat-Puffer pH 7,0 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) für 30 min fixiert. Eine 2-stündige Inkubation auf Eis schloss sich an (nach Kleemann *et al.*, 2012). Anschließend wurden die Proben dreimal in 50 mM Cacodylat-Puffer pH 7,0 gewaschen (Zentrifugation

bei 1500 rpm, 90 Sekunden, 4 °C) und in 2 % Agar Agar, gelöst in 50 mM MSB-Puffer, (Merck kGaA, Darmstadt, Deutschland) eingebettet. Es folgte eine weitere Fixierung mittels 0,25 % Osmiumtetroxid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) in 50 mM Cacodylat-Puffer pH 7,0 für eine Stunde im Eisbad. Danach wurden die Kulturen erneut dreimal mit 50 mM Cacodylat-Puffer pH 7,0 gewaschen und über Nacht im Kühlschrank gelagert. Am Folgetag wurden die fixierten Proben schrittweise mit steigender Ethanolkonzentration entwässert. Die Inkubationszeit je eingesetzte Lösung betrug 20 min und wurde auf Eis durchgeführt. Beginnend mit 30 %iger Ethanollösung, über 50 %, 70 %, 90 % bis schließlich 100 % Ethanol wurde die Entwässerung durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine LR White Infiltration (LR White Resin Medium grade Acryl Resin, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland). Hierfür wurde Ethanol mit dem Harz gemischt, beginnende im Verhältnis 2:1, über 1:1 und schließlich 1 Teil Ethanol und 2 Teile LR White-Harz, und für je 60 min zusammen mit dem Pilzmyzel inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Kulturen in 100 % LR White überführt. Am nächsten Tag wurde das LR White-Harz einmal gewechselt und die Proben in Gelatine kapseln eingebettet. Die Polymerisation fand in einer sauerstofffreien Atmosphäre (Gelatine kapsel) bei Raumtemperatur für 2 Stunden, gefolgt von einer 36-stündigen Inkubation bei 50 °C, statt. Die auspolymerisierten Gelatineblöcke wurden im Folgenden mit einem Diamantenmesser (Modell MA 755 von Diatome AG mit einem Messerwinkel von 45°, Nidau, Schweiz) in 70- 80 nm dicke Ultradünnschnitte am Ultramikrotom *Ultracut E* (Reichert-Jung, Nußloch, Deutschland) geschnitten. Diese wurden anschließend auf Mowital-coated Nickel Grids (Stork Veco B.V., Eerbeek, Niederlande) aufgenommen. Letztere wurden für die anstehende Immunogoldmarkierung auf einen Tropfen 50 mM MSB für 30 min inkubiert. Zur Markierung des pilzlichen Zellwandpolymers Chitin wurden die Grids auf einen Tropfen WGA-CFTM488A (Tab. 2-8) mit einer Konzentration von 100 ng/ ml für 15 min gelegt. Das Fluorophor, welches auch am CLSM eingesetzt wurde, bindet in dieser Zeit an das Chitin. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 50 mM MSB-Lösung. Bevor der Anti-WGA-Antikörper (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) zum Einsatz kam, wurden die freien Bindungsstellen mit 3 % BSA, versetzt mit 0,2 % BSA-CTM [AURION] (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland), in MSB-Buffer für 30 min geblockt. Daraufhin wurden die Grids auf einen Tropfen Erstantikörper mit einer Verdünnung von 1:4000 für 60 min inkubiert. Diese wurden dreimal mit 1 % BSA, versetzt mit 0,07 % BSA-CTM [AURION], in MSB-Lösung gewaschen. Danach wurden die Grids in einem Tropfen Anti-Rabbit IgG Antikörper gekoppelt mit 10 nm großen

Goldpartikeln (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis, MO, USA) und einer Verdünnung von 1:200 für 60 min inkubiert. Anschließend erfolgten wiederum drei Waschschriffe mit 50 mM MSB-Lösung. Eine Nachfixierung mit 1% Glutaraldehyd in ddH₂O für 10 min schloss sich an. Die Proben wurden daraufhin dreimal mit ddH₂O gewaschen und einer Nachkontrastierung mit 2 % Uranylacetat Dihydrat (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 10 Sekunden unterzogen. Nun wurden die Grids viermal mit ddH₂O gewaschen. Eine zweite Nachkontrastierung mit 0,2 % Bleicitrat für 15 Sekunden folgte. Bevor die Proben am TEM analysiert werden konnten, mussten sie abschließend viermal gründlich mit ddH₂O gewaschen werden. Ebenso wie die eben erläuterte Immunogoldmarkierung des Chitins wurde in weiteren Schnittserien der Deletionsmutante und des Wildtyps das (1,3)- β -Glucan in der pilzlichen Zellwand visualisiert. Dafür wurden die Ultradünnschnitte mit dem Anti-(1,3)- β -Glucan Antikörper (Biosupplies Australia, Australien) in einer Verdünnung von 1:500 für 60 min inkubiert. Die folgenden Waschschriffe, BSA-Behandlung und die Inkubation mit dem sekundären Gold-gekoppelten Antikörper erfolgten wie vorab beschrieben.

Eine weitere hochauflösende fluoreszenzbasierte Mikroskopiemethode, die sogenannte direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (*dSTORM*; Heilemann *et al.*, 2008), wurde zur genaueren Analyse des Zellwandaufbaus der Deletionsmutante $\Delta pk1$ angewandt. Zelluläre Strukturen in lebenden Organismen können hierbei mit Standardfluoreszenzfarbstoffen (Tab. 2-8) visualisiert werden. Farbstoffe und auch Fluoreszenzproteine müssen die Eigenschaft des „reversiblen Photoblinkens“ besitzen, das heißt sie können zwischen einem fluoreszierenden „an“- und einem nicht fluoreszierenden „aus“-Zustand wechseln (van de Linde und Sauer, 2010). Nimmt man eine Zeitserie mit mindestens 5000 Einzelbildern der blinkenden Fluorophore auf, können aus dieser Zeitserie die Positionen der Fluorophore mittels geeigneter Computersoftware sehr genau (im Nanometerbereich) bestimmt werden. Aus der Summe aller Positionskoordinaten lässt sich ein hochaufgelöstes fluoreszenzmikroskopisches Bild rekonstruieren (Eggert *et al.*, 2015). Diese Mikroskopiemethode wurde in Zusammenarbeit mit dem Heinrich-Pette-Institut – Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie (Hamburg, Deutschland) von Dr. Dennis Eggert durchgeführt. Dazu wurden $\Delta pk1$ - und 8-1-Kulturen in CM-Flüssigmedium (Tab. 2-7) angezogen und wie unter 2.2.11. beschrieben mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen inkubiert. Die Aufnahmen wurden an einem Nikon *N-STORM* Super-Resolution-Mikroskop (Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland) ausgestattet mit einem Apo TIRF 100-fachem Öl-Immersion-Objektiv (Nikon GmbH, Düsseldorf,

Deutschland), einer EMCCD Kamera (engl. Electron Multiplying Charge-Coupled Device) des Modells *iXon+ DU-897* (Andor Technology Plc, Belfast, UK), einem Quad-Band Filter bestehend aus einem Quadline Laser-Strahlenteiler (zt405/488/561/640rpc TIRF, Chroma Technology Corporation, Bellows Falls, VT, USA) sowie einem Quadline Emissionsfilter (brightline HC 446, 523, 600, 677, Semrock, Inc., Rochester, NY, USA) angefertigt (Eggert *et al.*, 2014). Zur Anregung des Anilinblau-Farbstoffs wurde ein 100 mW 405 nm Diodenlaser (CUBE 405-100C, Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA) angewandt. Das Chitinnetzwerk der pilzlichen Zellwand konnte durch das Lektin WGA Alexa Fluor[®] 647 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) markiert und mittels eines 300 mW 647 nm optisch gepumpten Faserlasers (MPB Communications Inc., Montréal, Kanada) angeregt werden. Durch den Einsatz verschiedener Laser war es möglich die zwei verwendeten Fluorochrome in einer Aufnahme darzustellen. Dazu wurden die Laser mithilfe eines AOTF (engl. acousto-optic tunable filter) wechselseitig ein- und ausgeschaltet. Die Rekonstruktion der hochaufgelösten Mikroskopiebilder erfolgte durch das Verarbeiten von 12.500- 25.000 Weitfeld-Fluoreszenzbildern unter der Verwendung des *N-STORM Analysis* Module (v. 3.4.0.17504) der *NIS Elements AR Software* (v. 4.30.01, Laboratory imaging s.r.o., Prag, Tschechische Republik).

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung generierter GSL1-Mutanten

In der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit steht das Zellwandpolymer (1,3)- β -Glucan des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* im Fokus. Diese Zuckerverbindung übernimmt als Hauptbestandteil der Zellwand eine essentielle Rolle im Lebenszyklus filamentöser Pilze (Bartnicki-Garcia, 1968; Latgé, 2007; Pérez und Ribas, 2013) und wird von dem Enzym (1,3)- β -Glucansynthase synthetisiert. Trotz der beachtlichen Bedeutung ist bisher nur wenig über die Funktion und Regulation von pilzlichen (1,3)- β -Glucansynthasen bekannt. Im Gegensatz zu Pflanzen und Hefen besitzt die Mehrzahl filamentöser Pilze nur ein einziges Gen zur Expression der (1,3)- β -Glucansynthase (Latgé, 2007; Ha *et al.*, 2006; Oliveira-Gracia und Deising, 2013). Nach derzeitigem Stand scheint die Generierung einer entsprechenden Deletionsmutante als unmöglich (Tentler, 1997; Beauvais *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2006). Eine umfassende Charakterisierung dieses Zellwand-Strukturproteins sollte im Zuge der Doktorarbeit durchgeführt werden.

Zunächst war das Ziel, die *F. graminearum* eigene (1,3)- β -Glucansynthase mit einem fluoreszierenden Protein zu fusionieren, um Lokalisationsstudien des Zielproteins unter verschiedenen Umweltbedingungen, wie osmotischer Stress, Hitze- und Kältestress und während einer Pflanzeninfektion, durchführen zu können. Des Weiteren ermöglicht die Generierung dieses Fusionsproteins die Etablierung einer effizienten Aufreinigungsmethode unter nativen Bedingungen. Somit wäre die Grundlage für eine ausführliche biochemische Charakterisierung geschaffen. Die erworbenen Ergebnisse sollten abschließend mit der bereits gut beschriebenen pflanzlichen (1,3)- β -Glucansynthase PMR4 aus *A. thaliana* (Ellinger und Voigt, 2014; Ellinger *et al.*, 2014; Vogel und Somerville, 2000; Ellinger und Naumann, 2013) verglichen werden.

Im Laufe der Doktorarbeit wurden verschiedene Fusionskonstrukte der (1,3)- β -Glucansynthase mit den fluoreszierenden Proteinen GFP und mCherry kloniert und in *F. graminearum* über homologe Rekombination transformiert. Keine, der als positiv bestätigten Mutanten, wies ein Fluoreszenzsignal auf. Jedoch konnten phänotypische Veränderung, besonders in Bezug auf das Hyphenwachstum und der Morphologie der Konidien, beobachtet werden. Aufgrund dieser unerwarteten Erkenntnisse, wurden die

generierten Mutanten einer umfassenden Charakterisierung unterzogen. Die erhaltenen Ergebnisse werden in den folgenden Unterkapiteln detailliert dargestellt und erläutert.

3.1.1. Generierung und molekularbiologische Charakterisierung der GSL1-Fusionskonstrukte

Zur Identifizierung des Gens, welches für die (1,3)- β -Glucansynthase des filamentösen Pilzes *F. graminearum* exprimiert, wurde die Datenbank *Broad Institute: Fusarium Comparative Database* verwendet. Im PH-1-Hintergrund konnte ein Gen mit der Beschreibung „(1,3)-beta-glucan synthase component GLS2“ und dem Locus FGSG_07946.3 identifiziert werden (Stand 02/16). Dieses Gen wird im Folgenden *FgGSL1* (*F. graminearum* *G*lucan *S*ynthase *L*ike *1*) genannt. Weiterhin wurden bioinformatische Analysen dieser putativen (1,3)- β -Glucansynthase mit der Datenbank *NCBI (National Center of Biotechnology Information; Bethesda, MD, USA)* durchgeführt. Es konnten zwei konservierte Domänen, nämlich die (1,3)-beta-glucan synthase subunit *FKS1* und die (1,3)-beta-glucan synthase component, identifiziert werden. Diese essentiellen Sequenzen konnten auch in (1,3)- β -Glucansynthasen weiterer Organismen (Douglas *et al.*, 2001; Ha *et al.*, 2004) lokalisiert werden. Die Proteinsequenz der *FgGSL1* wurde darüber hinaus in der Datenbank *SMART: Simple Modular Architecture Research Tool (EMBL, Heidelberg)* analysiert. Demnach ist *FgGSL1* ein integrales Membranprotein bestehend aus einer N- und C-terminalen Transmembrandomäne mit insgesamt 16 Transmembranhelices (Ergebnisse aus *THMM2* Analyse). Getrennt werden diese beiden Domänen durch einen zytoplasmatisch lokalisierten Bereich, welcher als katalytische Einheit beschrieben wird (Beauvais *et al.*, 2001; Douglas *et al.*, 2001; Pérez und Ribas 2013). Diese bioinformatischen Erkenntnisse stimmen mit der allgemein bekannten Proteinstruktur von (1,3)- β -Glucansynthasen überein, weshalb die identifizierte *FgGSL1*-Sequenz zur Generierung und Charakterisierung von Fusionskonstrukten verwendet wurde. Um Lokalisationsstudien der (1,3)- β -Glucansynthase in *F. graminearum* durchführen zu können, bedarf es einer Fusion des Zielproteins mit einem fluoreszierenden Anhängsel. Daher wurde *FgGSL1* am C-Terminus mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) unter Anwendung des Hefe-Rekombinationssystems fusioniert und mithilfe eines doppelten Crossingover-Ereignisses homolog ins *F. graminearum*-Genom integriert (Abb. 3-1 A). Zur Klonierung wurde der Vektor *pRS426* verwendet. Die komplette genomische Sequenz der *FgGSL1* wurde amplifiziert und zusammen mit dem *GFP*-Fragment und der

Hygromycin-Resistenzkassette in den Hefestamm *FY834* kotransformiert. Zur homologen Integration in den Genlokus von *FgGSL1* wurden flankierende Bereiche des nativen Promotors (P_{nativ} , Abb. 3-1 A) sowie des 3' untranslatierten Bereichs (3' *UTR*, Abb. 3-1 A) genutzt. Diese spezifischen Sequenzen ermöglichen den Austausch des nativen Gens durch das Fusionskonstrukt (Abb. 3-1, gestrichelte Linien). Die eingebrachte Hygromycin-Kassette (Hyg^R , Abb. 3-1 A) diene zur Selektion von Primärtransformanden.

Erhaltene Mutanten wurden mittels PCR auf eine homologe Integration des Fusionskonstruktes überprüft. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass sowohl in den Transformanden als auch im Ausgangsstamm PH-1 ein PCR-Produkt generiert wird. Diese Fragmente unterscheiden sich in ihrer Länge, aufgrund des eingefügten GFP und der Hyg-Kassette (Abb. 3-1 A (Pfeilspitzen) und B). Lediglich eine positive Transformande (*GSL1-GFP A-1*) konnte unter etwa 90 erhaltenen Primärtransformanden identifiziert werden. Diese Mutante und eine weitere ektopische Integration wurden einer Southern Blot Analyse unterzogen. Dafür wurde die mit *HindIII*-restringierte genomische DNA beider Mutanten und des Wildtyps PH-1 elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Zum Nachweis der Integration des gewünschten Konstruktes kam eine PCR-Sonde zum Einsatz, die in der kodierenden Sequenz des Hygromycins bindet (Abb. 3-1 A). Aufgrund des Schnittmusters von *HindIII* wurde für die Mutante *GSL1-GFP A-1* eine Bande von 4475 bp erwartet und auch detektiert. In der Spur des Wildtyps PH-1 konnte keine Bande nachgewiesen werden. Die ektopisch integrierte Mutante wies zwei Integrationen des Zielkonstruktes, jedoch außerhalb des *FgGSL1*-Lokus, auf (Abb. 3-1 C). Nachdem die Mutante *A-1* im PCR-Nachweis und auch im Southern Blot als positiv befunden wurde, erfolgte eine mikroskopische Untersuchung in Hinblick auf die GFP-Fluoreszenz. Entgegen der Erwartung konnte kein Fluoreszenzsignal beobachtet werden (nicht gezeigt). Aus diesem Grund sollte nun überprüft werden, ob das Fusionskonstrukt *FgGSL1-GFP* transkribiert wurde. Hierfür wurde die RNA aus Pilzmyzel der *GSL1-GFP A-1* isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR konnte die Expression von *FgGSL1-GFP* nachgewiesen werden. Die parallel durchgeführte PCR zur Amplifikation des β -*Tubulins* diene einerseits zur qualitativen Kontrolle der synthetisierten cDNA und andererseits zum Nachweis der eingesetzten cDNA von PH-1, da für diese Probe in der Nachweis-PCR kein Amplikon erwartet wurde. Die elektrophoretische Auftrennung zeigte nur in der Spur von *A-1* ein 700 bp großes Fragment und erwartungsgemäß keines bei PH-1. In beiden Proben wurde ein Amplikon des β -*Tubulins* detektiert (Abb. 3-1 D).

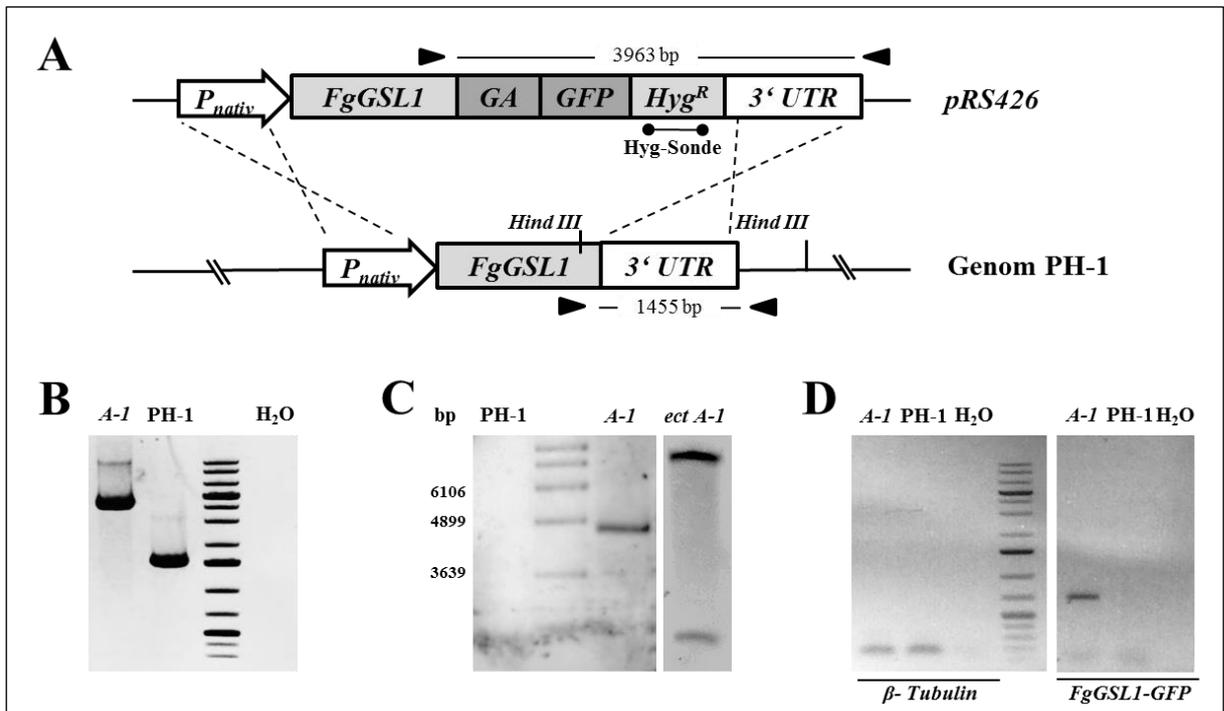


Abbildung 3-1: Generierung der *GSLI-GFP A-1* Mutante mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstrukts.

A Schematische Darstellung der C-terminalen GFP-Fusion der (1,3)-β-Glucansynthase *FgGSL1*. Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte im Plasmid *pRS426* mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Es erfolgte eine homologe Integration des Fusionskonstrukts *FgGSL1-GFP* in das *F. graminearum*-Genom PH-1. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*Hyg^R*) dient zur Selektion der Transformanden.

B PCR-Nachweis der homologen Rekombination des nativen *FgGSL1*-Lokus in erhaltenen Transformanden. Dazu wurden die Primer C-GFP_intergr_fwd und C-GFP_intergr_rev (siehe A: Pfeilspitzen, Primersequenzen in Tab. 2-3) generiert. Die unterschiedlichen Größen der erhaltenen PCR-Fragmente (*A-1*: 3963 bp, PH-1: 1455 bp) beweisen die Integration von *FgGSL1-GFP* in den nativen Genloкус.

C Southern Blot Analyse positiver Transformanden. Hierfür wurde die mit *HindIII*-restringierte genomische DNA von PH-1 und *GSLI-GFP A-1* und einer ektopischen Mutante (*ect A-1*) mit einer Hyg-Sonde (siehe A) hybridisiert. In der *GSLI-GFP A-1* Mutante konnte eine Bande von 4475 bp detektiert werden. PH-1 weist kein Signal auf, die ektopische Integration zwei.

D Nachweis der Expression des Fusionskonstrukts *FgGSL1-GFP* auf Transkriptionsebene in der *GSLI-GFP A-1* Mutante. *β-Tubulin* dient zur qualitativen Kontrolle der generierten cDNA. Amplikon *β-Tubulin*: 120 bp; *FgGSL1-GFP*: 700 bp (Primer: C-GFP_cDNA_fwd/ C-GFP_cDNA_rev, Tab. 2-4).

Demnach war der Nachweis von *FgGSL1-GFP* erfolgreich, was vermuten lässt, dass die Ursache für die ausbleibende GFP-Fluoreszenz auf Proteinebene zu finden ist.

Aufgrund der niedrigen Transformationsrate (eine positive Mutante unter 90 Primärtransformanden) wurde eine weitere Klonierungsstrategie zur Generierung von *GSLI-GFP*-Mutanten angewandt. Der Unterschied zur zuvor erläuterten Methode bestand darin, dass nicht die gesamte annotierte genomische Sequenz von *FgGSL1* (ca. 6 kb) amplifiziert und kloniert wurde, sondern nur ein Fragment von 3 kb. Dies sollte die Klonierungs- und Transformationsrate erheblich erhöhen. Als Ergebnis sollte eine

C-terminale Fusion des GFP an FgGSL1 erreicht werden (Abb. 3-2 A), die der erfolgreichen Strategie zur Fluoreszenz-Markierung der (1,3)- β -Glucansynthase im Maispathogen *C. graminicola* entspricht (Oliveira-Garcia und Deising, 2013).

Zur Klonierung des verkürzten *FgGSL1-GFP*-Konstrukts wurde wiederum der Vektor *pRS426* und auch die Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion von Transformanden eingesetzt. Die flankierenden Sequenzen zur homologen Integration in den nativen *FgGSL1*-Genlokus bestanden einerseits aus einem 1 kb Fragment von *FgGSL1* und andererseits aus dem 3' *UTR* (Abb. 3-2 A). Diese für die Transformation essentiellen Bereiche wurden im Vergleich zur ersten Klonierungsstrategie vergrößert, wodurch die Transformationsrate erhöht werden sollte (mündliche Mitteilung von Birgit Haderler, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek). Die Hefe-Rekombinationsklonierung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Nachdem die Protoplasten-Transformation von *F. graminearum* vollzogen war, wurden die Primärtransformanden mittels PCR auf eine homologe Integration untersucht. Es konnten 12 positive Mutanten identifiziert werden. Im Folgenden wurden zwei, nämlich *GSL1-GFP B-1* und *B-2*, näher charakterisiert. Der Nachweis auf homologe Integration und auch die Southern Blot Analyse erfolgten unter denselben Bedingungen und Vorgehensweisen, wie bereits vorab beschrieben. Der PCR-basierte Integrationsnachweis (Abb. 3-2 B) zeigte ein 3963 bp Fragment für die *GSL1-GFP B-1* und *B-2* Mutanten und ein kleineres 1455 bp Fragment für PH-1. Die Bindestellen der verwendeten Primer und Größe der erwarteten PCR-Produkte sind in der Abbildung 3-2 A schematisch dargestellt (schwarze Pfeilspitzen). Die durchgeführte Southern Blot Analyse ergab unter der Verwendung der Hygromycin-Sonde je eine 4475 bp große Bande für *GSL1-GFP B-1* und *B-2*, keine Bande in der Wildtyp-Spur und eine Bande von etwa 6,5 kb für die ektopisch integrierte Mutante *ect B* (Abb. 3-2 C). Demnach liegt bei den getesteten Mutanten *B-1* und *B-2* eine Einfachintegration des Zielkonstruktes im gewünschten Genort vor. Auch diese Mutanten wurden hinsichtlich einer GFP-Fluoreszenz mikroskopisch untersucht. Jedoch konnte keine Fluoreszenz beobachtet werden (nicht gezeigt). Daher wurde, wie bereits für die Mutante *GSL1-GFP A-1* beschrieben, RNA von den Stämmen *B-1* und *B-2* isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR der Nachweis des Fusionskonstruktes *FgGSL1-GFP* durchgeführt. Ein Transkript von 700 bp konnte nachgewiesen werden (Abb. 3-2 D). Die molekularbiologischen Charakterisierungen der Mutanten *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2* bestätigten eine homologe Einfachintegration im nativen *FgGSL1*-Lokus. Zudem wurde der Nachweis der Genexpression des Fusionskonstruktes *FgGSL1-GFP* erbracht,

jedoch in keiner Mutante ein GFP-Signal detektiert, wodurch keine Lokalisationsstudien vorgenommen werden konnten. Ursache hierfür könnte eine unzureichende Translation bzw. posttranslationale Modifikationen des Fusionsprodukts oder des GFP-Tags sein. Daher wurde im Folgenden eine N-terminale Fusion des GFP an FgGSL1 angestrebt (Abb. 3-3 A). Die Klonierungsstrategie und Selektion von Primärtransformanden beruhte dabei auf demselben Prinzip, wie zuvor für die C-terminale Fusion beschrieben. Nach erfolgreicher Transformation konnten acht homolog integrierte Primärtransformanden identifiziert werden, von denen zwei Mutanten molekularbiologisch analysiert wurden.

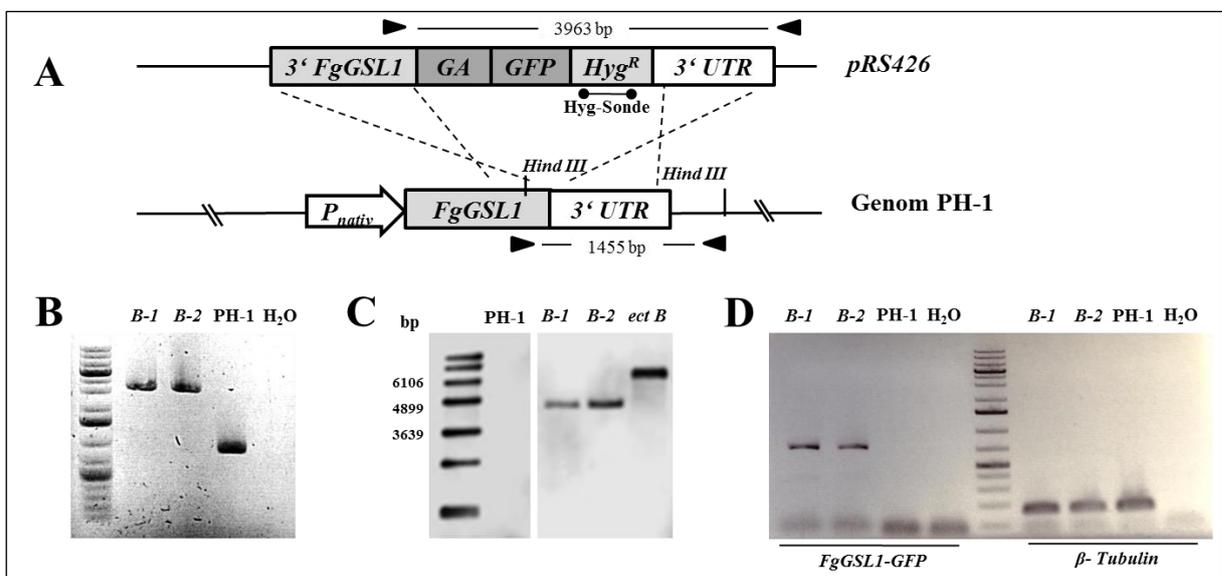


Abbildung 3-2: Generierung der *GSLI-GFP B-1* und *B-2* Mutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstrukts.

A Schematische Darstellung der C-terminalen GFP-Fusion der (1,3)- β -Glucansynthase FgGSL1 mittels homologer Integration des Fusionskonstrukts *FgGSL1-GFP* in das *F. graminearum*-Genom PH-1 am nativen Genlocus (gestrichelte Linien). Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte im Plasmid *pRS426* mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*Hyg^R*) dient zur Selektion der Transformanden.

B PCR-Nachweis der homologen Rekombination des nativen *FgGSL1*-Lokus in erhaltenen Transformanden. Dazu wurden die Primer C-GFP_integr_fwd und C-GFP_integr_rev (A, Pfeilspitzen, Tab. 2-3) eingesetzt. Die unterschiedlichen Größen der erhaltenen PCR-Fragmente (*B-1*/*B-2*: 3963 bp, PH-1: 1455 bp) zeigen die Integration von *FgGSL1-GFP* in den nativen Genlocus.

C Southern Blot Analyse positiver Transformanden. Hierfür wurde die mit *HindIII*-restringierte genomische DNA von PH-1, *GSLI-GFP B-1*/*B-2* sowie einer ektopischen Mutante (*ect B*) mit einer Hyg-Sonde (A) hybridisiert. In den *GSLI-GFP B-1* und *B-2* Mutanten wurde je eine Bande von 4475 bp detektiert. PH-1 weist kein Signal auf. Die ektopische Integration zeigt eine Bande mit einer Größe von etwa 6,5 kb.

D Nachweis der Expression des Fusionskonstrukts *FgGSL1-GFP* auf Transkriptionsebene in der *GSLI-GFP B-1* und *B-2* Mutante. β -Tubulin dient zur qualitativen Kontrolle der generierten cDNA. Amplikon β -Tubulin: 120 bp; *GSLI-GFP*: 700 bp (Primer: C-GFP_cDNA_fwd/ C-GFP_cDNA_rev, Tab. 2-4).

Die Nachweis-PCR zur homologen Integration zeigte je eine Bande von 2650 bp und der Wildtyp PH-1 eine kleineres 1950 bp-Fragment (Abb. 3-3 B). Der dabei erhaltene Größenunterschied zwischen den Mutanten *GFP-GSL1 C-1* sowie *C-2* und PH-1 resultiert aus dem eingefügten GFP (Abb. 3-3 A: Pfeilspitzen visualisieren Bindestellen der generierten Primer). Zur Bestimmung der Häufigkeit an Integrationen im *F. graminearum*-Genom wurde eine Southern Blot Analyse mit den positiv getesteten Transformanden *C-1* und *C-2*, dem Wildtyp und einer ektopischen Integration (*ect C*) durchgeführt (Abb. 3-3 C). Die mit *HindIII*-restringierte genomische DNA wurde mit einer Hygromycin-Sonde (Abb. 3-3 A) hybridisiert. Es wurde eine Bande für *GFP-GSL1 C-1* und *C-2* in der berechneten Größe von 5956 bp, wie erwartet kein Signal in der Wildtyp-Spur und drei stringente Banden unterschiedlicher Größe in der ektopischen Mutante detektiert (Abb. 3-3 C). Zur weiteren mikroskopischen Analyse wurden die Mutanten *GFP-GSL1 C-1* und *C-2* mit einer Einfachintegration des Fusionskonstruktes im nativen Genlokus ausgewählt. Auch hier konnte keine membranlokalisierte GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Auch die nachfolgende Anzucht dieser Mutanten in verschiedenen Medien und Lösungen zur putativen GFP-Fluoreszenzinduktion waren nicht erfolgreich (nicht gezeigt). Parallel dazu wurde die Expression von *GFP-FgGSL1* auf Transkriptionsebene analysiert. Die generierten Primer amplifizierten ein Produkt von 700 bp, welches in den Mutanten *GFP-GSL1 C-1* und *C-2*, jedoch nicht in PH-1 nachgewiesen wurde (Abb. 3-3 D).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchung von *C-1* und *C-2* die gewünschte homologe Einfachintegration und transkriptionelle Expression von *GFP-FgGSL1*, jedoch keine Fluoreszenz im Anregungsspektrum des GFP. Demnach scheint GFP ungeeignet für Lokalisationsstudien der (1,3)- β -Glucansynthase FgGSL1 zu sein.

Ein letzter Versuchsansatz zur Generierung eines fluoreszierenden Fusionskonstruktes von FgGSL1 wurde unternommen, wobei das GFP durch ein mCherry ausgetauscht und an das N-terminale Ende von FgGSL1 fusioniert wurde (Abb. 3-4 A). Die Klonierungsstrategie über das Rekombinationssystem der Hefe, die Selektion der Transformanden sowie der Nachweis zur homologen Integration verliefen so, wie bereits vorab beschrieben. Es konnten zehn positiv getestete Primärtransformanden identifiziert werden (Abb. 3-4 B, nur *D-1* und *D-2* gezeigt). Im Weiteren wurden nur die Mutanten *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* untersucht.

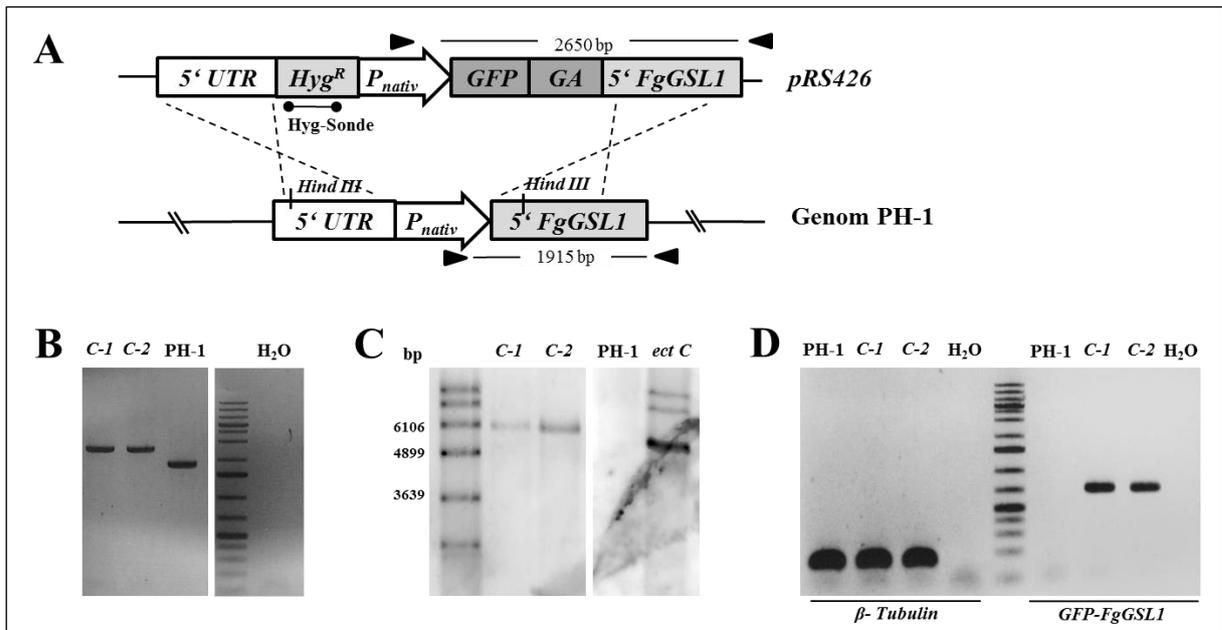


Abbildung 3-3: Generierung der *GFP-GSLI C-1* und *C-2* Mutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstruktes.

A Schematische Darstellung der N-terminalen GFP-Fusion der (1,3)-β-Glucansynthase FgGSL1. Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte im Plasmid *pRS426* mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Es erfolgte eine homologe Integration des Fusionskonstrukts *GFP-FgGSL1* in das *F. graminearum*-Genom PH-1. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*Hyg^R*) dient zur Selektion von Transformanden.

B PCR-Nachweis der homologen Rekombination des nativen *FgGSL1*-Lokus in erhaltenen Transformanden. Dazu wurden die Primer N-GFP_integr_fwd und N-GFP_integr_rev (siehe A, Pfeilspitzen) generiert. Die unterschiedlichen Größen der erhaltenen PCR-Fragmente (*C-1*/ *C-2*: 2650 bp, PH-1: 1915 bp) beweisen die Integration von *GFP-FgGSL1* in den nativen Genlokus.

C *GFP-GSLI C-1* und *C-2* wurden einer Southern Blot Analyse unterzogen. Hierfür wurde die mit *HindIII*-restringierte genomische DNA von PH-1, *GFP-GSLI C-1*/ *C-2* und einem Ektop (*ect C*) mit einer *Hyg*-Sonde (siehe A) hybridisiert. In den *GFP-GSLI C-1* und *C-2* Mutanten wurde je eine Bande von 5956 bp detektiert. PH-1 weist kein Signal auf und die ektopische Integration zeigt drei distinkte Banden unterschiedlicher Größe.

D Nachweis der Expression des Fusionskonstrukts *GFP-FgGSL1* auf Transkriptionsebene in den *GFP-GSLI C-1* und *C-2* Mutanten. *β-Tubulin* dient zur qualitativen Kontrolle der generierten cDNA. Amplikon *β-Tubulin*: 120 bp; *GFP-FgGSL1*: 700 bp (Primer N-GFP_cDNA_fwd/ N-GFP_cDNA_rev, Tab. 2-4).

Die Southern Blot Analyse ergab eine Einfachintegration der Klonierungskassette in den Mutanten *D-1* und *D-2* (Abb. 3-4 C). Die ektopische Mutante zeigte eine distinkte Bande, die größer als 8 kb war (Abb. 3-4 C), wodurch der Nachweis einer Integration des Zielkonstrukts außerhalb des nativen *FgGSL1*-Lokus im Genom erbracht wurde. Nach erfolgter molekularbiologischer Charakterisierung wurden die Mutanten *mCh-GSLI D-1* und *D-2* auf ein Fluoreszenzsignal im Anregungsspektrum von mCherry untersucht. Zur Kontrolle der korrekten mikroskopischen Einstellungen diente ein *F. graminearum*-Stamm, der das Fusionsprotein mCherry-Tubulin exprimiert (zur Verfügung gestellt von Dr. Ana Lilia Martinez-Rocha). Weder in der Mutante *mCh-GSLI D-1* noch in *D-2* konnte

ein deutliches Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran beobachtet werden (nicht gezeigt). Hingegen gelang der Nachweis von *mCherry-FgGSL1* auf Transkriptionsebene (Abb. 3-4 D).

Somit konnte gezeigt werden, dass eine potentiell unzureichende oder ausbleibende Translation bzw. posttranslationale Modifikationen des Fusionsprodukts oder des Fluoreszenz-Tags, unabhängig von der Lokalisation der Fusion und des eingesetzten Fluorophors, erfolgte.

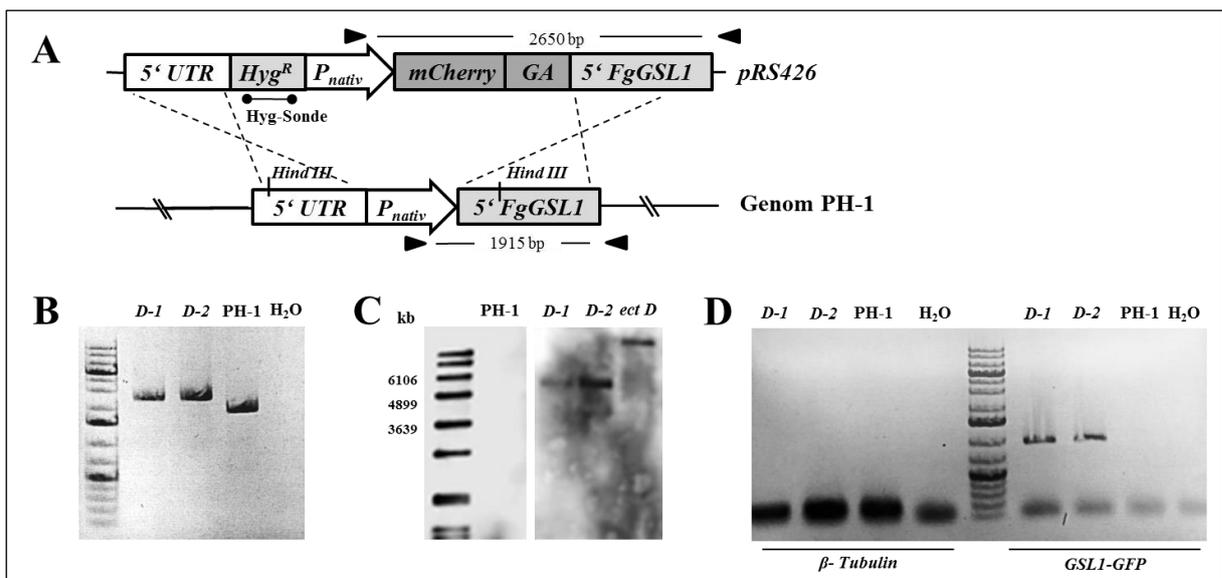


Abbildung 3-4: Generierung der *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* Mutanten mittels homologer Rekombination und molekularbiologischer Nachweis des Fusionskonstruktes.

A Schematische Darstellung der N-terminalen mCherry-Fusion der (1,3)-β-Glucansynthase FgGSL1. Die Ligation der einzelnen PCR-Fragmente erfolgte im Plasmid *pRS426* mithilfe der Hefe-Rekombinationsklonierung. Es erfolgte eine homologe Integration des Fusionskonstrukts *mCherry-FgGSL1* in das *F. graminearum*-Genom PH-1. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*Hyg^R*) dient zur Selektion von Transformanten.

B Erhaltene Transformanten konnten mittels PCR auf eine homologe Integration im nativen *FgGSL1*-Lokus untersucht werden. Dazu wurden die Primer N-GFP_integr_fwd und N-GFP_integr_rev (siehe A, Pfeilspitzen) generiert. Die unterschiedlichen Größen der erhaltenen PCR-Fragmente (*D-1*/*D-2*: 2650 bp, PH-1: 1915 bp) beweisen die Integration von *mCherry-FgGSL1* in den nativen Genlocus.

C *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* wurden einer Southern Blot Analyse unterzogen. Hierfür wurde die mit *HindIII*-restringierte genomische DNA von PH-1, *mCh-GSL1 D-1*/*D-2* und einem Ektop (*ect D*) mit einer Hyg-Sonde (siehe A) hybridisiert. In den *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* Mutanten wurde je eine Bande von 5956 bp detektiert. PH-1 weist kein Signal auf und die ektopische Integration zeigt eine distinkte Bande von mehr als 8 kb.

D Nachweis der Expression von *mCherry-FgGSL1* auf Transkriptionsebene in den *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* Mutanten. *β-Tubulin* dient zur qualitativen Kontrolle der generierten cDNA. Amplikon *β-Tubulin*: 120 bp; *mCherry-FgGSL1*: 700 bp (Primer N-mCh_cDNA_fwd/ N-GFP_cDNA_rev, Tab. 2-4).

Im Laufe der durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen fielen bei allen generierten *GSL1*-Mutanten phänotypische Veränderungen, bezüglich des Hyphenwachstums und der Morphologie von Konidien, auf. Um zu zeigen, ob diese Variationen ursächlich durch die homolog integrierten *FgGSL1*-Fusionskonstrukte hervorgerufen werden, sollte die Mutante *mCh-GSL1 D-1* wieder zum Wildtypstamm komplementiert werden.

Dazu wurde das Zielkonstrukt in den Vektor *pJet1.2* über zwei Klonierungsschritte eingebracht. Zunächst wurde das benötigte genomische Fragment von *FgGSL1* über die Schnittstellen *NotI* in den Vektor kloniert. Anschließend wurde dieser an der Restriktionsschnittstelle *MluI* geöffnet und eine Geneticin-Resistenzkassette eingebracht. Das fertige Konstrukt wurde in die Protoplasten der *mCh-GSL1 D-1* Mutante transformiert und durch ein doppeltes Crossingover-Ereignis homolog in den *mCherry-FgGSL1*-Lokus integriert (Abb. 8-1 A, Anhang). In zwei von vier erhaltenen Transformanten, *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1] E-1* und *E-2*, wurde eine homologe Integration mittels PCR nachgewiesen. Die identifizierten Mutanten hatten dabei eine Bande in derselben Größe des Wildtypen PH-1 (1915 bp), währenddessen die Ausgangsmutante *mCh-GSL1 D-1* ein Fragment in der Größe von 2650 bp zeigte (Abb. 8-1 B, Anhang). Die Transformation des Komplementationskonstrukts war somit erfolgreich.

Die auffallenden phänotypischen Veränderungen der *GSL1*-Mutanten *A-1* bis *D-2* konnten in den Komplementationsstämmen *E-1* und *E-2* nicht beobachtet werden. Dadurch kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die nichtfluoreszierenden *FgGSL1*-Fusionsproteine verantwortlich für die beobachteten Phänotypen sind. Dies soll mithilfe der folgenden Versuchsansätze genauer analysiert werden.

3.1.2. Reduziertes Wachstum der *GSL1*-Mutanten auf Vollmedium

Die Fusion von *FgGSL1* mit einem fluoreszierenden Protein (GFP oder mCherry) führte nicht zur gewünschten Fluoreszenz. Jedoch konnten Wachstumsunterschiede auf CM-Agarplatten beobachtet werden. Daher wurde eine exakte Wachstumsstudie mit allen generierten Mutanten durchgeführt.

Die Mutantenstämme wurden auf CM-Agarplatten für zwei Tage angezogen. Anschließend wurden gleichgroße kreisförmige Myzelblöcke ausgestanzt und jeweils ein Agarblock in die Mitte einer neuen, mit CM-Festmedium gefüllten, Petrischale platziert. Die Pilzkulturen wurden bei 28 °C für zwei Tage inkubiert und anschließend dokumentiert.

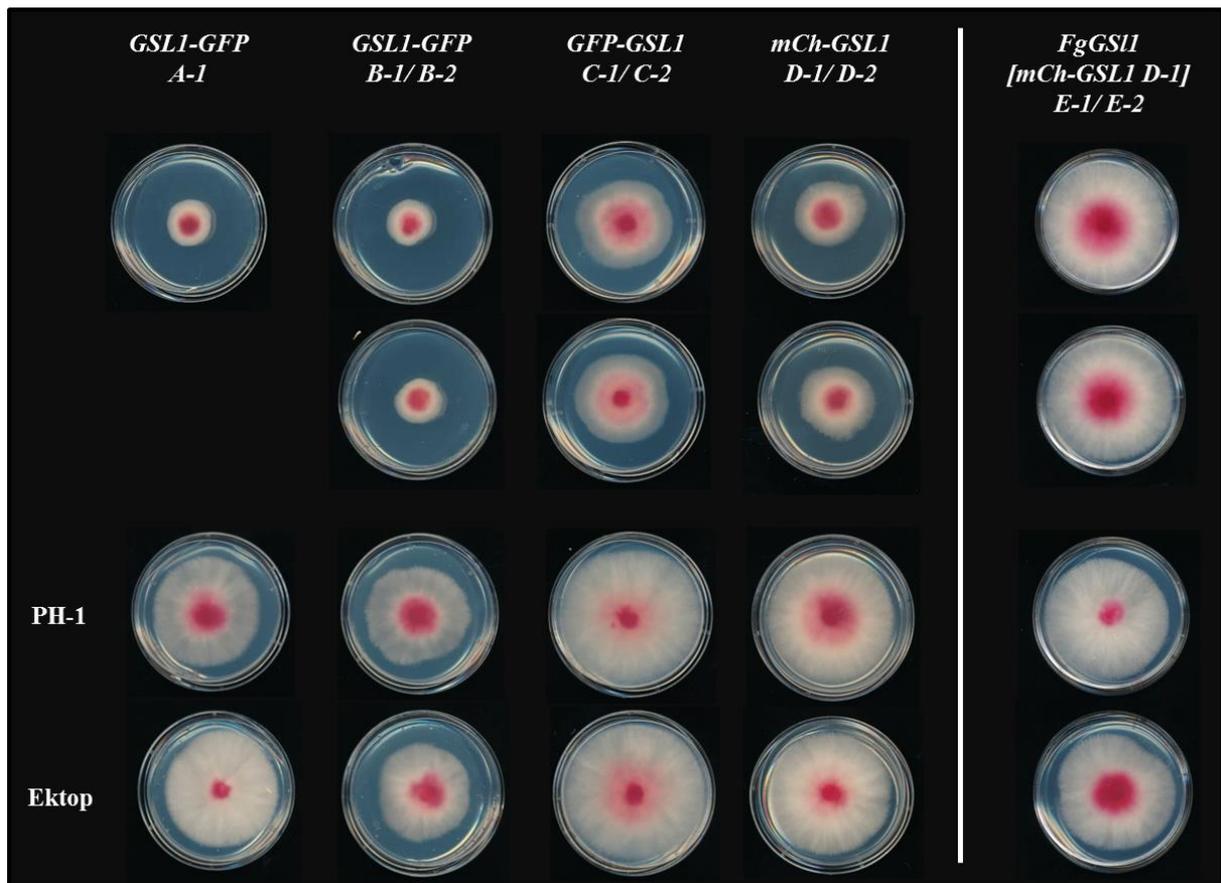


Abbildung 3-5: Hyphenwachstum der generierten *GSL1*-Mutanten auf Vollmedium.

Gleichgroße kreisrunde Myzelblöcke der untersuchten Pilzstämme wurden in die Mitte einer mit CM-Medium gefüllten Petrischale platziert. Die Platten wurden für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Dokumentation des Wachstums erfolgte mithilfe eines handelsüblichen Scanner.

Deutliche Unterschiede im Hyphenwachstum der *GSL1*-Mutanten, den dazugehörigen Ektopen sowie dem Wildtyp PH-1 waren zu verzeichnen (Abb. 3-5). Die am stärksten reduzierte Wachstumsrate wiesen die Mutanten *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2* auf. Bezogen auf PH-1 zeigten *GFP-GSL1 C-1* und *C-2* sowie *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* ein leicht verringertes Wachstum (Abb. 3-5). Demnach sind die Mutantenstämme mit den C-terminal fusionierten GFP-Konstrukten stärker in ihrem Wachstum inhibiert, als die Transformanden, die N-terminale Fusionskonstrukte tragen. Die Wachstumsraten der Komplementationsmutanten *E-1* und *E-2* glichen der von PH-1. Signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den ektopisch integrierten Mutanten wurden nicht beobachtet (Abb. 3-5).

3.1.3. Auswirkungen des fusionierten Fluoreszenzproteins auf die Morphologie der Konidien

Konidien sind ungeschlechtliche Verbreitungs- und Vermehrungsstrukturen von *F. graminearum*. Diese Sporen besitzen eine artspezifische schlanke und sichelförmige Form. Im Allgemeinen beinhalten sie fünf bis sechs Septen und sind von einer dickwandigen Zellwand umgeben (Leslie und Summerell, 2006; Seong *et al.*, 2008; Abb. 3-6 A, PH-1). Beim Vereinzeln von Konidien erhaltener Primärtransformanden fielen phänotypische Veränderungen auf. Eine mikroskopische Untersuchung und Dokumentation der Konidien aller *GSL1*-Mutanten wurde durchgeführt.

Hierzu wurden kleine Myzelagarblöcke der Mutanten, der dazugehörigen Ektopen sowie des Wildtyps in Weizen-Flüssigmedium angeimpft. Die Kulturen wurden zehn Tage schüttelnd bei 28 °C inkubiert, anschließend geerntet und mikroskopisch analysiert.

Die Morphologie der Konidien der *GSL1*-Mutanten unterscheidet sich erheblich von der des Wildtyps. Besonders auffällig waren die kleinen, aufgeblähten Strukturen der Stämme *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2*, welche nur bis zu vier Septen aufwiesen (Abb. 3-6 A). Die Transformanden mit den N-terminalen *FgGSL1*-Fusionskonstrukten (*GFP-GSL1 C-1/ C-2* und *mCh-GSL1 D-1/ D-2*) ließen bei genauer Betrachtung der Konidien nur geringe morphologische Veränderungen erkennen (Abb. 3-6 A). Hingegen konnten keine phänotypischen Unterschiede zwischen PH-1 und den Komplementationsmutanten entdeckt werden. Ebenso glichen die Sporen der ektopisch integrierten Mutanten in Größe und Form dem Wildtyp.

Neben der mikroskopischen Dokumentation wurde von jedem Stamm die Konidienlänge bestimmt und statistisch ausgewertet (Abb. 3-6 B). Wie erwartet unterschieden sich die Komplementationsmutanten *E-1* und *E-2* nicht vom Wildtyp PH-1 (Abb. 3-6 B, Gruppe a). Die Konidien der *GSL1*-Mutanten mit C-terminalem GFP waren hingegen in ihrer Länge um bis zu 60 % reduziert (*GFP-GSL1 A-1*: 27,9 µm, *B-1*: 20,1 µm und *B-2*: 22,4 µm), bezogen auf den Ausgangsstamm PH-1. Indessen war der Größenunterschied von homolog integrierten, N-terminalen Fusionskonstrukten zum Wildtyp nicht so deutlich, wobei signifikante Unterschiede zwischen den Mutanten *GFP-GSL1 C-1/ C-2* und *mCh-GSL1 D-1/D-2* mit $P < 0,05$ (Abb. 3-6 B, Gruppe b und c) ermittelt wurden (Abb. 3-6 B).

Die Analyse belegt, dass die Fusionskonstrukte im nativen *FgGSL1*-Lokus Auswirkungen auf die Morphologie der Konidien haben. Die Position des Fluoreszenzproteins trägt dabei entscheidend zur Ausprägung des Phänotyps bei. Auch das Fluoreszenzprotein an sich, scheint einen Einfluss auf die Konidienlänge zu haben, da zwischen den Mutanten mit

N-terminal fusioniertem GFP und mCherry statistisch signifikante Unterschiede ermittelt wurden.

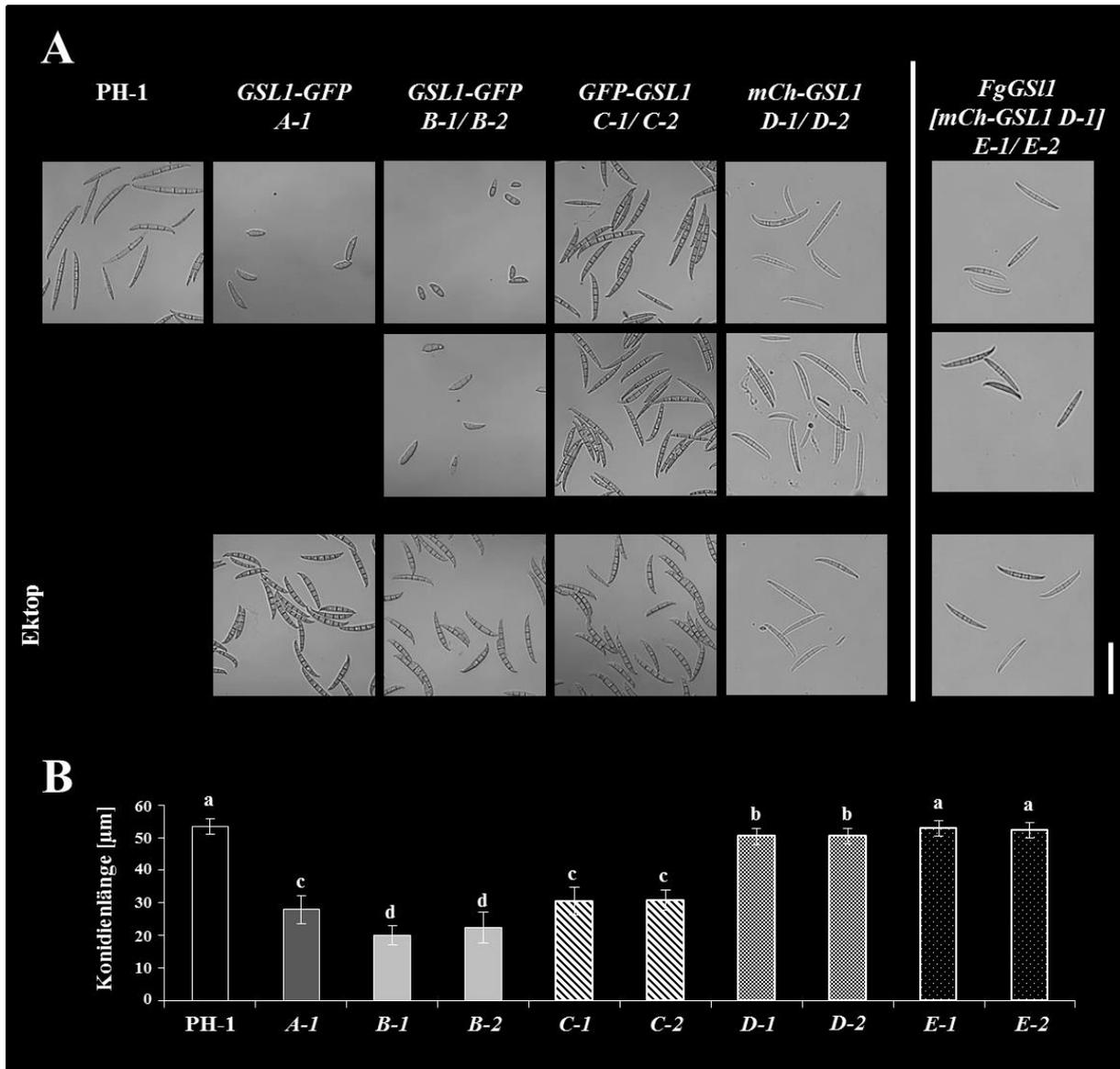


Abbildung 3-6: Morphologie und Länge der Konidien der *GSL1*-Mutanten.

A Mikroskopische Aufnahmen von Konidien aller *GSL1*-Mutanten. Die frisch geernteten Sporen wurden in Wasser aufgenommen und mit dem T-PMT am CLSM dokumentiert. Maßstab: 50 µm

B Mittelwert der Konidienlänge [µm] aller *GSL1*-Transfomanten. Signifikante Unterschiede sind durch Kleinbuchstaben verdeutlicht. Test der statistischen Signifikanz gegenüber allen Stämmen, Einfaktorielle ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm; a, b, c und d geben Gruppen an mit $P < 0,05$; Fehlerbalken: Standardabweichungen, $n = 25$.

3.1.4. Mikroskopische Untersuchungen zur Auskeimung von Konidien und primäres Hyphenwachstum der GSL1-Stämme

Die bisherigen Ergebnisse zum Wachstum auf Vollmedium (Abb. 3-5) und zur Morphologie der Konidien (Abb. 3-6) haben gezeigt, dass die generierten GSL1-Mutanten beachtliche phänotypische Veränderungen aufweisen. Im folgenden Versuchsansatz sollte nun die Auskeimungsfähigkeit der Sporen sowie die Bildung und das Wachstum der Primärhyphen mikroskopisch beobachtet und analysiert werden.

Dafür wurden 50- 100 Konidien des zu untersuchenden *F. graminearum*-Stammes unter sterilen Bedingungen in 150 µl CM-Medium angeimpft. Auf einem Objektträger wurde ein doppelseitiger Kleberahmen mittig platziert und die Konidien suspension hineinpipettiert. Mit einem Deckgläschen wurde die Kultur luftdicht verschlossen und anschließend eine Konidie unter dem Mikroskop anvisiert. Über einen Zeitraum von 12 Stunden wurde eine Zeitreihe der auskeimenden Sporen erstellt (Abb. 3-7). Je Transformationskonstrukt wurde beispielhaft eine Mutante abgebildet.

Der Zeitpunkt 0 h zeigt die Konidien der zu untersuchenden *F. graminearum*-Stämme. Auffallend sind die morphologischen Unterschiede, insbesondere zwischen den Mutanten *GSL1-GFP A-1* und *B-1* und dem Wildtyp (Abb. 3-7, 0 h). Dieses Phänomen wurde bereits vorab beschrieben und erläutert (Abb. 3-6). Zwei Stunden nach Beginn des Experiments bildete der Wildtyp bereits die ersten beiden Primärhyphen aus, wohingegen bei den Konidien der GSL1-Mutanten noch keine Anzeichen für eine Auskeimung zu verzeichnen waren (Abb. 3-7, 2 h). Nach weiteren zwei Stunden war bei der Komplementationsmutante *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1] E-1* die erste Hyphe sichtbar. Zu einem späteren Zeitpunkt begannen auch die anderen GSL1-Mutanten auszukeimen (Abb. 3-7, 6 h). Ein Unterschied zwischen den Mutanten mit C- und N-terminalen Fusionskonstrukten war dabei nicht zu verzeichnen. Im weiteren Verlauf des primären Hyphenwachstums zeigten die *GSL1-GFP*-Stämme eine erhebliche Reduktion in der Wachstumsgeschwindigkeit. So war das Längenwachstum an der Hyphenspitze von PH-1 deutlich schneller verglichen zu *GSL1-GFP A-1* und *B-1*. Die Mutanten mit N-terminal fusioniertem Fluoreszenzprotein zeigten diese reduzierte Wachstumsgeschwindigkeit nicht (Abb. 3-7, 8- 12 h).

Des Weiteren wurde bei allen GSL1-Mutanten ein unpolares Hyphenwachstum beobachtet. Im Vergleich dazu wuchs der Wildtyp mit zwei sich gegenüberliegenden Primärhyphen in die Länge (Harris, 2005) und bildete acht Stunden nach Auskeimung die ersten Verzweigungen, die typischerweise im rechten Winkel zur Haupthyphie wuchsen (Abb. 3-7, PH-1 8 h).

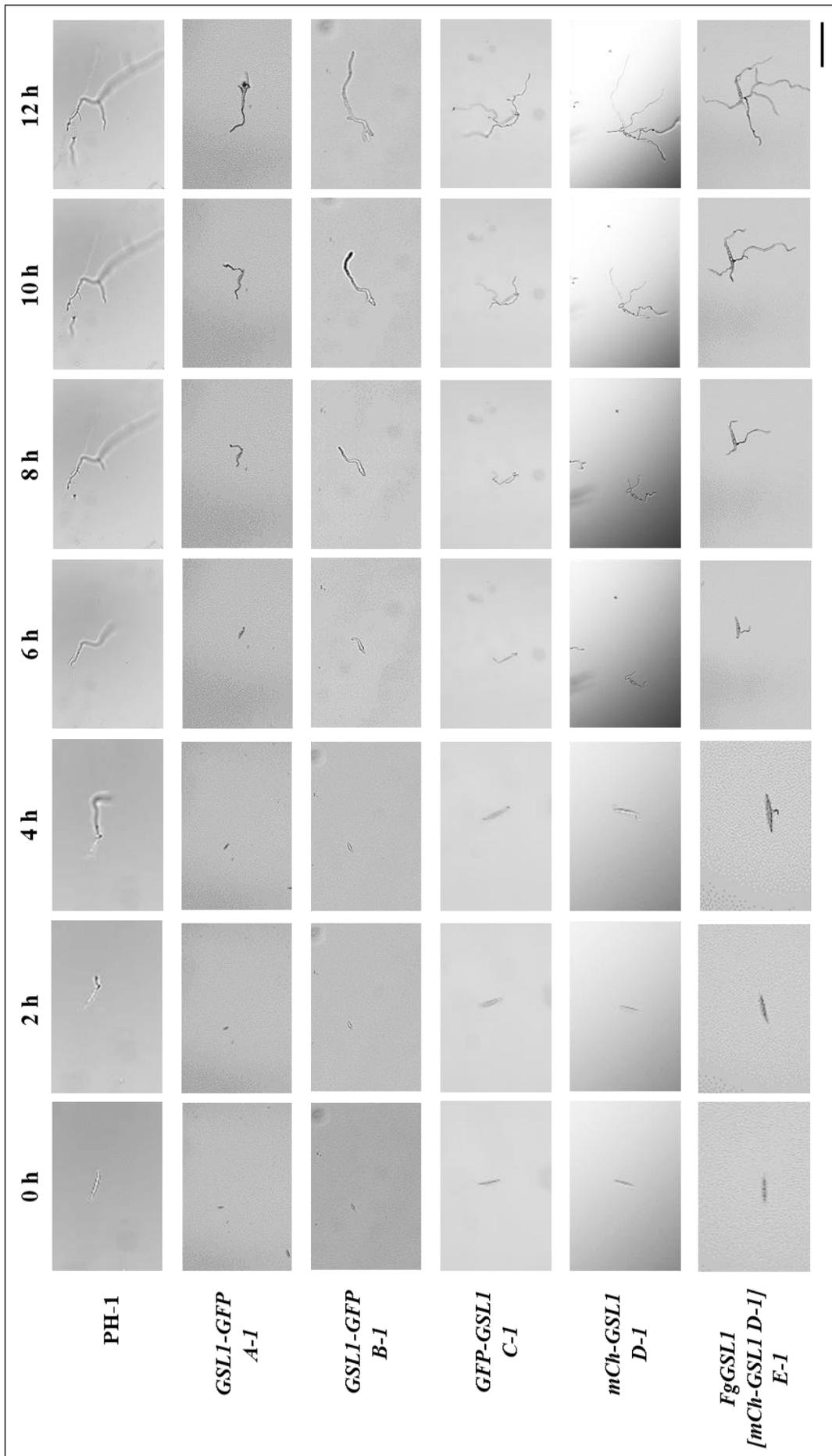


Abbildung 3-7: Auskeimung und primäres Hyphenwachstums der GSL1-Mutanten.

Abgebildet sind ausgewählte markante Zeitpunkte, die besonders deutlich die phänotypischen Unterschiede zwischen den Mutantenstämmen und PH-1 zeigen.

Für diesen Versuch wurden einige Konidien der zu untersuchenden *F. graminearum*-Stämme in CM-Medium angeimpft und auf einem Objektträger luftdicht mittels doppelseitigen Kleberahmen und Deckglas fixiert. Anschließend wurde eine Spore im Durchlicht des Mikroskops anvisiert und eine Zeitreihe von 12 Stunden (jede 10 min eine Aufnahme) erstellt. Maßstab 0- 4 h: 100 µm; 6- 12 h: 200 µm.

Nach 12 Stunden waren deutliche Unterschiede bezüglich Anzahl und Länge der ausgebildeten Hyphen zu verzeichnen. Die Komplementationsmutante *E-1* glich dabei dem Wildtyp PH-1. Weniger Myzel war bei den Stämmen *GFP-GSL1 C-1* und *mCh-GSL1 D-1* zu verzeichnen. Hingegen waren die gewachsenen Hyphen von *GSL1-GFP A-1* und *B-1* in ihrem Entwicklungsstand mit dem des Wildtypen zum Zeitpunkt 6 h vergleichbar (Abb. 3-7, 12 h).

Die erläuterten Ergebnisse zur mikroskopischen Analyse der Auskeimung und des primären Hyphenwachstums von GSL1-Mutanten korrelieren mit dem vorab beobachteten reduzierten Wachstum auf CM-Agarplatten (Abb. 3-5). Die Konidien der Mutantenstämmen keimten verglichen zum Wildtyp später aus und waren auch in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit reduziert, insbesondere *GSL1-GFP A-1* und *B-1*.

3.1.5. Reduktion der Virulenz auf Weizenähren der GSL1-Mutanten

F. graminearum ist ein Blütenpathogen kleinkörniger Getreidearten, denen unter anderem Weizen zugeordnet wird. Dieses Phytopathogen ist der Haupterreger der Ährenbleiche (engl. *Fusarium Head Blight*, FHB) (Parry *et al.*, 1995; Goswami und Kistler, 2004; Bushnell *et al.*, 2003). Zu einer vollständigen biologischen Charakterisierung der generierten *F. graminearum*-Mutanten wurde deren Infektionsstärke auf Weizenähren untersucht.

Zur Überprüfung der Virulenz wurde das Weizenkultivar *Nandu* verwendet. Blühende Weizenähren wurden mit 500 Konidien des zu testenden Stammes punktinokuliert und nach 21 Tagen das Schadbild ausgewertet. Dazu wurde die Anzahl der FHB-symptomatisch ausgebleichenen Blüten ins Verhältnis zur Gesamtblütenanzahl der jeweiligen Ähre gesetzt. Als Positivkontrolle diente die Inokulation mit dem Wildtyp.

Alle generierten GSL1-Mutanten zeigten eine Reduktion in der Virulenz auf Weizen im Vergleich zum Wildtyp, bei dem nach 21 Tagen die komplette Ähre FHB-Symptome aufwies (Abb. 3-8 A). Für PH-1 wurde eine mittlere Infektionsstärke von 0,81 festgestellt,

wobei der Wert von 1,0 einer Infektion aller vorhandenen Blüten bedeutet. Die GSL1-Mutanten erreichten eine mittlere Infektionsstärken von 0,25 bis 0,37 (Abb. 3-8 B). Bedeutende Unterschiede zwischen Transformanden mit homolog integrierten N- und C-terminalen Fusionskonstrukten konnten nicht identifiziert werden (Abb. 3-8 A und B). Die Komplementationsmutanten *E-1* und *E-2* sowie der dazugehörige Ektop (*ect E*) zeigten die gleiche Virulenz wie der Wildtyp (Abb. 3-8 A und B). Die weiteren getesteten, ektopisch integrierten Transformanden (*ect A-1*, *B*, *C*, *D*) lagen mit den Werten ihrer Infektionsstärke zwischen den GSL1-Mutanten und PH-1 (0,53 im Fall *ect D* bis zu 0,62 für *ect B*; Abb. 3-8 B).



Abbildung 3-8: Virulenz der GSL1-Mutanten auf Weizen.

A Schadbilder von Weizenähren nach erfolgter Infektion mit *F. graminearum*-Mutanten und dem Wildtyp PH-1 21 dpi. Weizenblüten wurden im Entwicklungsstand 65- 69 (nach Zadoks *et al.*, 1974) mit 500 Konidien des zu untersuchenden Stammes punktinokuliert (weiße Pfeilspitze). PH-1 diente als Positivkontrolle (vollständige Infektion der Weizenähre) und eine Infektion mit Wasser als Negativkontrolle (FHB-Symptom freie Ähre). Abgebildete Schadbilder entsprechen den ermittelten Werten der Infektionsstärke (B).

B Statistische Analyse der Infektionsstärken getesteter *F. graminearum*-Stämme. Die ermittelten Werte ergeben sich aus dem Verhältnis infizierter, FHB-symptomatischer Blüten und der Gesamtblütenanzahl einer Ähre. Neben allen generierten GSL1-Mutanten wurden auch dazugehörige Ektopen analysiert (*ect A-1* bis *ect E*) Test der statistischen Signifikanz gegenüber PH-1, Einfaktorielle ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm mit * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, Fehlerbalken: Standardabweichungen, $n = 5$.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die homolog integrierten *FgGSL1*-Fusionskonstrukte für eine Reduktion der Virulenz auf Weizenähren verantwortlich sind. Es ist zu vermuten, dass die verringerte Wachstumsrate der Mutanten (Abb. 3-5) mit der reduzierten Infektionsstärke einhergeht.

3.1.6. Verschiebung des relativen Chitin- und Glucangehalts in der Zellwand der *GSL1*-Mutanten

In der vorliegenden Doktorarbeit wurde eine Fusion von *FgGSL1* mit fluoreszierenden Proteinen vorgenommen, um Lokalisationsstudien des Zielproteins durchführen zu können. Aufgrund fehlender Fluoreszenz der integrierten Fusionskonstrukte konnten mikroskopische Analysen zur Lokalisation nicht durchgeführt werden. Hingegen ergaben Untersuchungen der generierten *GSL1*-Mutanten wesentliche phänotypische Veränderungen im Wachstum (Abb. 3-5), Form und Größe der Konidien (Abb. 3-6) sowie Infektionsstärke auf Weizenähren (Abb. 3-8). Aufgrund der Tatsache, dass *FgGSL1* ein integrales Membranprotein ist und die Synthese des Zellwandpolymers (1,3)- β -Glucan katalysiert, kann vermutet werden, dass eine Modifikation des Proteins Zellwandveränderungen hervorruft. Daher wurde im Folgenden eine Zellwandanalyse nach François (2007) aller Mutantenstämme durchgeführt.

Hierfür wurde das zu untersuchende Pilzmyzel unter flüssigem Stickstoff gemörsert und in der Lyophile gefriergetrocknet. Etwa 10 mg des Pulvers wurden mit 72 % iger Schwefelsäure versetzt. Dabei wurden langkettige Zellwandzucker durch eine chemische Hydrolyse in Monosaccharide gespalten. Letztere wurden anschließend mittels HPAEC-PAD quantifiziert.

In der Zusammensetzung der monomeren Zellwandzucker (Glucosamin, Galaktose, Glukose und Mannose) konnten Unterschiede zwischen den *GSL1*-Mutanten und PH-1 ermittelt werden. Zur besseren Überschaubarkeit der Ergebnisse wurden die Werte von zwei unabhängigen Transformanden einer Mutantenlinie gemittelt (Beispiel: *GSL1-GFP B-1* und *B-2* ergeben *Mut B* in Abb. 3-9). Die exakten Daten aller Stämme sind dem Anhang zu entnehmen (Tab. 8-1, Anhang). Eine relative Verschiebung der Glucosamin- und Glukosemenge war zwischen den getesteten *GSL1*-Mutanten und dem Wildtypstamm zu verzeichnen. Dabei beinhalteten die Zellwände der Transformanden mehr Glucosamin (49,73 % - 62,63 %) und weniger Glukose (17,94 % - 30,87 %) verglichen zu PH-1 (Glucosamin: 44,02 %; Glukose: 38,10 %; Abb. 3-9). Insbesondere die Mutanten

GSL1-GFP B-1 und *B-2* zeigten eine deutlich signifikante Verschiebung beider Monosaccharide (Glucosamin: 62,63 %; Glukose: 17,49 %, *Mut B*). Die Zellwandzusammensetzung der Komplementationsmutanten *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1]* *E-1* und *E-2* glich nicht dem Wildtyp, sondern den Stämmen mit N-terminal fusionierten Fluoreszenzproteinen *GFP-GSL1 C-1* und *C-2* sowie *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* (Abb. 3-9, gemusterte Balken (*Mut C*, *Mut D*, *Mut E*) sowie Tab. 8-1, Anhang). Die ermittelten Galaktose- und Mannosewerte ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Pilzstämmen.

Die *GSL1*-Mutanten wiesen im Allgemeinen einen signifikant geringeren Glukosegehalt im Vergleich zum Wildtyp auf, was auf eine Reduktion des (1,3)- β -Glucans in der Zellwand hindeutet (Dichtl *et al.*, 2015). Aufgrund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Fusion von *FgGSL1* mit einem Fluoreszenzprotein zur Inhibierung der enzymatischen Aktivität der (1,3)- β -Glucansynthase führt. Hingegen war eine relative Zunahme des Monosaccharids Glucosamin zu verzeichnen, der Grundbaustein des Zellwandpolymers Chitin (Roncero, 2002; François, 2007). Signifikante Veränderungen bezüglich der Galaktose und Mannose wurden nicht ermittelt. Folglich scheint die Modifikation der (1,3)- β -Glucansynthase *FgGSL1* keine bedeutenden Auswirkungen auf die artspezifischen glykolysierten Proteine in der Zellwand von *F. graminearum* zu haben. Interessanterweise unterschieden sich die Werte zwischen den Stämmen *GSL1-GFP A-1* und *B-1/ B-2* (Abb. 3-9, *A-1* und *Mut B*) erheblich. Bemerkenswert ist dies, da beide letztendlich das gleiche Konstrukt tragen und in den vorherigen Untersuchungen ähnliche charakteristische Eigenschaften aufwiesen. Auch die berechneten Glukose- und Glucosaminkonzentrationen der Komplementationsmutanten glichen nicht den Werten des Wildtyps. Demnach scheint noch ein weiterer, unbekannter Mechanismus die Zellwandzusammensetzung in den *GSL1*-Mutanten zu beeinflussen.

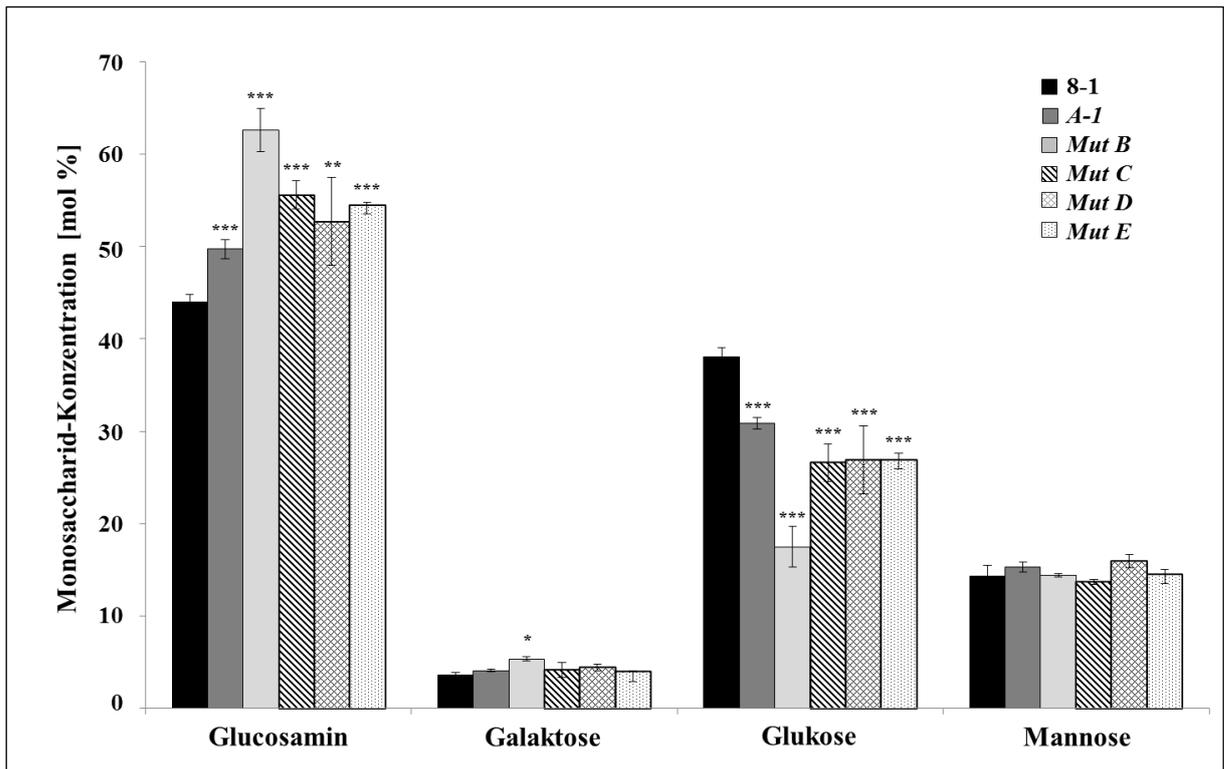


Abbildung 3-9: Monosaccharid-Bestimmung aus Zellwandextrakten vom *F. graminearum*-Wildtyp sowie *GSL1*-Mutanten.

Die Monosaccharide wurden mittels chemischer Hydrolyse aus Zellwandextrakten gewonnen und durch HPAEC-PAD analysiert.

Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei unabhängigen Transformanten je Fusionskonstrukt. Es wurden mindestens zwei biologische Replikate von jedem untersuchten Pilzstamm gemessen und ausgewertet (exakte Werte im Anhang, Tab. 8-1). Test der statistischen Signifikanz gegenüber PH-1, Einfaktorielle ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm mit * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, Fehlerbalken: Standardabweichungen.

3.2. Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$ in Hinblick auf Zellwandmodifikationen und Bildung von blasenartigen Strukturen

Neben der Charakterisierung der pilzlichen (1,3)- β -Glucansynthase FgGSL1 liegt der Forschungsschwerpunkt dieser Doktorarbeit in der Identifizierung von *F. graminearum*-Mutanten mit strukturellen und chemischen Modifikationen der pilzlichen Zellwand. Auf der Suche nach regulatorischen Zellwandproteinen wurde bereits vor einigen Jahren eine Deletionsmutante des Gens *FgPK1* (FGSG_05845, Serin/Threonin Proteinkinase gad8) von Dr. Christian Voigt generiert und molekularbiologisch bestätigt. Diese Proteinkinase gehört zur Gruppe der AGC Proteinkinasen (Wang *et al.*, 2011), benannt nach ihren Familien der Proteinkinase A, Proteinkinase G und Proteinkinase C (Hanks und Hunter, 1995; Sobko, 2006). Diese Proteine regulieren unter anderem das zelluläre Wachstum und übernehmen eine bedeutende Funktion im Signaltransduktionsweg zum Zellwandaufbau (Sobko, 2006).

Eine Korrelation zwischen den vorab beschriebenen GSL1-Mutantenstämmen und der Deletionsmutante $\Delta pk1$ konnte bei charakteristischen Veränderungen in der Wachstumsrate, Infektionsstärke auf Weizenähren sowie Zellwandaufbau festgestellt werden. Durch den Einsatz verschiedener Mikroskopiemethoden sollten insbesondere die spontan auftretenden Verdickungen an den Hyphenspitzen, welche blasenartige Strukturen bilden, genauer analysiert werden. Des Weiteren wurde eine Zellwandanalyse, entsprechend den GSL1-Mutanten, durchgeführt sowie ein Expressionsprofil essentieller Gene zum Zellwandaufbau erstellt.

3.2.1. Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierungen von $\Delta pk1$

Die Generierung einer Deletion des Gens *FgPK1* im *F. graminearum*-Wildtypgenom 8-1 wurde bereits vor einiger Zeit von Dr. Christian Voigt vollzogen und erste allgemeine Charakterisierungen durchgeführt. Es folgten mikroskopische Untersuchungen durch die technische Assistentin Cathrin Kröger.

Aus der Protoplasten-Transformation erhaltene Primärtransformanten wurden einer Southern Blot Analyse unterzogen. Dabei band die genspezifische Sonde an die flankierende Sequenz von *FgPK1*, sodass sowohl im Wildtyp 8-1, als auch in den Deletionsmutanten $\Delta pk1$ #1, #2 und #3 eine Bande detektiert wurde (Abb. 3-10 A). Der Größenunterschied der sichtbaren Banden ergab sich aus dem veränderten Schnittmuster des verwendeten Restriktionsenzym, da in den Mutanten die codierende Sequenz von

FgPK1 durch eine Hygromycin-Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Aus der *F. graminearum*-Transformation gingen keine ektopisch integrierten Mutanten hervor.

Nachdem die Deletionsmutanten im Southern Blot als positiv befunden wurden, sollte ein Nachweis von *FgPK1* auf Transkriptionsebene durchgeführt werden. Hierzu wurde die Gesamt-RNA vom Wildtyp 8-1 sowie $\Delta pk1$ #1 und #2 isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Es erfolgte eine PCR mit internen *FgPK1*-Primern, welche ein 250 bp großes Fragment in der Probe von 8-1 amplifizierten (Abb. 3-10 B). Hingegen konnte bei den Deletionsmutanten keine Bande detektiert werden. Die mitgeführte β -*Tubulin*-PCR diente zur qualitativen Kontrolle der cDNA. In allen drei Proben war eine Bande von 120 bp sichtbar (Abb. 3-10 B). Den Ergebnissen zufolge war die Deletion von *FgPK1* in den gezeigten $\Delta pk1$ -Mutanten erfolgreich.

Anschließend erfolgte die erste phänotypische Charakterisierung von $\Delta pk1$ in Bezug auf die Virulenz von Weizenähren. Wie bereits für die *GSL1*-Mutanten beschrieben, wurden blühende Weizenähren mit 200 Konidien punktinokuliert und nach 21 Tagen das Schadbild dokumentiert. Eine mit Wasser inokulierte Ähre diente als Negativkontrolle. Die Infektion mit dem Wildtypstamm 8-1 führte zum vollständigen Ausbleichen der Ähre, wohingegen die getesteten Deletionsmutanten FHB-Symptome allein in der inokulierten Blüte hervorrufen konnten (Abb. 3-10 C). Dieses Schadbild wird als Typ II-Resistenz bezeichnet (Schroeder und Christensen, 1963), da sich $\Delta pk1$ nur in der infizierten Weizenblüte ausbreiten konnte.

Eine mikroskopische Untersuchung ausgekeimter $\Delta pk1$ -Konidien sollte Aufschluss über die Ursache der geringen Infektionsstärke geben. Dazu wurden die Sporen von 8-1 und $\Delta pk1$, welche GFP konstitutiv exprimierten, 20 Stunden in CM-Flüssigmedium angezogen und anschließend dokumentiert. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen ein außergewöhnliches unpolares Hyphenwachstum sowie blasenartige Strukturen der Deletionsmutante im Vergleich zum normalen geradlinigem Wachstum des Wildtyps (Abb. 3-10 D). Die ausgebildeten Hyphen wiesen eine Vielzahl von Verzweigungen auf. Demnach führt die Deletion von *FgPK1* zu einer erheblichen Wachstumsstörung.

Eine weitere mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die $\Delta pk1$ -Mutanten mehrkernige Zellen besaßen (Abb. 3-10 E). Die ausgekeimten Konidien wurden dazu mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt, welches durch die Bindung an DNA Zellkerne sichtbar macht. Insbesondere in den blasenartigen Strukturen konnten bis zu sechs Zellkerne identifiziert werden.

Zusammenfassend scheint die Deletion der Proteinkinase FgPK1 eine Vielzahl von phänotypischen Auswirkungen, sogenannte Polyphänie oder Pleiotropie (Purves *et al.*, 2006), auf den Pilz zu haben. Im Folgenden werden das reduzierte Wachstum und die Zellwandveränderungen näher untersucht.

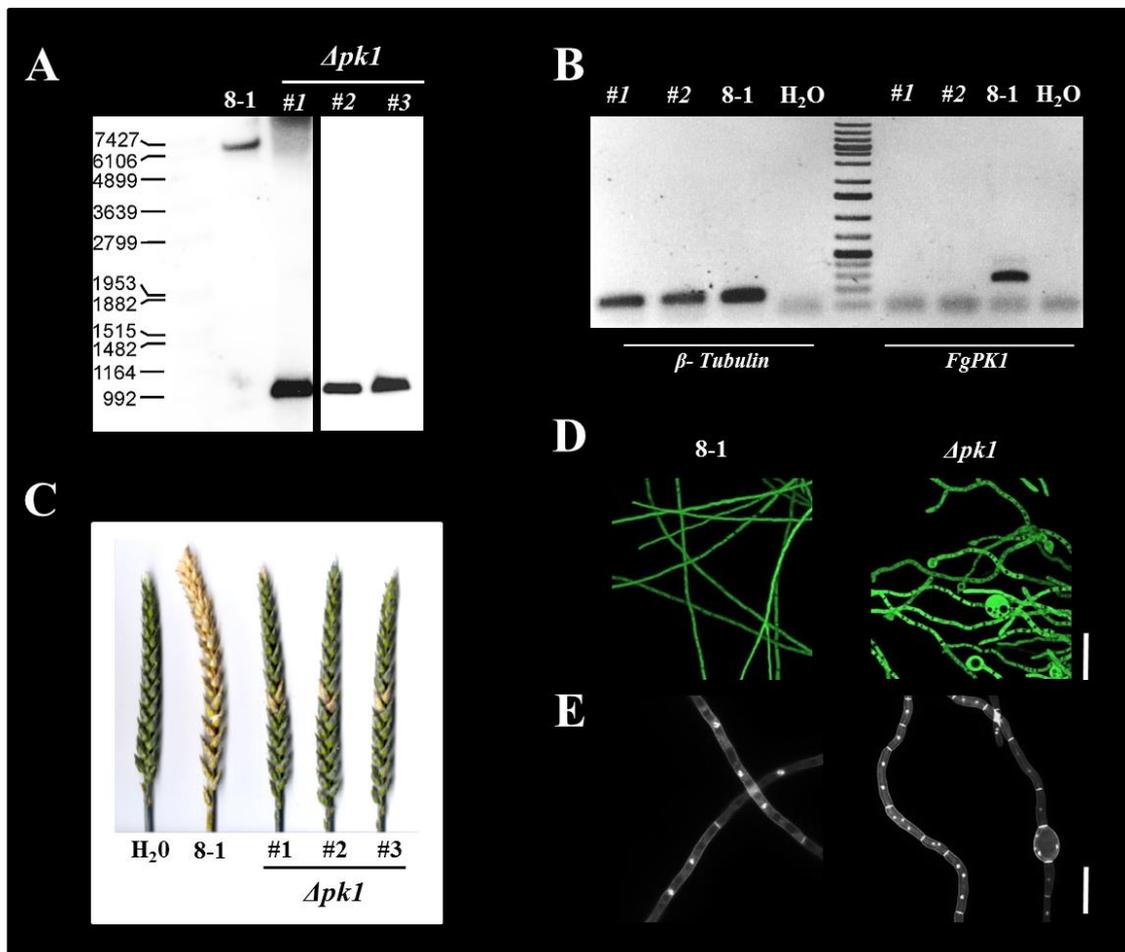


Abbildung 3-10: Molekularbiologische und phänotypische Charakterisierung von $\Delta pk1$.

A Southern Blot Analyse von drei unabhängigen Deletionsmutanten der FgPK1. Zur Hybridisierung kam eine genspezifische PCR-Sonde zum Einsatz, die an die flankierende Sequenz von FgPK1 bindet. Detektion einer Bande sowohl im Wildtyp 8-1 als auch in den Deletionsmutanten $\Delta pk1$ #1, #2 und #3, jedoch mit unterschiedlicher Größe.

B FgPK1-Expressionanalyse in den Deletionsmutanten $\Delta pk1$ #1 und #2 und dem Wildtyp 8-1. Mit internen FgPK1-Primern wurde im Wildtyp ein Amplikon von 250 bp erwartet. Expressionsanalyse von β -Tubulin diente zur qualitativen Kontrolle der synthetisierten cDNA. Amplikon β -Tubulin: 120 bp; FgPK1: 250 bp (Primer in Tab. 2-4).

C Schadbilder von Weizenähren nach erfolgter Infektion mit *F. graminearum*-Stämmen 8-1 sowie $\Delta pk1$ #1, #2 und #3 21 dpi. Weizenblüten wurden im Entwicklungsstand 65- 69 (nach Zadoks *et al.*, 1974) mit 200 Konidien des zu untersuchenden Stammes punktinokuliert. 8-1 diente als Positivkontrolle (vollständige Infektion der Weizenähre) und eine Infektion mit Wasser als Negativkontrolle (FHB-Symptom freie Ähre).

D Mikroskopische Analyse von Pilzmyzel des Wildtyps 8-1 und der Deletionsmutante $\Delta pk1$. Die grüne Fluoreszenz des Zytosols wurde durch eine konstitutive GFP-Expression hervorgerufen. Maßstab: 50 μ m.

E Auftreten mehrkerniger Zellen in der Deletionsmutante $\Delta pk1$. Gewachsener Pilzmyzel wurde mit DAPI angefärbt. Maßstab: 20 μ m.

Die dargestellten Ergebnisse wurden von Dr. Christian Voigt und Cathrin Kröger generiert.

3.2.2. Wachstumsphänotyp von $\Delta pk1$ auf Voll- und Minimalmedien

Die Deletion der Proteinkinase FgPK1 führt zu einem abnormalen Wachstumsphänotyp, der sich durch unpolares, stark verzweigtes Hyphenwachstum sowie der Bildung von blasenartigen Strukturen auszeichnet (Abb. 3-10 D). Neben der mikroskopischen Analyse sollte nun das Wachstum auf verschiedenen Kulturmedien makroskopisch beobachtet und dokumentiert werden.

Hierzu wurden Konidien der $\Delta pk1$ -Mutanten in Weizenflüssigmedium angezogen und geerntet. Eine Sporensuspension von 100 Konidien/ μl wurde hergestellt und 10 μl dieser Suspension mittig auf eine CM-, SNA- und YPD-Agarplatte getropft. Als Referenz diente der Wildtyp 8-1. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Kulturplatten für zwei bis drei Tage bei 28 °C inkubiert.

Eine Reduktion im Wachstum der Deletionsmutanten war auf allen Medien zu verzeichnen (Abb. 3-11). Unterschiede zwischen den drei getesteten unabhängigen Mutanten $\Delta pk1$ #1, #2 und #3 wurden nicht beobachtet. Der Durchmesser des gewachsenen Myzels von 8-1 war deutlich größer verglichen mit den Deletionsmutanten. Auf den CM-Agarplatten war das Myzel der $\Delta pk1$ -Mutanten stets rötlich gefärbt, was auf eine erhöhte Aurofusarinproduktion zurückzuführen war (Medentsev *et al.*, 1992; Malz *et al.*, 2005), wohingegen der WT keine Verfärbung aufwies (Abb. 3-11, obere Reihe). Die Mutantenstämme schienen auf dem SNA-Minimalmedium mittig ein dichteres Myzelgeflecht zu bilden als an den Randbereichen (Abb. 3-11, mittlere Reihe). Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, wurden vergrößerte Aufnahmen der gewachsenen Hyphen an einer Stereolupe erstellt (Abb. 8-2, Anhang). Diese Analyse zeigte für $\Delta pk1$ mittig weiße kristalline Ablagerungen und ein stark verzweigtes, ungeordnetes Hyphenwachstum in den Randbereichen. Der Wildtyp wies hingegen ein normales, geradliniges Längenwachstum der Hyphen auf (Abb. 8-2, Anhang). Das stärkste Wachstum offenbarten die Deletionsmutanten auf YPD-Medium. Dieses Vollmedium ist reich an Nährstoffen, weshalb der Wildtyp nach drei Tagen die gesamte Petrischale kolonisieren konnte (Abb. 3-11, untere Reihe). Wiederum zeigten die $\Delta pk1$ -Mutanten eine rötliche Verfärbung des gebildeten Myzels.

Die Ergebnisse beweisen den Einfluss der Deletion von FgPK1 auf das Hyphenwachstum, unabhängig vom Kulturmedium. Eine deutlich reduzierte Wachstumsrate war stets zu verzeichnen.

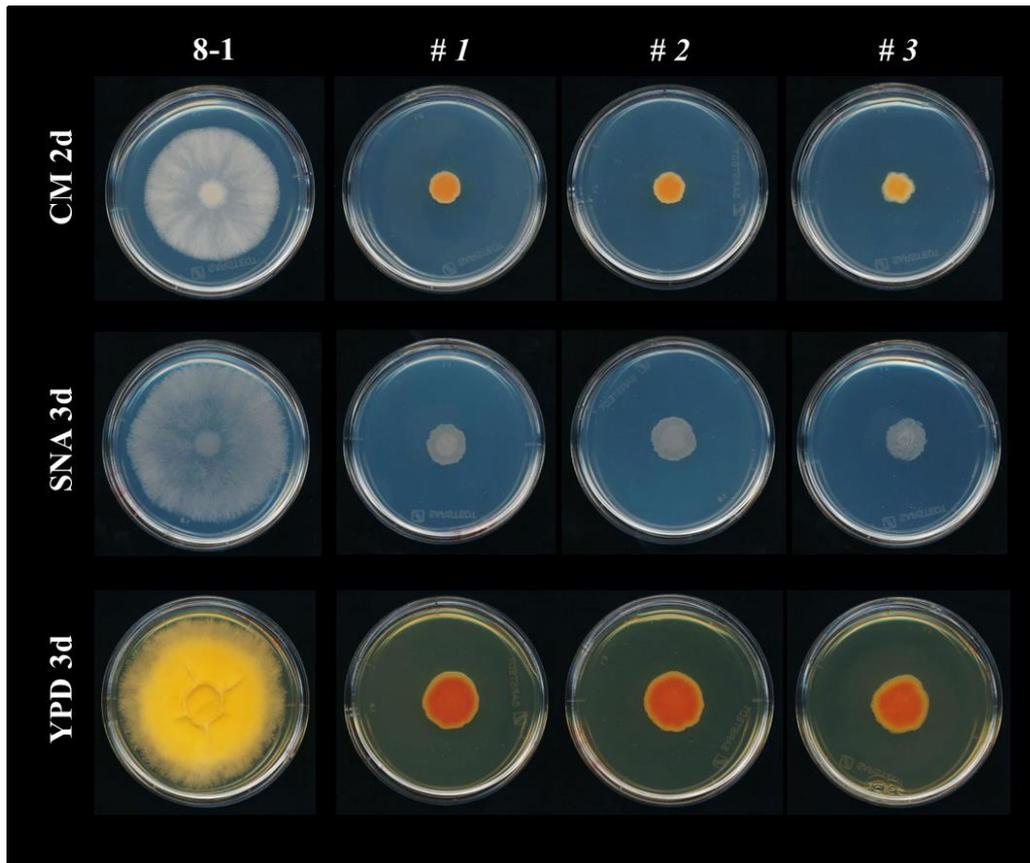


Abbildung 3-11: Hyphenwachstum der Deletionsmutante $\Delta pk1$ auf Minimal- und Vollmedium.

Frisch geerntete Konidien von drei unabhängigen $\Delta pk1$ -Mutanten und dem Wildtyp 8-1 wurden auf eine Konzentration von 100 Konidien/ μl eingestellt. Ein 10 μl Tropfen dieser Lösung wurde mittig auf die Agarplatten platziert und bei 28 °C (CM: zwei Tage; SNA/ YPD: drei Tage) inkubiert.

Es wurden drei unabhängige Wachstumsstudien durchgeführt und ausgewertet.

3.2.3. Mikroskopische Untersuchung der Auskeimungsfähigkeit und primäres Hyphenwachstum von $\Delta pk1$

Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Deletionsmutante $\Delta pk1$ einen Wachstumsdefekt bezüglich der ausgebildeten Hyphen und der Wachstumsgeschwindigkeit aufweist (Abb. 3-10 D und 3-11). Im folgenden Versuchsaufbau sollte die Auskeimung und das primäre Hyphenwachstum von $\Delta pk1$ mikroskopisch untersucht werden. Dies schloss die genaue Dokumentation der Bildung blasenartiger Strukturen ein.

Zur Durchführung des Experiments wurden einige Konidien der Deletionsmutante in CM-Flüssigmedium angeimpft. Auf einem Objektträger wurde ein doppelseitiger Kleberahmen befestigt und die Konidien suspension hineinpipettiert. Anschließend wurde mit einem Deckglas die Lösung luftdicht verschlossen. Daraufhin wurde eine Spore im

Durchlicht des Mikroskops *Axio Imager.Z1* anvisiert und eine Zeitreihe von über 20 Stunden aufgenommen. Zum Vergleich diente der Wildtyp 8-1. Zur Verdeutlichung der Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Deletionsmutante $\Delta pk1$ wurden markante Zeitpunkte ausgewählt und dargestellt (Abb. 3-12).

So fiel auf, dass der Wildtyp bereits nach zwei Stunden die erste Hyphe ausbildete, wohingegen die Konidie von $\Delta pk1$ erst nach fünf Stunden, in Folge von Wassereinlagerung, anschwellte und nach weiteren zwei Stunden die ersten beiden Hyphen sichtbar wurden (Abb. 3-12, $\Delta pk1$ 5 h und 7 h). Typischerweise keimt 8-1 mit zwei sich gegenüberliegenden Primärhyphen aus, die im weiteren Verlauf vereinzelt Verzweigungen ausbilden (Abb. 3-12, 8-1 7 h; Harris, 2005). Im Vergleich dazu besaß die Deletionsmutante nach 12 Stunden bereits sieben kurze Hyphen. Zudem waren vielen Verzweigungen zu beobachten, woraus sich letztendlich ein ungeordnetes und wirres Hyphengeflecht entwickelte (Abb. 3-12, $\Delta pk1$ 20 h).

Die mikroskopischen Aufnahmen der Zeitreihe zeigen, dass die Deletionsmutante verspätet auskeimt und eine Vielzahl von Hyphen mit etlichen Verzweigungen ausbildet. Das daraus resultierende Hyphengeflecht unterscheidet sich erheblich von dem geordneten und geradlinigem Hyphenwachstum des Wildtypen.

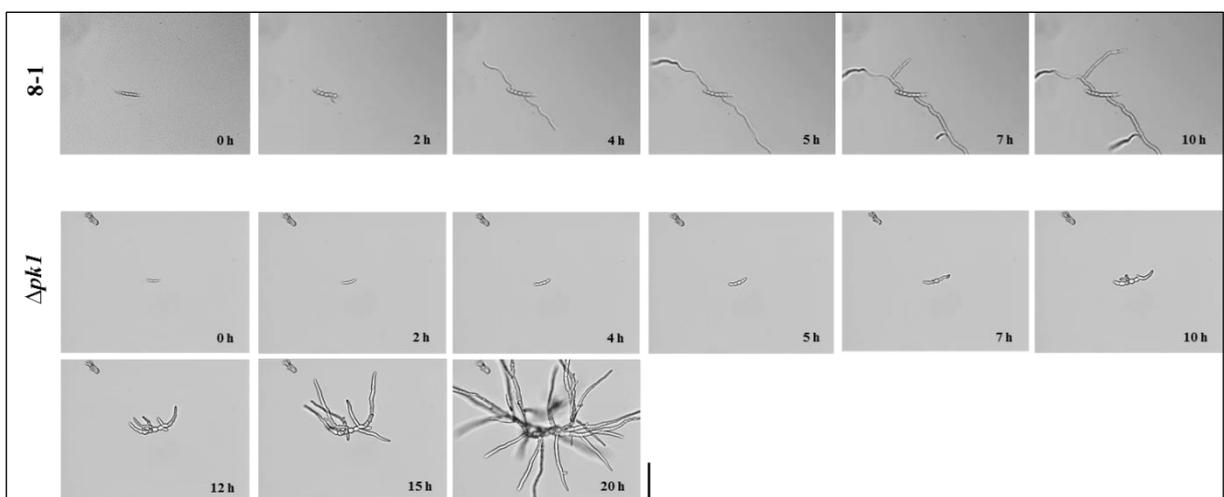


Abbildung 3-12: Mikroskopische Dokumentation der Auskeimung und primäres Hyphenwachstum der Deletionsmutante $\Delta pk1$ im Vergleich zum Wildtyp 8-1.

Dargestellt sind ausgewählte, markante Zeitpunkte von der Auskeimung und dem Hyphenwachstum von $\Delta pk1$ sowie 8-1.

Für diesen Versuch wurden Konidien der Deletionsmutante und des Wildtyps in CM-Medium angeimpft und auf einem Objektträger luftdicht mittels doppelseitigen Kleberahmen und Deckglas fixiert. Anschließend wurde eine Spore im Durchlicht des Mikroskops anvisiert und eine Zeitreihe von 20 Stunden (jede 10 min eine Aufnahme) erstellt. Maßstab oben 8-1: 200 μm , unten $\Delta pk1$: 100 μm .

Nach der phänotypischen Charakterisierung von $\Delta pk1$ bezüglich Auskeimung und primärem Hyphenwachstum sollte nun die Bildung der blasenartigen Strukturen an den Hyphenspitzen näher analysiert werden.

So konnte beobachtet werden, dass es zu einem späteren Zeitpunkt, etwa 18 Stunden nach Auskeimung, spontan und vermehrt zur Blasenbildung kam (Abb. 3-13 A). Diese speziellen Strukturen waren meist instabil und zerplatzten sofort, weshalb von einer Aufnahme zur nächsten lediglich die Lyse vieler Blasen dokumentiert werden konnte (Abb. 3-13 A, kreisförmige Markierung). Folglich wurden die zytoplasmatischen Bestandteile ins umliegende Medium freigesetzt. Eine längerfristige mikroskopische Charakterisierung dieser labilen Strukturen war nicht möglich.

Jedoch konnte gelegentlich die Ausbildung und das Wachstum von beständigen Blasen beobachtet werden (Abb. 3-13 B). Die pilzliche Zellwand schien in diesem Fall dem internen osmotischen Druck standzuhalten. Die Zeitserie zeigt (Abb. 3-13 B, kleine Aufnahmen), dass diese dauerhaften Blasen langsamer gebildet werden und eine große Vakuole beinhalten.

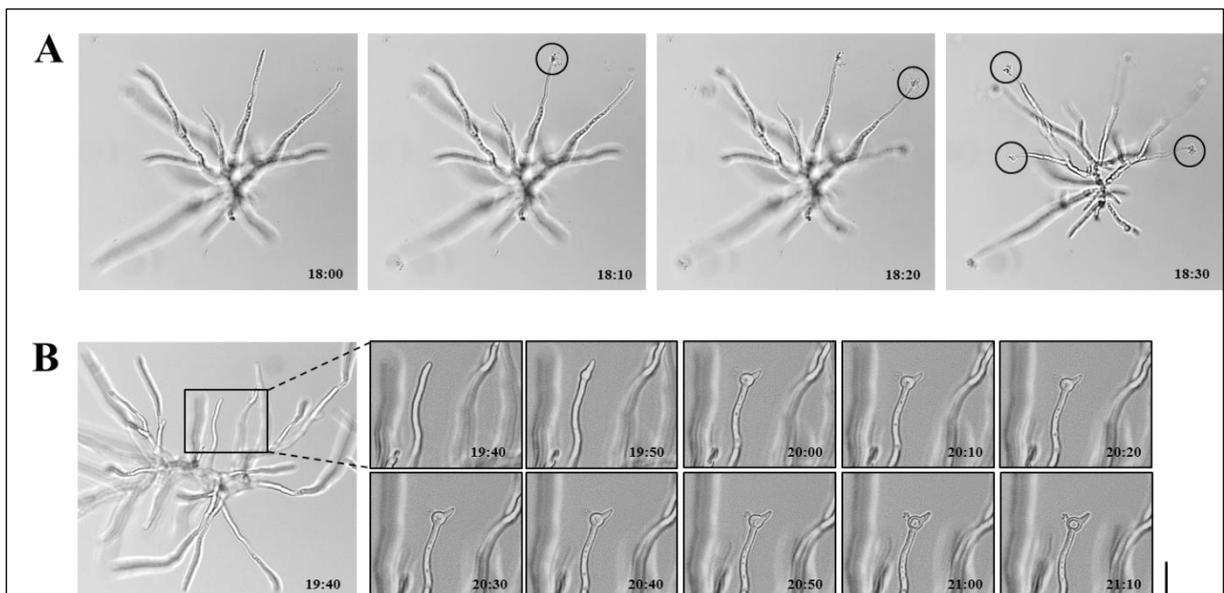


Abbildung 3-13: Mikroskopische Analyse zur Bildung blasenartiger Strukturen von $\Delta pk1$.

A Spontane Bildung von Blasen an den Hyphenspitzen. Die Deletionsmutante begann 18 Stunden nach Auskeimung blasenartige Verdickungen zu bilden (gekennzeichnet durch schwarze Kreise). Diese instabilen Strukturen zerplatzten umgehend und intrazelluläres Material wurde ins umliegende Medium freigesetzt. Bilder der Zeitsreihe: 18:00- 18:30, jede 10 min eine Aufnahme. Maßstab: 57 μm .

B Dokumentation einer beständigen Blase. Die Zeitsreihe (kleine Bilder) zeigt die Bildung und das Wachsen einer Blase, die typischerweise eine große Vakuole beinhaltet. Das Ausströmen von Zytoplasma ins Medium kann beobachtet werden, wobei die Pore sich nach wenigen Minuten wieder zu schließen scheint. Bilder der Zeitsreihe: 19:40- 21:10, jede 10 min eine Aufnahme. Maßstab kleine Bilder: 28 μm .

In dem dargestellten Beispiel kann das Ausströmen von intrazellulären Bestandteilen durch eine Pore in die Umgebung beobachtet werden (Abb. 3-13 B, 20:00). Letztere schien sich im weiteren Verlauf wieder zu schließen und die Zelle blieb intakt. Fortwährende Aufnahmen belegten, dass diese Hyphe lebensfähig war und an der Spitze weiterwuchs (nicht gezeigt).

Die mikroskopische Analyse offenbarte eine spontane Bildung der blasenartigen Strukturen an den Hyphenspitzen der Deletionsmutante. Dieses Phänomen war kein fortwährender Prozess, sondern setzte zu einem definierten Zeitpunkt, 18 bis 20 Stunden nach Auskeimung, ein. Die Mehrheit der Blasen war instabil und lysierten sofort. Nur einige konnten dauerhaft beobachtet werden und eigneten sich für weitere mikroskopische Analysen.

3.2.4. Visualisierung pilzlicher Zellwandpolymere mithilfe spezifisch bindender Fluorophore

Der vorab erläuterte Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante (Abb. 3-11 und 3-12) sowie die spontan auftretenden blasenartigen Verdickungen der Hyphenspitzen (Abb. 3-13) könnten Folgen einer Deregulation von Zellwandkomponenten sein, da angenommen wird, dass FgPK1 eine essentielle Funktion im Signaltransduktionsweg zum Zellwandaufbau einnimmt. Um diese Hypothese zu bestätigen bzw. zu widerlegen, sollte nun der Aufbau der pilzlichen Zellwand durch die Visualisierung bedeutender Zellwandzucker mikroskopisch untersucht werden.

Hierzu wurden drei verschiedene Fluorophore verwendet, die spezifisch an Polysaccharide binden und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einer bestimmten Wellenlänge zum Leuchten angeregt wurden. Aufgrund der unterschiedlichen Extinktionswerte der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe konnten diese zusammen in einer Aufnahme dargestellt werden. Das zu untersuchende Pilzmyzel, 24 Stunden in CM-Flüssigmedium ausgekeimte Konidien der Deletionsmutante und des Wildtyps, wurde nach Herstellerangaben nacheinander mit den Fluorophoren angefärbt. Dabei interkaliert Anilinblau in die (1,3)- β -Glucankette, Wheat Germ Agglutinin (WGA) bindet spezifisch langkettige N-Acetyl-Glucosaminverbindungen (Chitin) und Concanavalin A (Con A) Mannan, das heißt an Mannoproteine, die auf der pilzlichen Zellwand aufgelagert sind (Schoffelmeer *et al.*, 1999). Betrachtet wurden die blasenartigen Strukturen sowie die Hyphen der Deletionsmutante. Als Referenz diente Myzel des Wildtyps.

Anilinblau färbte durchgängig die pilzliche Zellwand, sowohl in den Proben von $\Delta pk1$ als auch in der Hyphe von 8-1 (Abb. 3-14 A, Anilinblau). Die Intensität des Farbstoffs war an den Hyphenspitzen beider Pilzstämme am stärksten, da hier die Zellwandbiosynthese stattfindet (Beauvais *et al.*, 2001). Auch die Septen wurden durch diesen Farbstoff sichtbar gemacht (Abb. 3-14, $\Delta pk1$ -Blase und 8-1).

Das Lektin WGA, welches spezifisch an Chitin bindet (Gooday, 1971; Harris, 2005), kann nur zugängliche und exponierte Bereiche detektieren und erschien daher gefleckt (Abb. 3-14 A, WGA-CFTM 488A; Schoffelmeer *et al.*, 1999).

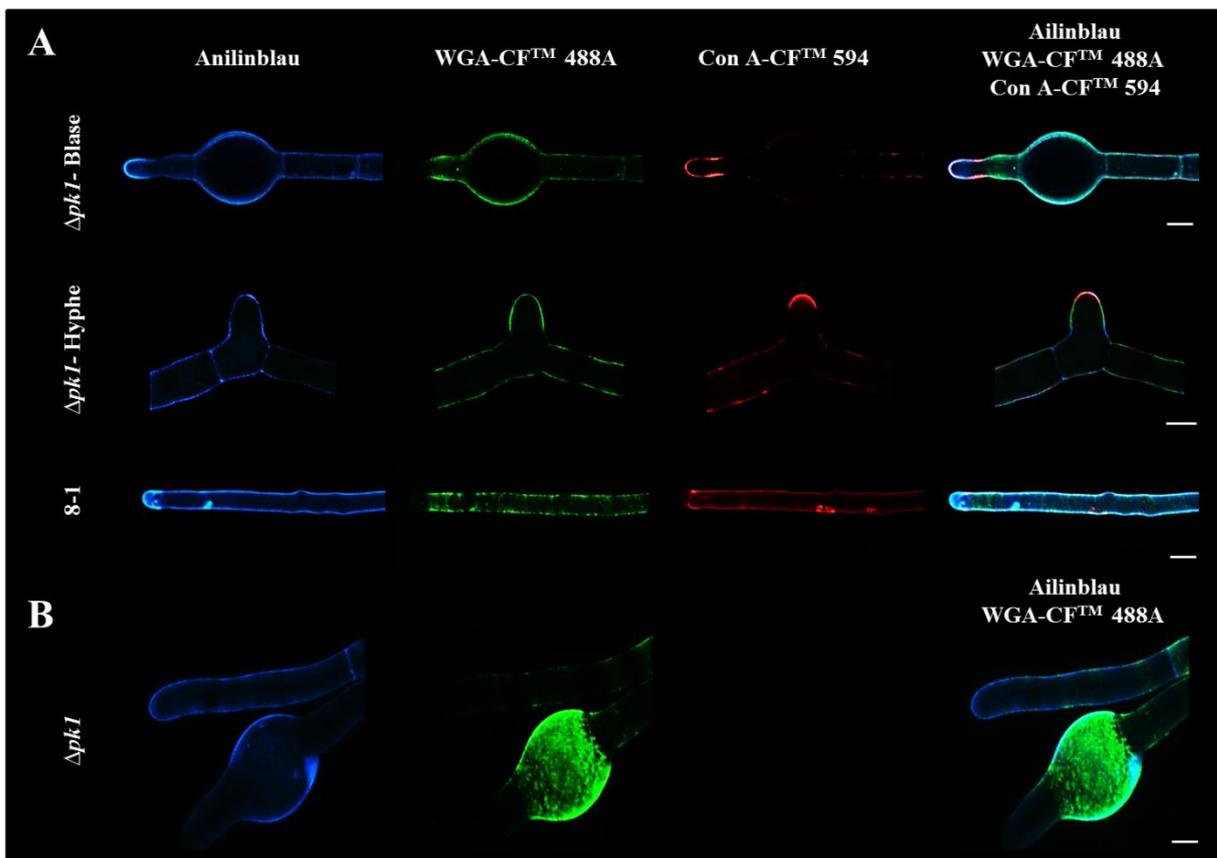


Abbildung 3-14: Visualisierung von Zellwandpolysacchariden in Hyphen der Deletionsmutante und des Wildtyps.

A Lokalisation angefärbter Zellwandbestandteile von $\Delta pk1$ -Blase und $\Delta pk1$ -Hyphe sowie 8-1. Konidien der Deletionsmutante und des Wildtyps wurden für 24 Stunden in CM-Flüssigmedium kultiviert. Das gewachsene Myzel wurde in 50 mM TRIS-HCl (pH 8,0) umgepuffert und nacheinander mit den Fluorophoren nach Herstellerangaben behandelt. Anilinblau (blau dargestellt) interkaliert in die (1,3)- β -Glucankette, WGA (grün dargestellt) bindet an Chitin und Con A (rot dargestellt) an das Mannanrückgrat der Mannoproteine. In beiden Stämmen konnten alle drei Farbstoffe detektiert werden. Die Abbildungen in der letzten Spalte zeigen die Überlagerung aller Kanäle. Alle Bilder wurden am konfokalen Laserscanning-Mikroskop aufgenommen. Aufgrund unterschiedlicher Extinktionswerte der Fluorophore konnten diese zusammen in einer Aufnahme dargestellt werden. Maßstab: 5 μ m.

B Lokalisation von Chitin in der Zellwand der blasenartigen Struktur der Deletionsmutante. Die Vorgehensweise zur Anzucht des Pilzes sowie die Färbung mit Anilinblau und WGA entspricht der Erläuterung in A. Maßstab: 3 μ m.

Die Hyphenspitzen wurden von diesem Farbstoff nicht angefärbt. Eine besonders intensive Fluoreszenz war in der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase zu verzeichnen.

F. graminearum-spezifische Mannoproteine auf der Außenseite der pilzlichen Zellwand wurden durch den Einsatz von Con A visualisiert (Harris, 2005). Die Fluoreszenzintensität war in den Proben der Deletionsmutante sehr gering, was auf eine reduzierte, bezüglich der Hyphe, oder gar fehlende, im Fall der Blase, Glycoproteinschicht hinweist (Abb. 3-14 A, Con A-CFTM 594). Im Gegensatz dazu war eine durchgehend rote Con A-Fluoreszenz in der Hyphe des Wildtyps zu erkennen.

Während der mikroskopischen Untersuchung wurde ein besonderer Fokus auf die Zellwand der blasenartigen Strukturen von $\Delta pk1$ gelegt (Abb. 3-14 B). Die dargestellte Aufnahme zeigt die typische Verteilung und Intensität der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe Anilinblau und WGA. Deutliche Unterschiede zwischen der normal wachsenden $\Delta pk1$ -Hyphe und der $\Delta pk1$ -Blase bezüglich des WGA-Signals waren zu verzeichnen. Die stark ausgeprägte grüne Fluoreszenz in der Zellwand der blasenartigen Struktur weist auf einen erhöhten Chitingehalt oder bessere Zugänglichkeit des Farbstoffs hin (Abb. 3-14 B, WGA-CFTM 488A).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die drei eingesetzten Farbstoffe zuverlässig an die jeweils spezifischen Polysaccharide der Zellwand binden konnten. Auffällig waren dabei die intensive WGA-Fluoreszenz sowie das fehlende Con A-Signal hinsichtlich der blasenartigen Struktur der Deletionsmutante. Infolgedessen wurde angenommen, dass diese keine Mannoproteinschicht auf der Zellwandaußenseite besitzt, woraufhin die Zugänglichkeit des WGA-Farbstoffs erhöht wurde. Andererseits könnte auch ein erhöhter Chitingehalt Ursache für diese außergewöhnlich hohe Fluoreszenzintensität sein. Den Ergebnissen zufolge sind Zellwandmodifikationen seitens der Deletionsmutante zu verzeichnen.

3.2.5. Dokumentation von Ultrastrukturen in den Blasen von $\Delta pk1$ am Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

Aus den Aufnahmen vom konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Abb. 3-14) konnten erste Erkenntnisse zum Zellwandaufbau der blasenartigen Strukturen von $\Delta pk1$ gewonnen werden. So wurde vermutet, dass die Zellwände der Blasen einen erhöhten Chitingehalt besitzen. Im weiteren Verlauf sollte nun der strukturelle Aufbau der Zellwand in den Blasen der Deletionsmutante genauer untersucht werden.

Dazu wurden hochauflösende Aufnahmen am TEM generiert. Die untersuchten Proben wurden vorab 24 Stunden in CM-Flüssigmedium angezogen. Anschließend wurden diese fixiert, in LR-White Harz eingebettet und mit Hilfe eines Diamantenmessers in 70- 80 nm dicke Ultradünnschnitte präpariert. Eine Nachkontrastierung ermöglichte das Sichtbarmachen von Ultrastrukturen in den biologischen Proben.

Mithilfe dieser mikroskopischen Methode konnte eine Vielzahl von neuen Erkenntnissen bezüglich der Blasen und normal wachsenden Hyphen sowie zum Zellwandaufbau von $\Delta pk1$ gewonnen werden. Im Folgenden werden die Ultrastrukturen und das Phänomen des spontanen Zerplatzens erläutert.

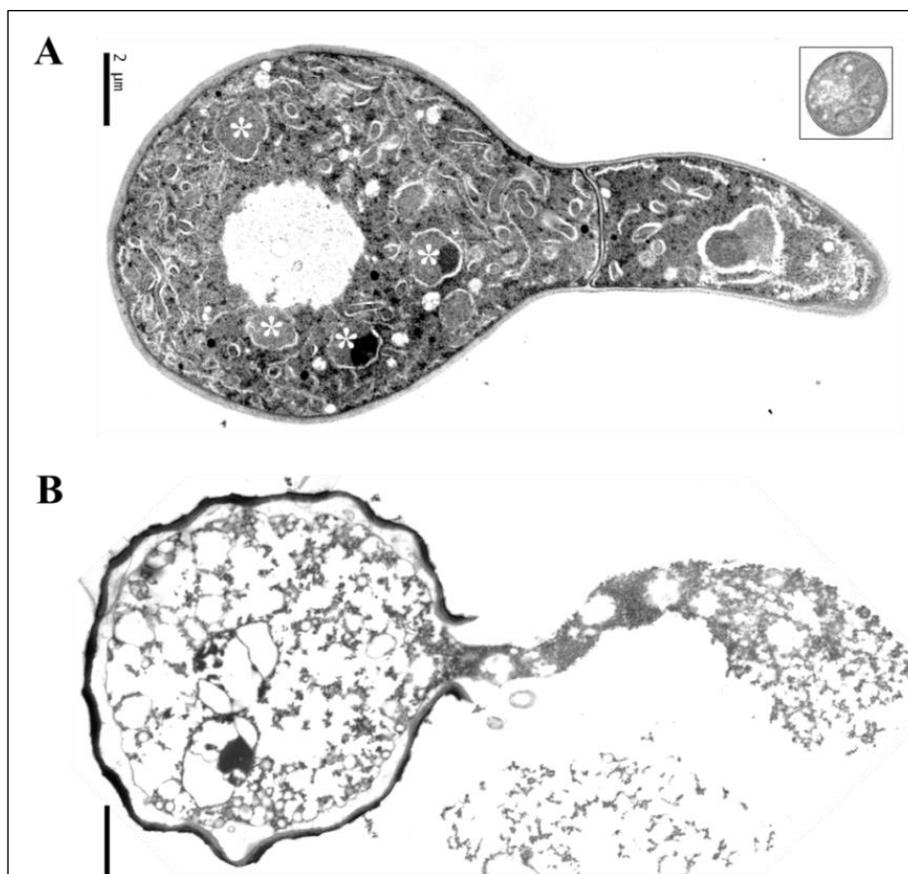


Abbildung 3-15: Ultrastrukturen und Zerplatzen einer Blase von $\Delta pk1$.

A Ultrastrukturen einer $\Delta pk1$ -Blase und Größenvergleich zum Wildtyp 8-1 (kleine Abbildung rechts oben). Die Proben wurden 24 Stunden in CM-Medium angezogen und durch ein mehrstufiges Verfahren fixiert, in LR-White Harz eingebettet und anschließend in 70- 80 nm dicke Ultradünnschnitte geschnitten. Die Blase beinhaltet vier sichtbare Zellkerne (weiße Sternchen) und eine relativ große Vakuole. Maßstab: 2 μ m.

B Dokumentation einer gerade auslaufenden $\Delta pk1$ -Blase. Über eine Pore strömt das Zytoplasma in die Umgebung. Maßstab: 2 μ m.

Die Abbildung zeigt die phänotypischen Unterschiede zwischen einer lebenden (**A**) und abgestorbenen Blase (**B**).

Wie bereits vorab beschrieben, besitzt die Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp mehrkernige Zellen (Abb. 3-10 E). Diese Beobachtung wurde in den TEM-Aufnahmen bestätigt, wobei die dargestellte Blase vier sichtbare Zellkerne beinhaltet (Abb. 3-15 A, weiße Sternchen). Ein weiterer herausragender Aspekt war der erhebliche Größenunterschied zwischen der blasenartigen Struktur von $\Delta pk1$ und der Hyphe des Wildtyps 8-1 (Abb. 3-15 A, Wildtyp kleines Bild rechts oben). Des Weiteren beinhaltet die Blase der Deletionsmutante eine relativ große Vakuole. Diese Erkenntnis wurde bereits im Durchlichtmikroskop dokumentiert (Abb. 3-13 B) und nun im TEM bestätigt. Das Zerplatzen einer Blase ist ein sehr häufig auftretender, jedoch schneller Vorgang, was eine mikroskopische Dokumentation erschwert (Abb. 3-13 A). Dennoch gelang es eine gerade auslaufende Blase im TEM zu fixieren (Abb. 3-15 B). Durch eine Pore in der Zellwand wurden zytoplasmatische Bestandteile in die Umgebung freigesetzt und die Zelle lysierte. Eindeutige Unterschiede zwischen einer intakten und abgestorbenen Blase waren anhand der erkennbaren Zellkompartimente auszumachen. In Abbildung 3-15 sind beide Zustände dargestellt.

Durch die hochauflösenden TEM-Aufnahmen konnten bereits vorhandene Ergebnisse verifiziert und neue Erkenntnisse bezüglich der Größenverhältnisse und Ultrastrukturen gewonnen werden.

3.2.6. Hyphen- und Zellwanddurchmesser der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp

Die hochaufgelösten TEM-Bilder gewähren einen tieferen Einblick in den strukturellen Aufbau der Pilzhypen verglichen zu den Aufnahmen des konfokalen Laserscanning-Mikroskops (Abb. 3-14). Nachdem die Ultrastrukturen und das Phänomen des Auslaufens einer $\Delta pk1$ Blase erläutert wurden (Abb. 3-15), werden nun weitere phänotypische Unterschiede bezüglich Hyphen- und Zellwanddurchmesser der Deletionsmutante und des Wildtypen aufgezeigt.

So wurde nicht nur ein erheblicher Größenunterschied zwischen der blasenartigen Struktur von $\Delta pk1$ und der Wildtyp-Hyphe beobachtet (Abb. 3-15 A), sondern auch beim Vergleich der Hyphendurchmesser beider Pilzstämmen (Abb. 3-16 A). Die Hyphen von 8-1 besaßen im Mittel einen Durchmesser von 3000 nm und die von der Deletionsmutante einen von 5043 nm. Das ergibt einen signifikanten Größenunterschied von etwa 60 % (Abb. 3-16 A, Gruppe a und b).

Im Anschluss wurde der Zellwanddurchmesser beider Pilzstämmen statistisch analysiert. Dieser war in der normal wachsenden Hyphe von $\Delta pk1$ doppelt so groß im Vergleich zur Wildtyp-Hyphe (Abb. 3-16 B, 8-1: 60 nm, $\Delta pk1$ -Hyphe: 120 nm). Die Zellwände in den blasenartigen Strukturen von $\Delta pk1$ erreichten sogar einen mittleren Wert von 185 nm. Diese signifikanten Unterschiede in der Zellwanddicke der drei betrachteten Zelltypen wurden in der direkten Gegenüberstellung besonders deutlich (Abb. 3-16). Auffallend waren zudem Unterschiede in der Elektronendichte der äußeren Zellwandschicht von 8-1 und $\Delta pk1$, was auf strukturelle Modifikationen hindeutet.

Die Deletion der Proteinkinase FgPK1 hat den Ergebnissen zufolge maßgeblich Einfluss auf den Hyphen- und Zellwanddurchmesser von *F. graminearum*. Im Gegensatz zur Deletionsmutante zeigte der Wildtyp eine hohe Elektronendichte (schwarzer Bereich) an der Außenseite der Zellwand, was auf eine Anreicherung von Proteinen hinweist (Klis, 1994). Inwiefern dieser Phänotyp mit den bisher beschriebenen Wachstumsdefiziten von $\Delta pk1$ einhergeht, ist derzeit unklar.

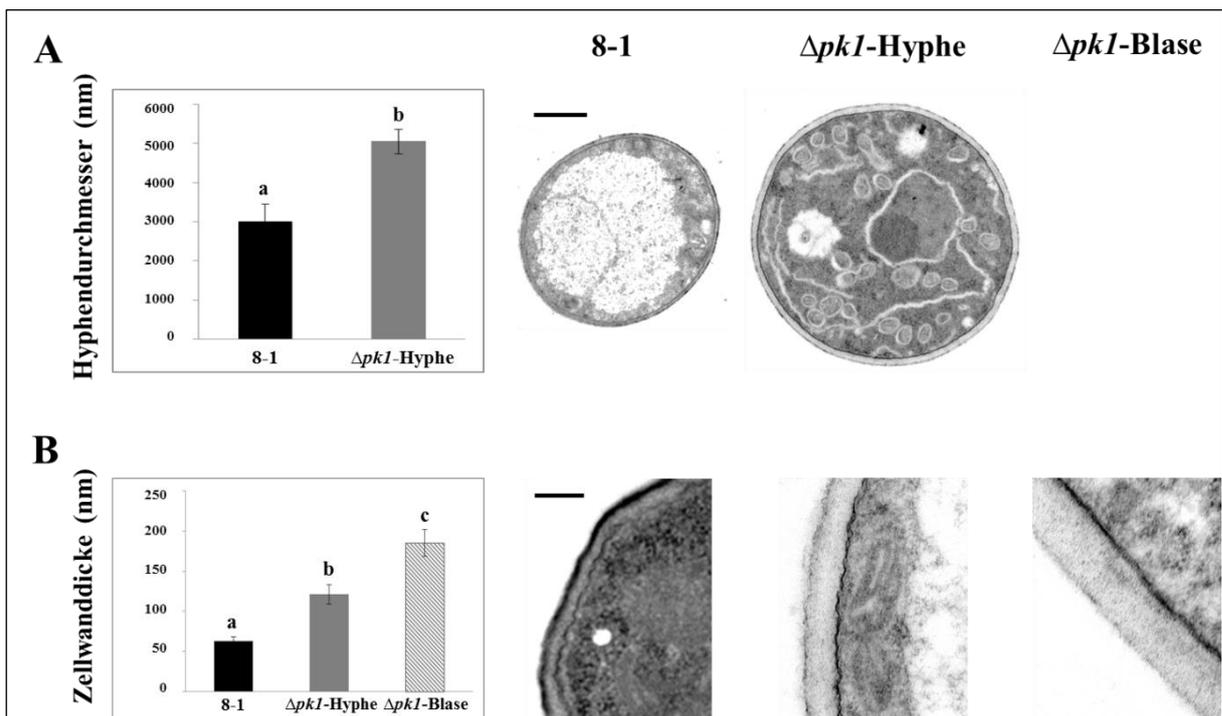


Abbildung 3-16: Unterschiede im Hyphen- und Zellwanddurchmesser von $\Delta pk1$ und 8-1.

A Ermittelte Hyphendurchmesser (nm) der Deletionsmutante und des Wildtyps. Die TEM-Aufnahmen sind maßstabgetreu abgebildet (schwarzer Balken entspricht 1 μ m). Test der statistischen Signifikanz gegenüber PH-1, Student's t-Test, a und b stellen Gruppen mit $P < 0,001$ dar, Fehlerbalken: Standardabweichungen, $n = 25$.

B Mittlere Werte der Zellwanddicke (nm) von 8-1, $\Delta pk1$ -Hyphe und $\Delta pk1$ -Blase. Maßstab: 200 nm. Test der statistischen Signifikanz gegenüber allen Zelltypen, Einfaktorielle ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm, a, b und c geben Gruppen an mit stets $P < 0,001$, Fehlerbalken: Standardabweichungen, $n = 30$.

3.2.7. Visualisierung von Chitin und (1,3)- β -Glucan durch Immunogoldmarkierung

Die beschriebenen Unterschiede im Durchmesser und der Kontrastierung der Zellwände von $\Delta pk1$ und 8-1 (Abb. 3-16 B) gaben Grund zur Annahme, dass strukturelle Zellwandmodifikationen vorliegen. Diese Vermutung sollte im folgenden Versuch durch die hochspezifische Methode der Immunogoldmarkierung näher untersucht werden.

Dazu wurden die Ultradünnschnitte der Wildtyp- und Mutantenproben in einer verdünnten WGA-CFTM 488A-Lösung inkubiert. Dieses Fluorophor, welches auch am konfokalen Laserscanning-Mikroskop eingesetzt wurde, bindet an das Zellwandpolymer Chitin. Anschließend erfolgte die Markierung des Wheat Germ Agglutinins mit einem entsprechenden primären Anti-WGA-Antikörper. Letzterer wurde mit einem sekundären Gold-gekoppelten Antikörper detektiert. Im Elektronenmikroskop erschienen diese Goldpartikel als schwarze Punkte und ermöglichten somit die Lokalisation des gewünschten Proteins. In gleicher Weise wurde die Immunogoldmarkierung des (1,3)- β -Glucans vorgenommen. Hierbei wurde das Zellwandpolymer direkt mit einem primären Anti-(1,3)- β -Glucan-Antikörper markiert und anschließend mit dem sekundären Gold-Antikörper detektiert. Zu jeder Antikörperbehandlung wurden entsprechende Kontrollen angefertigt, um die Spezifität der Antikörper zu überprüfen.

Auch in diesem Versuchsansatz standen die blasenartigen Strukturen der Deletionsmutante im Fokus der Untersuchungen. Daher wurde deren Zellwand mit der des Wildtyps verglichen (Abb. 3-17). Deutliche Unterschiede waren in der Anzahl und Verteilung der Goldpartikel bezüglich der Chitinmarkierung erkennbar (Abb. 3-17 A), wobei eine hohe Dichte in der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase zu verzeichnen war. Diese befanden sich vermehrt an der Außenseite, was auf eine stark ausgeprägte oder zusätzlich aufgelagerte Chitinschicht hinwies (Abb. 3-17 A, $\Delta pk1$ -Blase, vergrößerte Ausschnitte). Die Aufnahme der $\Delta pk1$ -Blase vom konfokalen Laserscanning-Mikroskop zeigte zudem ein intensives grünes WGA-Fluoreszenzsignal (Abb. 3-14 B und 3-17 A, links oben). Demnach korrespondieren die Ergebnisse beider Mikroskopiemethoden.

In der Zellwand des Wildtyps war eine kontinuierliche Verteilung der Goldpartikel zu verzeichnen (Abb. 3-17 A, Mitte). Eine Schichtung oder Muster konnte nicht beobachtet werden und die Anzahl der schwarzen Markierungen war deutlich geringer im Vergleich zur Deletionsmutante. Die Kontrolle zeigte keinerlei Goldpartikelmarkierungen, was die Spezifität der eingesetzten Antikörper bestätigte.

In den abgebildeten TEM-Aufnahmen zur Immunogoldmarkierung des (1,3)- β -Glucans sind kaum Unterschiede zwischen der Deletionsmutante und dem Wildtyp zu erkennen

(Abb. 3-17 B). In beiden Proben waren die Goldpartikel gleichmäßig über die gesamte Zellwand verteilt. Dennoch waren in der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase mehr schwarze Signale zu verzeichnen, was auf die erhöhte Zellwandstärke zurückzuführen sein könnte. Somit bestanden relativ betrachtet keine nennenswerten Unterschiede in der Markierung des (1,3)- β -Glucans. Die Kontrolle zeigte erwartungsgemäß keine Goldpartikel.

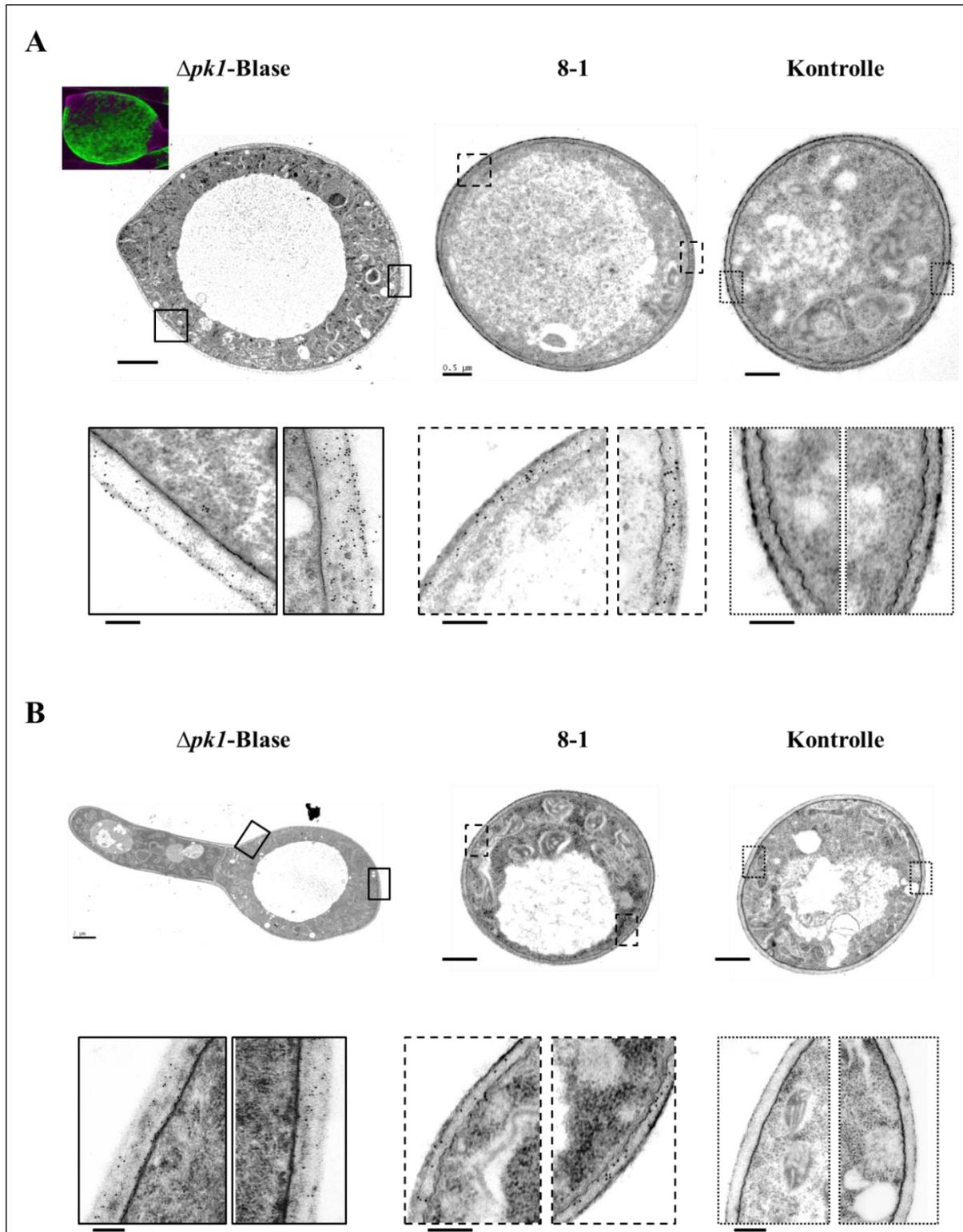


Abbildung 3-17: Immunogoldmarkierung von Chitin und (1,3)- β -Glucan.

A Immunogoldmarkierung von Chitin in den Zellwänden einer $\Delta pk1$ -Blase und dem Wildtyp. Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Fluorophor WGA-CFTM 488A inkubiert, welches spezifisch an Chitin bindet. Ein primärer Anti-WGA-Antikörper wurde anschließend hinzugegeben, gefolgt von einem sekundären Gold-gekoppelten Antikörper. Im Elektronenmikroskop erscheinen die Goldpartikel als schwarze Punkte und ermöglichen die Lokalisation des Chitins. In der Kontrolle sind keine Goldpartikel zu entdecken (Behandlung ohne primären Antikörper). Maßstab: Übersicht $\Delta pk1$ -Blase: 2 μ m, Übersicht 8-1 und Kontrolle: 0,5 μ m, Vergrößerungen: 200 nm.

B Immunogoldmarkierung des (1,3)- β -Glucans. Die Ultradünnschnitte wurden direkt mit einem primären Anti-1,3- β -Glucan-Antikörper behandelt, welcher durch den sekundären Gold-gekoppelten Antikörper detektiert wurde. In der Kontrolle sind keine Goldpartikel zu entdecken (Behandlung ohne primären Antikörper). Maßstab: Übersicht $\Delta pk1$ -Blase: 2 μ m, Übersicht 8-1 und Kontrolle: 0,5 μ m, Vergrößerungen: 200 nm.

Die Ergebnisse der Immunogoldmarkierung von Chitin offenbarten erhebliche Unterschiede zwischen der Deletionsmutante und dem Wildtyp. Die Zellwand von $\Delta pk1$ scheint demnach einen erhöhten Chitingehalt und/ oder eine nach außen exponierte Chitinschicht zu besitzen. Dies entspräche nicht dem klassischen Zellwandaufbau von Pilzen (Abb. 1-2). Bezüglich des goldmarkierten (1,3)- β -Glucans konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

3.2.8. Vernetzung zwischen Chitin- und (1,3)- β -Glucan-Filamenten in der Zellwand der blasenartigen Strukturen von $\Delta pk1$

Die Auswertung der Immunogoldmarkierung von Chitin ergab beachtliche Unterschiede zwischen den Stämmen $\Delta pk1$ und 8-1 bezüglich der Goldpartikelanzahl und -verteilung (Abb. 3-17 A). Demnach wurde in der Zellwand der blasenartigen Strukturen der Deletionsmutante ein erhöhter Chitingehalt und/ oder eine exponierte Chitinschicht vermutet. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde im Folgenden eine weitere hochauflösende fluoreszenzbasierte Mikroskopiemethode, die sogenannte direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie (*dSTORM*) angewandt (Heilemann *et al.*, 2008). Zelluläre Strukturen in lebenden Organismen können hierbei mit Standardfluoreszenzfarbstoffen visualisiert und deren Position im Nanometerbereich bestimmt werden.

Für diesen Versuch wurden Konidien der Deletionsmutante und des Wildtyps 24 Stunden in CM-Vollmedium angezogen. Anschließend erfolgte eine Markierung des Chitins mit dem Fluoreszenzfarbstoff WGA-Alexa Fluor[®] 647. Das (1,3)- β -Glucan wurde mit einem sensitiven Anilinblau-Fluorochrom angefärbt. Die Spezifität der verwendeten Farbstoffe

konnte vor Beginn der Mikroskopie im Epifluoreszenzmikroskop überprüft werden. Das Muster der fluoreszierenden Signale entsprach den Erwartungen und Erfahrungen, wie sie bereits am konfokalen Laserscanning-Mikroskop gemacht wurden. Im Fokus stand die Analyse des Zellwandaufbaus der blasenartigen Struktur von $\Delta pk1$ im Vergleich zur Hyphe des Wildtyps 8-1. Die *dSTORM*-Bilder wurden in Zusammenarbeit mit dem Heinrich-Pette-Institut – Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie von Dr. Dennis Eggert aufgenommen und mittels computergestützter Software ausgewertet. Durch den Einsatz verschiedener Laser war es möglich, die zwei verwendeten Fluorochrome in einer Aufnahme darzustellen.

Die vollendete Rekonstruktion der aufgenommenen Mikroskopiebilder zeigt blaue und rote Markierungen sowie pinke Überlagerungsbereiche beider Farben (Abb. 3-18 A). Dabei sind die Fluoreszenzsignale des Anilinblaus blau und die des WGAs rot dargestellt. Die farblichen Strukturen innerhalb der untersuchten Zellen sind mikroskopische Artefakte, da die Abbildung eine 2 D-Projektion zeigt und auftretende starke Signale ober- und unterhalb der Fokusebene detektiert wurden.

Für eine genauere Analyse des Zellwandaufbaus der $\Delta pk1$ -Blase und der Hyphe von 8-1 wurden Zellwandbereiche in den farblich markierten Rechtecken (Abb. 3-18 A) hochaufgelöst und vergrößert dargestellt. Zur besseren Übersicht und Verständnis der Ergebnisse wurden die detektierten Fluoreszenzsignale zudem getrennt abgebildet. Der gelb markierte Bereich zeigt die Berührungs- und Überlappungszone beider Farbstoffe (Abb. 3-18 B). Im Fall der blasenartigen Struktur der Deletionsmutante wurden drei verschiedene Bereiche der Zellwand ausgewertet. So zeigte der vergrößerte Zellwandbereich des Hyphenabschnitts vor der Blase (Abb. 3-18 B, gelbes Rechteck) einen ausgeprägten Überlappungsbereich von Anilinblau und WGA. Dabei fiel auf, dass das WGA, im Gegensatz zum Anilinblau, die Zellwand nicht kontinuierlich färben konnte. Dies wurde bereits in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie beobachtet (Abb. 3-14). Die Vergrößerung des Zellwandausschnitts der $\Delta pk1$ -Blase ließ eine klare Schichtung des Anilinblau und WGA mit einem sehr kleinen Kontaktbereich erkennen (Abb. 3-18 B, grünes Rechteck). Zudem befand sich die rote WGA-Schicht auf der Außenseite der Zellwand, was die Ergebnisse der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (Abb. 3-14 B) und der Transmissionselektronenmikroskopie (Abb. 3-17) bestätigt. Ein weiteres interessantes Phänomen, nämlich die Neusynthese der Zellwand an der Hyphen- bzw. Blasenspitze der Deletionsmutante, konnte einmalig beobachtet werden (Abb. 3-18 B, weißes Rechteck). Auch hier zeigte die hochaufgelöste Vergrößerung

übereinanderliegende WGA- und Anilinblauschichten. Im Fall des Wildtyps wurde beispielhaft ein charakteristischer Zellwandbereich vergrößernd dargestellt (Abb. 3-18 B, rotes Rechteck). Auffallend war der ausgeprägte gelbe Überlappungsbereich vom WGA und Anilinblau. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Zellwand der normal wachsenden Hyphes der Deletionsmutante (Abb. 3-18 B, gelbes Rechteck). Eine Abgrenzung der Fluoreszenzsignale, wie sie bei der $\Delta pk1$ -Blase zu verzeichnen war, konnte in keiner Probe beobachtet werden.

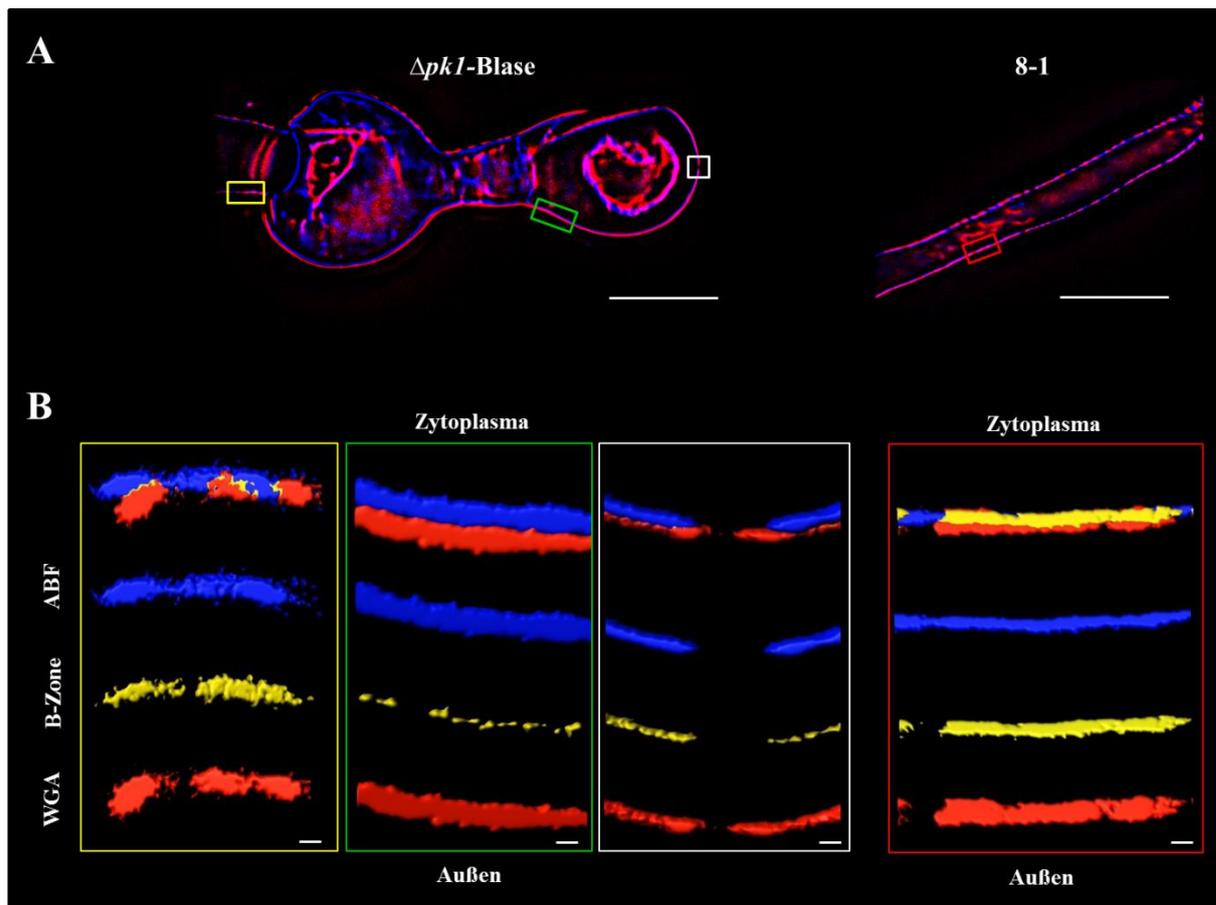


Abbildung 3-18: HOCHAUFLÖSENDE *dSTORM*-AUFNAHMEN ZUM ZELLWANDAUFBAU DER $\Delta pk1$ -BLASE UND DES WILDTYPS.

A Übersichtsaufnahmen einer $\Delta pk1$ -Blase sowie des Wildtyps. Die ausgewachsenen Pilzhyphen wurden mit den Fluoreszenzfarbstoffen Anilinblau (blau dargestellt) und WGA-Alexa Fluor[®] 647 (rot dargestellt) nach Herstellerangaben inkubiert. Anilinblau interkaliert in die (1,3)- β -Glucan-Helices und das Lektin WGA bindet spezifisch an Chitin. Auftretende Ko-Lokalisationen beider Farbstoffe wurden durch pink gefärbte Bereiche dargestellt. Die sichtbaren Strukturen innerhalb der Zellen sind mikroskopische Artefakte, die bei der computergestützten Rekonstruktion entstanden. Maßstab: 10 μ m.

B Vergrößerungen von ausgewählten Zellwandbereichen (siehe farbige Rechtecke in A). Das obere der vier Abbildungen zeigt den jeweiligen Ausschnitt. Zur besseren Übersicht wurden die Fluoreszenzsignale einzeln dargestellt (ABF: Anilinblau-Fluorochrom, WGA: WGA-Alexa Fluor[®] 647). Die Überlagerungs- und Berührungzone beider Farbstoffe ist gelb markiert (B-Zone). Hyphenzellwand von $\Delta pk1$ (gelbes Rechteck), Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase (grünes Rechteck), Zellwandneusynthese an der Spitze der blasenartigen Struktur (weißes Rechteck) und Zellwand des Wildtyps (rotes Rechteck). Maßstab: 100 nm.

Überträgt man die Bedeutung der Fluoreszenzsignale auf das jeweilige Zellwandpolymer, so steht die blaue Markierung für das (1,3)- β -Glucan-Netzwerk und die roten WGA-Signale für die Chitinschicht. Eine Ko-Lokalisation beider Zellwandzucker sind durch pinke Farbbereiche in den Übersichtsaufnahmen und gelbgefärbte Abschnitte in den hochaufgelösten Vergrößerungen dargestellt. Demzufolge existiert eine starke Vernetzung beider Zellwandpolymere in den Hyphenzellwänden der Deletionsmutante und des Wildtyps. Im Gegensatz dazu scheint die Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase aus zwei, zum Teil vollkommen separierten (1,3)- β -Glucan- und Chitinschichten zu bestehen. Diese verringerte Vernetzung führt vermutlich zur Instabilität der Zellwand und könnte die Erklärung für das schnelle und spontane Entstehen sowie Zerplatzen der Blasen sein.

3.2.9. Zellwandanalyse der Deletionsmutante und des Wildtyps mittels HPAEC-PAD

Nachdem der strukturelle Zellwandaufbau von $\Delta pk1$ und des Wildtyps mikroskopisch analysiert und signifikante Unterschiede erläutert wurden, sollte nun die chemische Zusammensetzung (nach François, 2007), mithilfe einer Quantifizierung von extrahierten Monosacchariden aus den pilzlichen Zellwänden beider Stämme, untersucht werden. Aufgrund der bisher beschriebenen phänotypischen Veränderungen bezüglich der Zellwand von $\Delta pk1$ waren Modifikationen hinsichtlich der Zellwandkomposition anzunehmen.

Für die Extraktion von Zellwandzucker wurde lyophilisiertes, gemörsertes Myzel von zwei unabhängigen Deletionsmutanten $\Delta pk1$ #1 und #2 sowie 8-1 mit 72 % iger Schwefelsäure versetzt. Durch die chemische Hydrolyse wurden langkettige Polysaccharide in ihre molekularen Bausteine gespalten. Anschließend wurden die Monosaccharide mittels HPAEC-PAD bestimmt.

Die maßgebenden Monosaccharide der pilzlichen Zellwand (François, 2007) sind vor allem Glucosamin, als Baustein für Chitin (Roncero, 2002; Free, 2013), Glukose, die hauptsächlich zur Synthese von (1,3)- β -Glucan-Filamenten benötigt wird (Aspinall und Kessler, 1957; Bacic *et al.*, 2009) sowie Galaktose und Mannose, welche zur Bildung des Galaktomannans beitragen (François, 2007). Diese vier Zucker wurden in den Zellwänden der untersuchten Proben detektiert und quantifiziert (Abb. 3-19). Auffallend waren die signifikanten Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp bezüglich der Monosaccharid-Konzentrationen von Glucosamin und Glukose. Demnach bestand die Zellwand von $\Delta pk1$ #1 und #2 aus rund 60 % Glucosamin, was dem doppelten Gehalt des

Wildtyps entsprach (8-1: 28 %). Andererseits sank der Glukosegehalt der Mutanten auf 27 % und 29 %, wohingegen der Wildtyp einen Wert von 52 % erreichte (Abb. 3-19). Diese relative Verschiebung in der Zellwandzusammensetzung der Deletionsmutante zum Glucoamin und letztendlich Chitin hin, wurde bereits anhand der zuvor durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen vermutet (Abb. 3-14 und 3-17) und konnte nun bestätigt werden. Seitens der Galaktose und Mannose konnten ebenfalls unterschiedliche Werte zwischen dem Wildtyp und den getesteten Mutanten ermittelt werden, diese sind jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 3-19). Dennoch beinhalteten die Zellwände der Deletionsmutanten weniger Galaktose und Mannose, was auf eine Reduktion des Galaktomannans und folglich der Proteinschicht auf der Zellwandaußenseite hinweist.

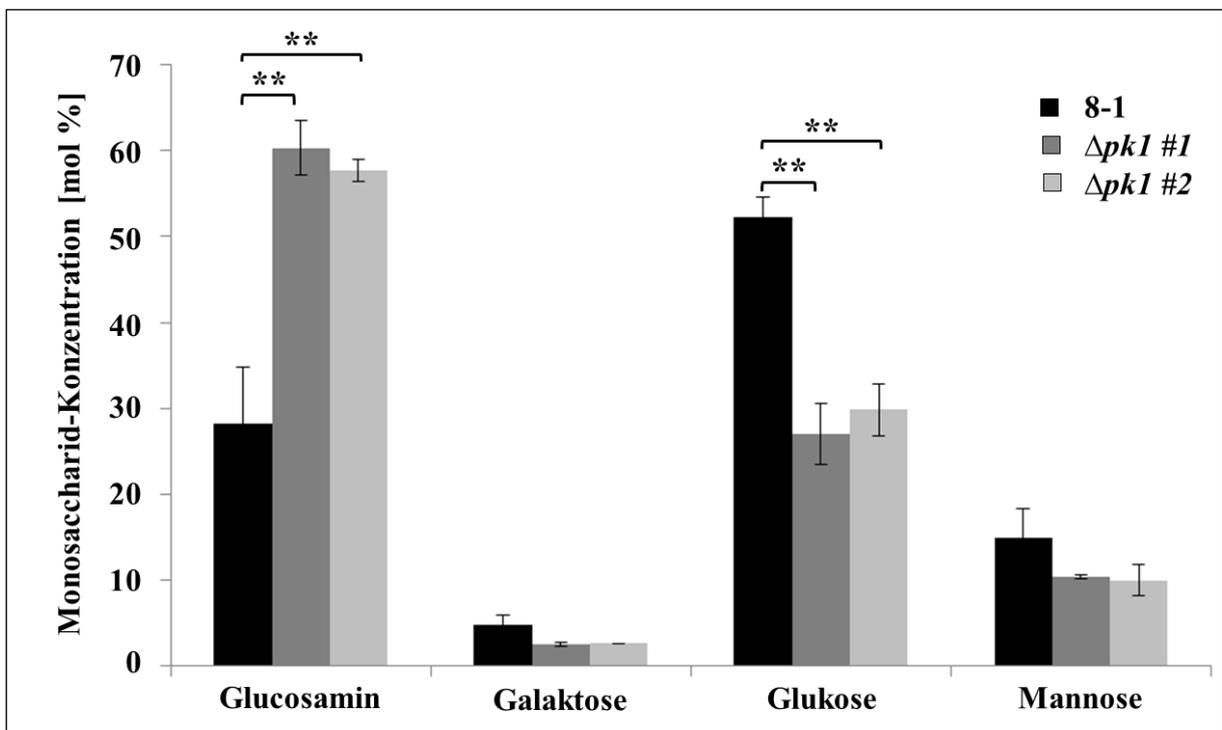


Abbildung 3-19: Monosaccharid-Bestimmung aus Zellwandextrakten von $\Delta pk1$ und des Wildtyps.

Die Monosaccharide wurden mittels chemischer Hydrolyse aus Zellwandextrakten gewonnen und durch HPAEC-PAD analysiert. Verglichen wurden zwei unabhängige Deletionsmutanten mit dem Wildtyp 8-1. Dargestellt sind relative Monosaccharid-Konzentrationen der vier maßgeblichen Monosaccharide pilzlicher Zellwände (Glucosamin, Galaktose, Glukose und Mannose). Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Test der statistischen Signifikanz gegenüber 8-1, Einfaktorielle ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm mit stets $**P < 0,01$; Fehlerbalken: Standardabweichungen.

Das Ergebnis der Zellwandanalyse von $\Delta pk1$ zeigte eine deutliche Verschiebung der Zellwandpolysaccharide im Fall des Chitins und (1,3)- β -Glucans. Diese Modifikationen wurden bereits mikroskopisch in den blasenartigen Strukturen der Deletionsmutante beobachtet und erläutert. Inwiefern eine Variation in der Zusammensetzung der Zellwandzucker zwischen den normal wachsenden $\Delta pk1$ -Hyphen und -Blasen vorliegt, kann zu diesem Zeitpunkt nicht gesagt werden.

3.2.10. Expressionsanalyse der Chitinsynthase- und (1,3)- β -Glucansynthase-Gene im Pilzmyzel von $\Delta pk1$ und dem Wildtyp

Die Zellwandanalyse ergab eine relative Erhöhung des Chitins und gleichzeitig eine Reduktion von (1,3)- β -Glucan in den Proben der Deletionsmutante. Ursache für dieses Ergebnis könnten unterschiedlich starke Genexpressionen von Zellwand-synthetisierenden Proteinen sein. Deswegen sollte nun eine Expressionsanalyse essentieller Gene zum Aufbau der pilzlichen Zellwand ((1,3)- β -Glucansynthase sowie Chitinsynthasen) durchgeführt werden.

Die entsprechenden Gene wurden mithilfe der Datenbank *Broad Institute* (Stand Februar 2016) identifiziert. Die Expressionsstärken der (1,3)- β -Glucansynthase *FgGSL1* und sechs putativen Chitinsynthasen (*Fgchs 1*, *Fgchs 2*, *Fgchs 3*, *Fgchs 4*, *Fgchs 6* und *Fgchs X*) wurde mithilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qPCR) bestimmt. Vorab wurde RNA aus 24 Stunden gewachsenem Pilzmyzel isoliert und mittels *Reverser Transkriptase* in cDNA umgeschrieben.

Die im Folgenden dargestellten Expressionswerte von $\Delta pk1$ #1 und #2 zeigen die relative Genexpression im Vergleich zur 8-1-Expression des jeweiligen Gens. Der ermittelte Wert des Wildtyps wurde dazu auf ein Expressionsniveau von 1,0 gesetzt (Abb. 3-20, gestrichelte Linie).

Die Ergebnisse lassen eine stets erhöhte Expression aller getesteten Gene in den Proben der Deletionsmutanten erkennen (Abb. 3-20). *Fgchs 3* erreichte eine um 2,5-fach höhere Expressionsstärke verglichen zum Wildtyp. Signifikante Unterschiede wurden ebenfalls für *Fgchs 1*, *Fgchs 2*, *Fgchs 4* und *Fgchs 6* berechnet, jedoch wiesen diese nur eine leicht gesteigerte Genexpression auf, die maximal das 1,5-fache betrug. Nennenswerte Abweichungen in den Proben von $\Delta pk1$ #1, #2 und 8-1 bezüglich des Expressionsniveaus des (1,3)- β -Glucansynthase-Gens *FgGSL1* wurden nicht beobachtet (Abb. 3-20).

Der erhöhte Chitingehalt in den Zellwänden der Deletionsmutante (Abb. 3-19) könnte demnach eine Folge der gesteigerte Genexpression von *Fgchs 3* sein.

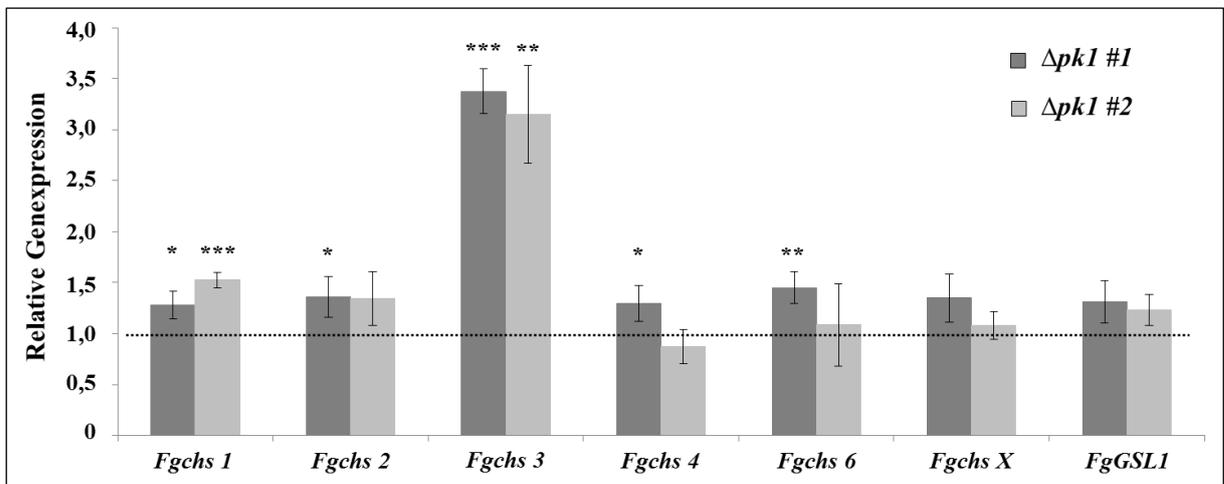


Abbildung 3-20: Expressionsprofil essentieller Gene zum Aufbau der pilzlichen Zellwand von $\Delta pk1$.

Aus Pilzmyzel von zwei unabhängigen Deletionsmutanten und dem Wildtyp wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Letztere wurde in der quantitativen Real-Time-PCR (qPCR) zur Messung der Genexpression der (1,3)- β -Glucansynthase *FgGSL1* und sechs putativen Chitinsynthasen eingesetzt. Expressionsniveau des Wildtyps 8-1 wurde stets auf 1,0 gesetzt (gestrichelte schwarze Linie).

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. Test der statistischen Signifikanz gegenüber 8-1, Einfaktorielle ANOVA; Posthoc-Test: Bonferroni-Holm mit * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; Fehlerbalken: Standardabweichungen.

4. Diskussion

4.1. Bedeutung des Zellwand-Strukturproteins (1,3)- β -Glucansynthase in *F. graminearum*

F. graminearum ist ein Blütenpathogen, das insbesondere Weizen und Mais befällt (Goswami und Kistler, 2004). Die landwirtschaftlichen Folgen sind sowohl quantitative Einbußen, als auch qualitative Verluste, da das Pathogen durch die Sekretion von Mykotoxinen das Erntegut kontaminiert (McMullen *et al.*, 1997). Diese Giftstoffe können die Gesundheit von Mensch und Tier stark beeinträchtigen (D'Mello *et al.*, 1999). Daher ist es von größter Bedeutung die Pathogenität von *F. graminearum* näher zu untersuchen.

Neben Chitin besteht die pilzliche Zellwand hauptsächlich aus (1,3)- β -Glucan (Latgé und Beauvais, 2014), welches in der vorliegenden Doktorarbeit den Untersuchungsschwerpunkt darstellt. Dieses Polysaccharid wird von dem Enzym (1,3)- β -Glucansynthase (kurz: GSL) synthetisiert. Trotz der beachtlichen Bedeutung ist bisher nur wenig über die Biosynthese und Regulation von pilzlichen (1,3)- β -Glucansynthasen bekannt.

F. graminearum besitzt, wie viele filamentöse Pilze, nur ein Gen zur Expression der (1,3)- β -Glucansynthase (Ha *et al.*, 2006; Oliveira-Gracia und Deising, 2013; Latgé, 2007). Zur Identifizierung dieses Gens im PH-1-Hintergrund wurde die Datenbank des *Broad Instituts* herangezogen. Die bioinformatischen Erkenntnisse der FgGSL1 stimmen mit den Proteinstrukturen bekannter (1,3)- β -Glucansynthasen anderer filamentöser Pilze wie *A. nidulans* (Kelly *et al.*, 1996), *A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2001), *C. graminicola* (Oliveira-Gracia und Deising, 2013), *Alternaria infectoria* (Anjos *et al.*, 2012) und *N. crassa* (Tentler *et al.*, 1997; Sánchez-León und Riquelme, 2015) überein. Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Generierung einer Deletionsmutante von *single-copy* (1,3)- β -Glucansynthasen nicht möglich ist (Latgé, 2007; Ha *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 1999). Aufgrund dessen sollte eine umfassende biologische Charakterisierung des, für *F. graminearum*, essentiellen Enzyms FgGSL1 in dieser Arbeit durchgeführt werden.

4.1.1. Klonierungsstrategien zur Generierung eines fluoreszierenden Fusionsproteins der (1,3)- β -Glucansynthase *in vivo*

Um Lokalisationsstudien der *F. graminearum* eigenen (1,3)- β -Glucansynthase *in vivo* durchführen zu können, wurde das Zielprotein am C-Terminus mit GFP fusioniert (Abb. 3-1 A) und anschließend eine zielgerichtete Transformation in den nativen *FgGSLI*-Lokus durchgeführt. Die erhaltene Transformationsrate von einem Prozent (eine positive Mutante unter 90 Primärtransformanden) ist ungewöhnlich niedrig im Vergleich zu anderen *F. graminearum*-Transformationen mit ähnlich großen Konstrukten und selben Transformationsprotokoll (Birgit Haderl, mündliche Mitteilung, AG Molekulare Phytopathologie, Biozentrum Klein Flottbek). Dies deutet auf einen schwer zugänglichen Genlocus hin, was aufgrund der essentiellen Funktion der (1,3)- β -Glucansynthase (Latgé, 2007) nicht ungewöhnlich erscheint. Molekularbiologische Untersuchungen der einzigen erhaltenen Mutante *GFP-GSLI A-1* bestätigen die homologe Integration der Klonierungskassette (Abb. 3-1 B) sowie eine Einfachintegration des Zielkonstrukts in den nativen Genlocus von *FgGSLI* (Abb. 3-1 C). In einer anschließenden mikroskopischen Untersuchung am konfokalen Laserscanning-Mikroskop konnte kein membranständiges GFP-Signal detektiert werden (nicht gezeigt). Zur Kontrolle der exakten Einstellungen des Mikroskops sowie der einwandfreien Funktionsfähigkeit des Argon-Lasers wurde eine *F. graminearum*-Mutante mit konstitutiv exprimierenden und zytosolisch lokalisiertem GFP hinzugezogen. Eine Fehlfunktion konnte demnach ausgeschlossen werden. Aufgrund der ausbleibenden Fluoreszenz wurde das Vorhandensein des *FgGSLI-GFP*-Transkripts überprüft. Eine Bande in der erwarteten Größe konnte identifiziert werden (Abb. 3-1 D). Weitere Ursachen für die fehlende GFP-Fluoreszenz könnten Punktmutationen und/ oder eine Verschiebung des offenen Leserahmens sein, die während des Klonierungs- und Transformationsvorgangs auftreten können. Deshalb wurden das klonierte Plasmid *pRS426:GSLI-GFP* sowie die *FgGSLI-GFP*-Sequenz im *F. graminearum*-Genom der Mutante *GSLI-GFP A-1* sequenziert. Es konnten keine Abweichungen zur annotierten Basenpaarabfolge identifiziert werden (nicht gezeigt). Da nach wiederholten Transformationen keine weiteren homolog integrierten Mutanten erhalten wurden, wurde eine neue Klonierungsstrategie angewandt.

Der bedeutendste Unterschied zur ersten Klonierungsmethode bestand darin, dass nicht die gesamte annotierte, 6 kb große, genomische Sequenz von *FgGSLI* kloniert werden musste, sondern nur ein kleineres Fragment von etwa 3 kb. Dabei wurde GFP mit dem C-Terminus von *FgGSLI* fusioniert (Abb. 3-2 A), was letztendlich zum gleichen *FgGSLI-GFP*-

Konstrukt, wie oben erläutert, führt. Eine erfolgreiche Transformation dieser Art sowie vielversprechende Lokalisationsstudien der (1,3)- β -Glucansynthase konnten bereits Oliveira-Garcia und Deising (2013) in dem phytopathogenen Pilz *C. graminicola*, Verursacher der Anthraknose-Blattkrankheit (Crouch und Beirn, 2009), zeigen. Diese Methode erhöhte die Klonierungs- und Transformationsrate erheblich, da nach der ersten Transformation 12 homolog integrierte Mutanten identifiziert wurden. Im weiteren Verlauf wurden zwei unabhängige Transformanden *GSL1-GFP B-1* und *B-2* molekularbiologisch charakterisiert (Abb. 3-2). Eine homologe Integration in den nativen *FgGSL1*-Genloкус sowie eine Einfachintegration ins *F. graminearum*-Genom konnten nachgewiesen werden (Abb. 3-2 B und C). Auch diese Mutanten wiesen kein membranständiges GFP-Signals auf, jedoch konnte die Genexpression des Fusionskonstrukts *FgGSL1-GFP* bestätigt werden (Abb. 3-2 D). Im Gegensatz zu den *F. graminearum GSL1-GFP*-Stämmen *A-1*, *B-1* und *B-2*, konnten Oliveira-Garcia und Deising eine deutliche GFP-Fluoreszenz an den Hyphenspitzen der *GSL1-eGFP*-Transformanden in *C. graminicola* beobachten. Durch eine zusätzliche Färbung der Plasmamembran mit dem rot-fluoreszierenden Membranmarker FM-464 wurde eine Ko-Lokalisation beider Signale identifiziert und somit die Bestätigung, dass *GSL1-eGFP* ein integrales Membranprotein ist, erbracht (Oliveira-Garcia und Deising, 2013).

Die Ergebnisse zur molekularbiologischen Charakterisierung der Stämme *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2* offenbarten die korrekte Integration des Fusionskonstrukts in den nativen *FgGSL1*-Lokus, jedoch wies keine Mutante ein GFP-Signal auf. Aufgrund dessen wurde als Ursache für die fehlende GFP-Fluoreszenz eine inkorrekte Proteinfaltung angenommen. Diese postulierte Hypothese sollte durch eine Proteinaufreinigung und anschließender Enzym-aktivitätsmessung verifiziert werden. Eine Proteinisolierung von *FgGSL1-GFP* unter nativen Bedingungen nach den Vorgaben von Smith (2011) sollte vorgenommen werden. Durch den zusätzlichen Einsatz der GFP-Trap[®]-Methode (ChromoTek GmbH, Planegg-Martinsried, Deutschland) sollte das Zielprotein von weiteren integralen und assoziierten Membranproteinen isoliert und anschließend die enzymatische Aktivität mithilfe eines, von Voigt *et al.* (2006) etablierten Versuchsaufbau zur Bestimmung der (1,3)- β -Glucansynthase-aktivität, bestimmt werden. Weder das Aufreinigungsprotokoll von Smith (2011), dessen Optimierung, noch die Anwendung weiterer Aufreinigungsmethoden (Voigt *et al.* 2006) führten zur erfolgreichen Isolierung von *FgGSL1-GFP* (nicht gezeigt). Folglich fehlt bis heute der Beweis, dass eine fehlerhafte Proteinfaltung und/ oder reduzierte Enzymaktivität die Ursache der ausbleibenden

GFP-Fluoreszenz ist. Des Weiteren wurde vermutet, dass die Fusion eines Proteins an den zytoplasmatisch lokalisierten C-terminalen Bereich von FgGSL1 die Bindung regulatorischer Proteine verhindert. Bisher wurde für den C-Terminus von pilzlichen (1,3)- β -Glucansynthasen keine bedeutende Funktion postuliert, jedoch besteht die Annahme, dass zumindest putative Phosphorylierungsstellen (neun identifizierte Aminosäuren), die zur Aktivierung oder dem Transport des Protein essentiell sein könnten, dort lokalisiert sind (CBS – *Center for Biological Sequence Analysis*, *NetPhos 3.1 Server*, Stand 07/16). Um die funktionale Bedeutung des C-Terminus zu untersuchen, wurden Mutanten mit einer Deletion diesen Bereichs (67 Aminosäuren) erstellt. Diese wiesen keine phänotypischen Veränderungen zum Wildtyp PH-1 auf (nicht gezeigt), weshalb davon ausgegangen wird, dass der deletierte C-terminale Bereich keine essentielle Funktion einnimmt.

Nachdem die durchgeführten Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise bezüglich der fehlenden GFP-Fluoreszenz ergaben, wurde ein weiterer Klonierungsansatz durchgeführt, indem GFP mit dem N-Terminus von FgGSL1 fusioniert wurde. Das generierte Konstrukt wurde erfolgreich transformiert und zwei homolog integrierte Mutanten (*GFP-GSL1 C-1* und *C-2*) mit Einfachintegrationen identifiziert (Abb. 3-3). Trotz eindeutiger molekularbiologischer Bestätigung dieser Pilzstämme, ließ sich keine Fluoreszenz im Anregungsspektrum des GFP beobachten. Demnach scheint GFP ungeeignet für Lokalisationsstudien der (1,3)- β -Glucansynthase von *F. graminearum* zu sein.

Aus diesem Grund wurde eine N-terminale Klonierungsstrategie mit dem Fluoreszenzprotein mCherry konzipiert. Erhaltene Transformanden wurden entsprechend den vorab beschriebenen Methoden charakterisiert (Abb. 3-4). Die Mutanten *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* wurden mikroskopisch auf die Detektion eines mCherry-Fluoreszenzsignals hin untersucht. Zur Kontrolle der korrekten mikroskopischen Einstellungen diente eine *F. graminearum*-Mutante, die das Fusionsprotein mCherry-Tubulin exprimiert (zur Verfügung gestellt von Dr. Ana Lilia Martinez-Rocha). Weder in der Mutante *mCh-GSL1 D-1*, noch in *D-2* konnte ein Fluoreszenzsignal in der Plasmamembran beobachtet werden (nicht gezeigt), wohingegen der Kontrollstamm deutliche Signale im Anregungsspektrum des mCherry zeigte.

Erwartungsgemäß korreliert die Fluoreszenzintensität mit der Menge des vorhandenen Fusionsproteins. Es wurde vermutet, dass möglicherweise eine niedrige Expressionsstärke der FgGSL1 letztendlich zu schwachen, kaum detektierbaren Fluoreszenzsignalen führt. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die Effizienz der Transkription

(„Promotorstärke“) von *FgGSL1* vergleichend zum konstitutiv exprimierten β -*Tubulin* mittels qPCR in PH-1 analysiert. Dabei waren die Cp-Werte beider Gene vergleichbar, was auf eine relativ hohe Genexpression seitens der *FgGSL1* hindeutet (nicht gezeigt). Die aufgestellte Hypothese konnte falsifiziert werden. Die Expressionsstärke der (1,3)- β -Glucansynthase in den generierten *GSL1*-Mutanten zeigte keine signifikanten Abweichungen zum Wildtyp (Abb. 8-3, Anhang). Trotz des relativ hohen Transkriptionsniveaus könnten posttranskriptionale und -translationale Modifikationen zur Degradation oder Veränderungen der *FgGSL1*-Fusionsproteine führen, weshalb keine Fluoreszenz beobachtet werden konnte.

In der Arbeitsgruppe um Dr. Riquelme gelang es Lokalisationsstudien der (1,3)- β -Glucansynthase des filamentösen Pilzes *N. crassa* *in vivo* durchzuführen (Sánchez-León und Riquelme, 2015). Es wurde eine Klonierungsstrategie angewandt, bei der das GFP direkt vor die erste Transmembrandomäne des Zielproteins FKS-1 fusioniert wurde (Cortés *et al.*, 2005). Vorab durchgeführte Versuche zur Fusionierung des GFP an den N- oder C-Terminus der (1,3)- β -Glucansynthase von *N. crassa* führten nicht zur Fluoreszenz (Sánchez-León und Riquelme, 2015). Diese Publikation diente als Vorlage für einen, im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten, Ansatz zur Generierung eines fluoreszierenden *FgGSL1*-Fusionsproteins. Es wurden drei Transformationen mit dem klonierten Konstrukt durchgeführt, woraus insgesamt acht Primärtransformatanten hervorgingen. Alle Mutanten erwiesen sich jedoch als ektopische Integrationen (nicht gezeigt).

Obwohl weder die Lokalisation, noch die Proteinaufreinigung und Aktivitätsbestimmung von *FgGSL1* in den Mutantenstämmen gelang, wird davon ausgegangen, dass zumindest eine geringe enzymatische Aktivität der (1,3)- β -Glucansynthase vorhanden ist. Anderenfalls wären die *F. graminearum*-Mutanten wahrscheinlich nicht lebensfähig.

4.1.2. Fusion von *FgGSL1* mit einem Fluoreszenzprotein führt zur Inhibierung des Wachstums sowie zu morphologischen Veränderungen der Konidien

Wie bereits erläutert, wurden diverse Fusionskonstrukte der (1,3)- β -Glucansynthase *FgGSL1* kloniert und ins *F. graminearum*-Genom transformiert. Eine Plasmamembran-lokalisierte Fluoreszenz des Zielproteins konnte nicht beobachtet werden. Hingegen fielen phänotypische Veränderungen der generierten Mutanten in der Anzucht auf Vollmedium sowie bei mikroskopischen Untersuchungen der Konidien auf.

So zeigten die FgGSL1-Mutanten ein deutlich reduziertes Wachstum auf CM-Agarplatten verglichen zum Wildtyp (Abb. 3-5). Mutanten mit C-terminal fusioniertem Fluoreszenzprotein (*GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2*) wiesen eine geringere Wachstumsrate auf, als die mit N-terminaler Fusion (*GFP-GSL1 C-1* und *C-2* sowie *mCh-GSL1 D-1* und *D-2*). Stämme mit ektopisch integrierten Fusionskonstrukten ließen keine Abweichungen zum Wildtyp erkennen (Abb. 3-5, Ektopen). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass die beobachtete Wachstumsinhibierung auf die homolog integrierten FgGSL1-Fusionskonstrukte zurückzuführen war.

Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die Mutante *mCh-GSL1 D-1* mithilfe einer weiteren Transformation komplementiert (generiertes Konstrukt Abb. 8-1 A, Anhang). Die erhaltenen Stämme *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1] E-1* und *E-2* tragen im *FgGSL1*-Lokus das native Gen der (1,3)- β -Glucansynthase. Die Wachstumsrate dieser Komplementationsmutanten glich dem Wildtyp PH-1 (Abb. 3-5).

Ähnliche Beobachtungen konnten für die Morphologie der Konidien gemacht werden. Die arttypischen *F. graminearum*-Sporen besitzen eine schlanke, sichelförmige Form und beinhalten fünf bis sechs Septen (Abb. 3-6 A, PH-1; Leslie und Summerell, 2006). Wiederum zeigten die Mutanten *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2* die deutlichsten phänotypischen Veränderungen. Die kleinen, aufgeblähten Konidien wiesen maximal vier Septen auf und waren in ihrer Länge um bis zu 60 % reduziert im Vergleich zur Wildtypkonidie (Abb. 3-6 A und B). Indessen unterschieden sich die Sporen der Mutanten mit N-terminalen Fusionskonstrukten in Größe und Form kaum vom Wildtyp, wobei ein statistisch signifikanter Größenunterschied zwischen den Stämmen mit N-terminalem GFP und mCherry berechnet wurde (Abb. 3-6 B). Somit trägt nicht nur die Position des Fluoreszenzproteins, sondern auch das Fluoreszenzprotein an sich, entscheidend zur Ausprägung dieses Phänotyps bei. Entsprechend der Wachstumsstudie konnte auch bezüglich der Konidienmorphologie keine phänotypischen Abweichungen zwischen dem Wildtyp, den Ektopen und den Komplementationsmutanten *E-1* und *E-2* beobachtet werden (Abb. 3-6). Diese Ergebnisse untermauern den Verdacht, dass die homolog integrierten Fusionskonstrukte verantwortlich für die Ausprägung der beschriebenen Phänotypen sind.

Um zu überprüfen, ob und wie die abnormal gebildeten Konidien der FgGSL1-Mutanten auskeimen, wurde eine 12-stündige Zeitserie des primären Hyphenwachstums im Durchlichtmikroskop erstellt. Die Auskeimungsfähigkeit der Konidien konnte bestätigt werden. Verglichen zum Wildtyp fand dies jedoch verzögert, im Fall der

Komplementationsmutanten zwei, und bezogen auf sämtliche *GSL1*-Mutanten, vier Stunden später statt (Abb. 3-7). Zudem wiesen die Stämme *GSL1-GFP A-1* und *B-1* ein erheblich eingeschränktes Wachstum der Primärhyphen auf (Abb. 3-7, 8-12 h), was die Reduktion des radialen Wachstums auf dem CM-Festmedium erklären könnte. Die Mutanten mit N-terminalen Fusionskonstrukten wiesen eine Wachstumsgeschwindigkeit vergleichbar zum Wildtyp auf (Abb. 3-7), sodass als Ursache für deren leicht reduzierte Wachstumsrate auf Vollmedium (Abb. 3-5) das verspätete Auskeimen der Konidien angenommen wurde.

Die soeben erläuterten Ergebnisse bestätigen die Auswirkungen der homolog integrierten Fusionskonstrukte auf die beschriebenen Phänotypen der *F. graminearum*-Stämme. Durch die Generierung einer Komplementationsmutante konnte die Reduktion im Wachstum und die beobachteten Veränderungen bezüglich der Konidienmorphologie aufgehoben werden. Auch die ektopisch integrierten Klonierungskassetten zeigten keine phänotypischen Auswirkungen. Unterschiede hinsichtlich der Intensität der morphologischen Abweichungen waren zwischen *GSL1*-Mutanten mit C- und N-terminalen Fusionskonstrukten zu verzeichnen, wobei die Fusion des GFP an den C-Terminus den stärksten Einfluss hatte. Demnach scheint die Position des Fluoreszenzproteins die Aktivität von FgGSL1 unterschiedlich stark zu beeinträchtigen. Die Ergebnisse zur Messung der Konidienlänge offenbarten, dass auch die Wahl des Fluoreszenzproteins (GFP oder mCherry) einen Einfluss auf den Phänotyp von *F. graminearum* haben kann.

Im Gegensatz zu den generierten *GSL1*-Mutanten zeigten die fluoreszierenden *GSL1-eGFP*-Mutanten des filamentösen Pilzes *C. graminicola* keine phänotypischen Veränderungen bezüglich des Hyphenwachstums oder der Sporulation (Oliveira-Garcia und Deising, 2013).

4.1.3. Verringertes Wachstums der *GSL1*-Mutanten verursacht reduzierte Virulenz auf Weizenähren

F. graminearum ist ein Blütenpathogen kleinkörniger Getreidearten und Haupterreger der Ährenbleiche (engl. *Fusarium Head Blight*, FHB; Goswami und Kistler, 2004; Bai und Shaner, 1994). Zur vollständigen biologischen Charakterisierung wurde die Infektionsstärke generierter *F. graminearum*-Mutanten auf Weizenähren untersucht.

Blüten des Weizenkultivars *Nandu* wurden zum Zeitpunkt der Anthese punktinokuliert und die Infektionsstärke nach 21 Tage ausgewertet. Eine signifikant reduzierte Virulenz der

GSL1-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp konnte anhand der verringerten Anzahl FHB-symptomatisch ausgebliehener Blüten beobachtet werden (Abb. 3-8 A). Dies spiegeln auch die berechneten Werte zur Bestimmung der Infektionsstärke wider (Abb. 3-8 B, PH-1: 0,81 und GSL1-Mutanten: 0,25- 0,37). Die Infektionsstärke und der Infektionsverlauf der Komplementationsmutanten *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1] E-1* und *E-2* sowie der *F. graminearum*-Stämme mit ektopisch integrierten *FgGSL1*-Klonierungskassetten waren vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 3-8 A und B). Im Vergleich zu den hier generierten GSL1-Mutanten zeigten die *GSL1-eGFP*-Mutanten des Phytopathogens *C. graminicola* keine Veränderungen bezüglich der Virulenz auf Maisblätter (Oliveira-Gracia und Deising, 2013).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen vermuten, dass die reduzierte Virulenz der GSL1-Mutantenstämme mit der verringerten Wachstumsrate (Abb. 3-5 und 3-7) einhergeht. Eine Typ II-Resistenz, also eine eingeschränkte Ausbreitung des Pilzes innerhalb des inokulierten Ährchens (Schroeder und Christensen, 1963), wie sie bereits bei einigen *F. graminearum*-Deletionsmutanten ($\Delta tri5$ (Proctor *et al.*, 1995), $\Delta gpmk1$ (Jenczmionka *et al.*, 2003; Jenczmionka und Schäfer, 2005) und $\Delta fgl1$ (Voigt *et al.*, 2005)) beschrieben wurde, trifft im Fall der GSL1-Mutanten nicht zu, da neben dem inokuliertem auch benachbarte Ährchen Nekrosen und FHB-Symptome aufwiesen (Abb. 3-8 A). Zudem belegten mikroskopische Analysen von Längsschnitten infizierter Weizenähren, dass der Pilz die Barriere der Rachilla durch eine Kolonisierung des Leitgewebes überwinden konnte (nicht gezeigt). Ferner besteht der Verdacht, dass aufgrund des reduzierten Wachstums und der verspäteten Auskeimungsfähigkeit seitens der GSL1-Mutanten, spezifische Abwehrmechanismen der Pflanze, wie die Induktion von PR-Proteinen und die Produktion von toxisch wirkenden Phytoalexinen (Purves *et al.*, 2006) effizienter gegen die Ausbreitung des Pilzes wirken. Ein weiterer, bereits gut untersuchter pflanzlicher Abwehrmechanismus als Reaktion auf penetrierende Pathogene, ist die Einlagerung von sogenannter Callose, pflanzliches (1,3)- β -Glucan, in die Zellwand. Dadurch kann das Eindringen des Pilzes verlangsamt oder gar verhindert werden (Jacobs *et al.*, 2003; Stone und Clarke, 1992; Ellinger *et al.*, 2013). Diese Calloseakkumulation führt zum Verschluss von Siebelementen und verhindert somit die Ausbreitung von *F. graminearum*. Entsprechende Studien wurden in Weizen (Voigt *et al.*, 2006, Blümke *et al.*, 2014) sowie in dem Modellorganismus *B. distachyon* (Blümke, 2013) durchgeführt und bestätigten die Wirksamkeit dieses pflanzenspezifischen Abwehrmechanismus. Ob es in denen, mit

GSL1-Mutantenstämmen inokulierten Weizenähren ebenfalls zu einer erhöhten Calloseablagerung kam, wurde nicht näher untersucht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass vermutlich die homolog integrierten *FgGSL1*-Fusionskonstrukte, aufgrund des verringerten Wachstums der entsprechenden Mutanten, für die reduzierte Virulenz auf Weizen verantwortlich sind. Dadurch gewinnt die Pflanze Zeit spezifische und hoch wirksame Abwehrmechanismen zu generieren und somit eine Ausbreitung des Pilzes einzuschränken oder gar zu verhindern.

4.1.4. Reduktion des (1,3)- β -Glucansynthase-Transkripts durch RNA-Interferenz führt zu vergleichbaren Phänotypen der GSL1-Mutanten

Die Generierung einer Deletionsmutante der (1,3)- β -Glucansynthase in filamentösen Pilzen konnte bis heute nicht erreicht werden, was die essentielle Funktion dieses Proteins im Lebenszyklus dieser Organismen bekundet (Latgè, 2007; Douglas *et al.*, 1997; Thompson *et al.*, 1999). Deshalb wurde zur Charakterisierung dieser Enzyme die Methode der RNA-Interferenz (kurz RNAi), einer gezielten Stilllegung von Genen (engl. gene silencing) durch den Abbau von mRNA (Purves *et al.*, 2006), in einigen filamentösen Pathogenen angewandt. Im Folgenden werden die phänotypischen Ausprägungen von RNAi-Transformanden mit denen der GSL1-Mutanten verglichen.

Bereits vor 20 Jahren konnte das erste Mal eine Inhibierung der (1,3)- β -Glucansynthase in *N. crassa* durch den Einsatz eines induzierbaren RNAi-Konstruktes nachgewiesen werden (Tentler *et al.*, 1997). Die Transformanden zeigten eine erhebliche Reduktion des Wachstums auf Festmedium. Zudem offenbarten lichtmikroskopische Aufnahmen kurze, stark verzweigte und unipolar wachsende Hyphen. Auch eine, um bis zu 60 % reduzierte (1,3)- β -Glucansynthaseaktivität konnte ermittelt werden (Tentler *et al.*, 1997). Vergleichbar mit diesen RNAi-Transformanden zeigten auch die GSL1-Mutanten eine erhebliche Wachstumsreduktion auf Festmedium (Abb. 3-5) sowie ein unpolares Hyphenwachstum auskeimender Konidien (Abb. 3-7). Eine verringerte (1,3)- β -Glucansynthaseaktivität kann in den GSL1-Mutanten nur vermutet werden, da eine native Proteinaufreinigung des Enzyms bisher nicht gelang.

Eine Studie zur Charakterisierung der (1,3)- β -Glucansynthase des humanpathogenen Pilzes *Fusarium solani* durch den Einsatz eines mit Ethanol oder Glycerol induzierbaren RNAi-Konstruktes ergab eine erheblich reduzierte Transkriptmenge von *FsFKSI* in den entsprechenden Mutanten (Ha *et al.*, 2006). Die resultierenden phänotypischen

Veränderungen beliefen sich auf ein Anschwellen von Zellen, deren Lyse sowie einer reduzierten Sporulation. Konidien, die nicht sofort nach Induktion der RNA-Interferenz lysierten und auskeimten, wiesen bis zu dreifach breitere Primärhyphen auf. Die Intensität der phänotypischen Veränderung korrelierte mit dem gemessenen *FsFKSI*-Transkriptlevel, wobei mehr *FsFKSI*-Transkripte in den Transformanden mit weniger stark ausgeprägten Phänotypen ermittelt wurden (Ha *et al.*, 2006). Die erläuterten Beobachtungen zu den RNAi-Transformanden von *F. solani* konnten bei den generierten *GSL1*-Mutanten in dieser Art nicht beobachtet werden. Das Transkriptniveau der (1,3)- β -Glucansynthase in den *GSL1*-Mutanten ist vergleichbar zu PH-1 (Abb. 8-3, Anhang) und auch eine Lyse von Konidien oder Hyphen wurde nie dokumentiert. Inwiefern eine Reduktion des Wachstums der RNAi-Transformanden von *F. solani* und phänotypische Modifikationen bezüglich der Konidien auftraten, wie sie bei den *GSL1*-Mutanten beobachtet wurden, geht aus der Publikation von Ha und Kollegen (2006) nicht hervor.

Eine, für diese Doktorarbeit, bedeutende Publikation befasst sich mit der biologischen Charakterisierung der (1,3)- β -Glucansynthase des Maispathogens *C. graminicola* (Oliveira-Gracia und Deising, 2013). Den Autoren gelang es fluoreszierende *GSL1-eGFP*-Mutanten zu generieren, die keine phänotypischen Abweichungen zum untransformierten Wildtypstamm zeigten. Deren etablierte Klonierungsmethode wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, führte jedoch nicht zum fluoreszierenden FgGSL1-Fusionsprotein. RNAi-Transformanden der *GSL1* von *C. graminicola* wurden erstellt, die aufgrund unterschiedlicher Anzahl an Integrationen, unterschiedlich stark ausgeprägte Phänotypen aufwiesen (Oliveira-Gracia und Deising, 2013). Eine Reduktion des Wachstums auf Festmedium konnte bei allen Transformanden beobachtet werden, wobei die stärkste Inhibierung bei der Mutante mit dem niedrigsten *CgGSL1*-Transkriptlevel auftrat. Ferner wurden angeschwollene Zellen in den gewachsenen Hyphen, eine Reduktion der Sporulation und Virulenz sowie morphologische Veränderungen bezüglich der Konidienform und -größe, ähnlich den *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2* Mutanten, identifiziert (Oliveira-Gracia und Deising, 2013). Von den Ergebnissen zur biologischen Charakterisierung der *GSL1*-Mutanten ist bekannt, dass die Position des Fluoreszenzproteins und zum Teil auch die Wahl des Fluorophors (GFP oder mCherry) unterschiedlich starke Auswirkungen auf den Phänotyp haben. Ebenso resultieren die unterschiedliche Anzahl an RNAi-Kopien im Genom von *C. graminicola* in differenzierten Ausprägungen des Phänotyps. Demnach führen zwei völlig verschiedene Klonierungs- und Transformationsstrategien teilweise zu vergleichbaren morphologischen Veränderungen.

Der filamentöse Pilz *A. fumigatus* besitzt, ebenso wie die gerade erläuterten Ascomyceten, nur ein Gen zur Expression der (1,3)- β -Glucansynthase FKS1 (Beauvais *et al.*, 2001). Um die Bedeutung dieses Proteins zu analysieren, wurde der native Promotor gegen einen Doxycyclin-induzierbaren ausgetauscht (Dichtl *et al.*, 2015). Erst durch die Applikation dieses Antibiotikums wird eine Genexpression der (1,3)- β -Glucansynthase induziert. Unter repressiven Bedingungen wiesen die Transformanden eine signifikant reduzierte Wachstumsrate vergleichbar mit den Mutanten *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2* auf, bildeten keine Konidiophoren und waren somit steril (Dichtl *et al.*, 2015). Die *GSL1*-Mutanten zeigten stets eine Sporulation ähnlich dem Wildtyp PH-1 (nicht gezeigt). Wird die Expression von *FKS1* in *A. fumigatus* inhibiert, belegen mikroskopische Analysen die Ausbildung von kurzen, unregelmäßig wachsenden und stark verzweigten Hyphen, die an den Spitzen gelegentlich lysierten (Dichtl *et al.*, 2015). Dieser Wachstumsphänotyp ist vergleichbar mit den Ergebnissen zum Auskeimungsversuch von *GSL1-GFP A-1* und *B-1* (Abb. 3-7), jedoch konnte unter keinen Bedingungen aufplatzende und auslaufende Zellen beobachtet werden.

Im weiteren Verlauf beschrieben die Autoren die Generierung einer *FKS1*-Deletionsmutante und bezeugten erstmals, dass die (1,3)- β -Glucansynthase nicht essentiell für das Überleben von *A. fumigatus* ist (Dichtl *et al.*, 2015). Jedoch muss daraufhin gewiesen werden, dass die phänotypischen Auswirkungen dieser Deletion nur in Heterokaryonten, also in *A. fumigatus*-Stämmen mit zwei genetisch ungleichen Kernen, beobachtet werden konnten. Da in diesem speziellen Fall eine Genexpression von beiden Zellkernen ausging (Purves *et al.*, 2006), konnte die *FKS1*-Deletion komplementiert werden.

Die beschriebenen RNAi-Transformanden diverser filamentöser Pilze zeigten phänotypische Auswirkungen, die größtenteils mit den *GSL1*-Mutanten korrelieren. Dabei verringerte die RNA-Interferenz die Transkriptmenge, was letztendlich zu reduzierten Proteinmengen der (1,3)- β -Glucansynthase führte und die Ursache für die erhaltenen Phänotypen darstellt. Im Gegensatz dazu war das *FgGSL1*-Transkriptniveau in den *GSL1*-Mutanten nicht abweichend zum Wildtyp (Abb. 8-3, Anhang). Deshalb wurde vermutet, dass die fusionierten Fluoreszenzproteine zu einer falschen Proteinfaltung und letztendlich reduzierten Proteinaktivität führten. Inwiefern hier posttranskriptionale oder -translationale Proteinmodifikationen eine Rolle spielten, kann derzeit nur spekuliert werden.

4.2. Zellwandanalyse als Methode zur Identifizierung von Zellwand-defizienten *F. graminearum*-Mutanten

Die pilzliche Zellwand ist eine dynamische Struktur, deren chemische Zusammensetzung von der Umgebung sowie Stressoren geprägt wird. Mutationen von Zellwand-Strukturproteinen, wie (1,3)- β -Glucansynthasen oder Chitinsynthasen, haben eine Umgestaltung bezüglich der Polysaccharidzusammensetzung und Zellwandarchitektur zur Folge (Lesage und Bussey, 2006; François, 2007; Latgé und Beauvais, 2014). Diese können erhebliche Veränderungen des Phänotyps hervorrufen und lassen sich in einer Zellwandanalyse experimentell nachweisen.

In der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene Mutanten der (1,3)- β -Glucansynthase des phytopathogenen Pilzes *F. graminearum* erstellt. Dabei sollte ein fluoreszierendes Fusionsprotein bestehend aus mCherry oder GFP und FgGSL1 zur Durchführung von Lokalisationsstudien *in vivo* generiert werden. Die erhaltenen Transformanten wiesen keine Fluoreszenz auf, zeigten jedoch erhebliche phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 3-5 bis 3-9). Aufgrund der Tatsache, dass FgGSL1 ein integrales Membranprotein ist und die Synthese des bedeutenden Zellwandpolymers (1,3)- β -Glucan katalysiert, liegt der Verdacht nahe, dass eine Modifikation des Proteins Zellwandveränderungen hervorruft. Daher wurde eine Zellwandanalyse nach François (2007), basierend auf einer chemischen Hydrolyse der Polysaccharide (1,3)- β -Glucan, Galaktomannan und Chitin, aller Mutantenstämme durchgeführt. Eine anschließende Monosaccharid-Quantifizierung mittels HPAEC-PAD offenbarte signifikante Unterschiede zwischen den GSL1-Mutanten und PH-1 bezüglich der Glukose- und Glucosaminkonzentrationen (Abb. 3-9). Dabei beinhalteten die Zellwände der Transformanten mehr Glucosamin und weniger Glukose verglichen zum Wildtyp, wohingegen keine Veränderungen in Hinblick auf die Monosaccharide Mannose und Galaktose gemessen wurden (Abb. 3-9). Überträgt man die berechneten Ergebnisse auf die entsprechenden Zellwandpolysaccharide, so lässt sich eine Reduktion des (1,3)- β -Glucans, als mögliche Folge der inhibierten, enzymatischen Aktivität der (1,3)- β -Glucansynthase postulieren. Infolgedessen steigt der relative Chitingehalt. Diese Verschiebung wurde bereits bei anderen filamentösen Pilzen als Folge der inhibierten (1,3)- β -Glucansynthase beobachtet (Dichtl *et al.*, 2015; García-Rodríguez *et al.*, 2000) und als Kompensationsreaktion beschrieben (Latgé und Beauvais, 2014).

Vor mehr als 20 Jahren wurde eine Analyse der Zellwandzusammensetzung von *F. graminearum* durchgeführt (Barbosa und Kimmelmeier, 1993). Die angewandte

Methode unterschied sich erheblich von der in dieser Arbeit durchgeführten Zellwandanalyse. Infolgedessen sind die erhaltenen Monosaccharidkonzentrationen verschieden. Zudem wurden damals weitere Zellwandzucker wie Arabinose und Glucuronsäure ermittelt. Barbosa und Kimmelmeier beschrieben eine mechanische Lyse, der in PDA-Vollmedium (engl. Potato dextrose agar) gewachsenen Hyphen des *F. graminearum*-Wildtyps. Bereits die Verwendung von unterschiedlichen Medien, PDA im Vergleich zum hier genutzten YPD, führen zu unterschiedlichen Konzentrationen der Zellwandzucker (Latgé und Beauvais, 2014). Diese Tatsache konnte im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit experimentell nachgewiesen werden, wobei der Wildtypstamm 8-1, angezogen in YPD-Medium, einen geringeren Glukosegehalt in der Zellwand aufwies, verglichen mit in CM-Medium kultivierten Pilzhypen (nicht gezeigt). Die Kultivierungsbedingungen und insbesondere die zur Verfügung stehenden Nährstoffe tragen erheblich zur individuellen Zellwandzusammensetzung bei (Mauro und Dietrich, 1981; François, 2007). Auch die Zellwände verschiedener *F. graminearum*-Kultivare unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung (vgl. Abb. 3-9, PH-1 und Abb. 3-19, 8-1). Welchen Pilzstamm Barbosa und Kimmelmeier untersuchten, wird aus der Publikation nicht deutlich. Die Monosaccharide wurden über eine Gas-Flüssigkeitschromatographie bestimmt. Das Glucosamin konnte über diese Methode nicht detektiert werden. Zur Bestimmung des N-Acetylglucosamins wurde eine enzymatische Hydrolyse angewandt (Barbosa und Kimmelmeier, 1993). Auch heutzutage ist dies eine gängige Methode zur Bestimmung und Quantifizierung von Zellwandzucker (Pérez und Ribas, 2013; Gastebois *et al.*, 2009). Dazu müssen jedoch die Zugänglichkeit der eingesetzten zellwandabbauenden Enzyme sowie deren Aktivität unter stets gleichen Versuchsbedingungen gegeben sein. Bei den generierten *GSL1*-Mutanten konnte eine veränderte Vernetzung zwischen den Polysacchariden (1,3)- β -Glucan, Chitin und Galaktomannan nicht ausgeschlossen werden, weshalb die Zugänglichkeit von Enzymen unzureichend und eine vollständige Degradation der Zellwand nicht gewährleistet werden konnte. Diese Hypothese wurde durch den Versuch das Myzel der Mutante *GSL1-GFP A-1* mittels zellwandabbauenden Enzymen zu protoplastieren, unterstützt. Junges Myzel des Wildtyps sowie der Mutante wurden mit den gleichen Enzymkonzentrationen versetzt. Nach einer und drei Stunden wurde der Fortschritt der Protoplastierung mikroskopisch dokumentiert (Abb. 8-4, Anhang). In der Probe der Mutante *GSL1-GFP A-1* waren nach drei Stunden noch intakte Hyphen zu erkennen, wohingegen das Myzel von PH-1 nahezu vollständig protoplastiert vorlag. Dieses Experiment bewies, dass die Zellwand der

GSL1-Mutante strukturelle Modifikationen aufweist und daher eine enzymatische Hydrolyse zur Bestimmung der Zellwandzusammensetzung unzureichende Ergebnisse hervorbringen würde.

Eine weitere *F. graminearum*-Mutante $\Delta pk1$ wurde einer Zellwandanalyse nach François (2007) unterzogen, da aus vorherigen Untersuchungen Modifikationen hinsichtlich der Zellwandzusammensetzung und -komposition angenommen wurden (Schäfer, 2009). Diese Deletionsmutante der Serin/ Threonin Proteinkinase *gad8 FgPK1* ($\Delta pk1$) zeichnet sich durch einen auffälligen Wachstumsphänotyp (Abb. 3-11 und 3-12) und der spontanen Bildung von blasenartigen Strukturen an den Hyphenspitzen aus (Abb. 3-10 D, 3-13). Die Zellwandanalyse ergab eine signifikante Reduktion von Glukose und Erhöhung des Glucosamins seitens der Deletionsmutante (Abb. 3-19). Eine Abnahme des (1,3)- β -Glucans und ein erheblicher Anstieg der Chitinkonzentration sind somit als Folge der Deletion von FgPK1 zu betrachten.

Da die zelluläre Funktion und Lokalisation von FgPK1 ungeklärt sind, können nur Vermutungen über dessen Bedeutung bezüglich der Zellwandbiosynthese aufgestellt werden. Die FgPK1 wird als orthologe Proteinkinase der YPK1 von *S. cerevisiae* beschrieben (Wang *et al.*, 2011). Ein direkter Zusammenhang zwischen YPK1 und dem Aufbau der pilzlichen Zellwand konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Eine weitere homologe Proteinkinase der FgPK1 könnte die PKC1 der Hefe sein, da YPK1 und PKC1 von derselben Proteinkinase PKH1 phosphoryliert und aktiviert werden (Inagaki *et al.*, 1999; Roelants *et al.*, 2004). Die PKC1 ist ein essentielles Protein für die Zellwandbiosynthese und der Zellwandintegrität in *S. cerevisiae* (Heinisch *et al.*, 1999). Der PKC1-Signaltansduktionsweg ist bereits gut verstanden und eine Vielzahl zellulärer Komponenten identifiziert. Eine bildgebende schematische Übersicht ist in dem Review von Heinisch und Kollegen (1999) dargestellt. Die Proteinkinase YPK1 wird in dem PKC1-Signalweg jedoch nicht erwähnt, infolgedessen nun postuliert wird, dass beide Proteinkinasen in parallel verlaufenden Signalwegen lokalisiert sind (Roelants *et al.*, 2002). Vorausgesetzt, dass FgPK1 in *F. graminearum* eine vergleichbare Funktion wie PKC1 in *S. cerevisiae* einnimmt, könnten die Ergebnisse der Zellwandanalyse damit erklärt werden, dass die Regulation der Zellwandbiosynthese im Pilz gestört ist, was eine Verschiebung der Polysaccharide Chitin und (1,3)- β -Glucan zur Folge hat. In Hefen konnte gezeigt werden, dass die PKC1 von der GTPase Rho1 direkt aktiviert wird (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Dieses kleine G-Protein wird des Weiteren als essentielle regulatorische Untereinheit der (1,3)- β -Glucansynthase beschrieben (Qadota

et al., 1996). Durch die Deletion der FgPK1 in *F. graminearum* wäre somit direkt die Biosynthese des (1,3)- β -Glucans betroffen, was die Reduktion dieses Zellwandpolymers, gemessen an der geringen Glukosemenge (Abb. 3-19), in der Zellwand von $\Delta pk1$ erklären würde.

Die soeben beschriebenen Erklärungen sind rein spekulativ und belaufen sich auf angenommene Homologien der FgPK1 zu anderen, hefespezifischen Proteinkinasen. Inwiefern eine Variation der Zellwandzusammensetzung zwischen den normal wachsenden $\Delta pk1$ -Hyphen und -Blasen vorliegt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden. Hierzu müsste eine Methode zur Isolierung der blasenartigen Strukturen etabliert werden. Durch den Einsatz der Laser-Mikrodissektion, ein mikroskopisches Verfahren zur gezielten Isolierung von Gewebe und Zellen, konnten bereits erste Erfolge erzielt werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Jedoch ist diese Methode zeitaufwendig und Bedarf einiger Optimierungen. In *A. thaliana* wurde die Laser-Mikrodissektion zur Isolierung von Epidermalzellen bereits erfolgreich angewandt und anschließende Proteom- und Zellwandanalysen der isolierten Zellen durchgeführt (Falter *et al.*, 2015).

Abschließend kann festgehalten werden, dass sich die hier angewandte Zellwandanalyse zur Identifizierung von Zellwand-defizienten Mutanten eignet. Ein Vorteil ist die Möglichkeit effizient und kostengünstig eine Vielzahl von Mutantenstämmen zu untersuchen und zu vergleichen (François, 2007). Eine chemische Hydrolyse von Zellwänden hat den Nachteil, dass keine Aussagen über bestehende Verknüpfungen der Polysaccharide untereinander, sowie der Verteilung von (1,3)- β - und (1,6)- β -Glucan getroffen werden können. Dazu bedarf es weiterer Methoden wie der Massenspektrometrie (Kollár *et al.*, 1995; Free, 2013), der mikroskopischen Detektion von spezifischen Zellwandkomponenten durch den Einsatz von Antikörpern und kohlenhydratbindenden Proteinen (Schoeffelmeer *et al.*, 1999; Dichtl *et al.*, 2015; Latgé, 2010) sowie einer Kombination aus enzymatischer und chemischer Hydrolyse (Magnelli *et al.*, 2002).

4.3. Erhöhte Genexpression der Chitinsynthase 3 und Deregulation des Aktinnetzwerks als Ursachen für Zellwanddefekte von $\Delta pk1$

Die Deletion der Proteinkinase FgPK1 des filamentösen Pilzes *F. graminearum* führt zu einer Vielzahl von phänotypischen Veränderungen, auch als Pleiotropie (Purves *et al.*, 2006) bezeichnet. In vorangehenden Studien von Dr. Christian Voigt, Dr. Katja Schäfer und der technischen Assistentin Cathrin Kröger zur Charakterisierung der $\Delta pk1$ wurden

eine erhebliche Reduktion der Virulenz, die Bildung von blasenartigen Verdickungen an den Hyphenspitzen, ein unpolares und stark verzweigtes Hyphenwachstum sowie das Phänomen von auftretenden vielkernigen Zellen beschrieben (Abb. 3-10). Zudem konnte ein reduziertes radiales Wachstum auf Voll- und Minimalmedien beobachtet werden (Abb. 3-11). Ferner scheint eine erhöhte Aurofusarinproduktion in der Deletionsmutante vorzuliegen, die anhand der rötlichen Verfärbung des Myzels leicht zu identifizieren war (Abb. 3-11; Medentsev *et al.*, 1992). Im Verlauf dieser Arbeit wurden ein signifikant erhöhter Hyphen- und Zellwanddurchmesser gemessen (Abb. 3-16). Ebenso verursacht die Deletion der FgPK1 Modifikationen bezüglich der Zellwandzusammensetzung (Abb. 3-19) und des strukturellen Aufbaus, der im nachfolgenden Kapitel näher erläutert und diskutiert wird.

Diese Vielzahl an phänotypischen Beeinträchtigungen ist charakteristisch für deletierte essentielle Proteinkinasen (Wang *et al.*, 2011). Den beobachteten Phänotypen zufolge, scheint FgPK1 nicht in einem definierten Signalweg involviert zu sein, sondern in Interaktionen mit verschiedenen Zielproteinen zu treten und diese durch Phosphorylierung zu aktivieren oder deaktivieren. Aufgrund dieser, sogenannter „*Cross-talk*-Reaktionen“, führt die Inaktivierung einer definierten Proteinkinase zu mehreren morphologischen Veränderungen des Organismus (Heinisch *et al.*, 1999). Dadurch ist die Bestimmung der exakten Funktion und Lokalisation von FgPK1 schwierig. Zudem erschweren die Komplexität und Vernetzung von Signalwegen innerhalb einer Zelle die Untersuchung von Proteinkinasen.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war nicht die Entschlüsselung des PK1-Signalwegs, sondern eine umfassende Charakterisierung der Zellwand dieser speziellen Mutante durchzuführen und diesbezüglich neue Methoden zu etablieren. So ergab die Zellwandanalyse der Deletionsmutante eine erhebliche Reduktion der Glukosemenge und eine Steigerung an Glucosamin (Abb. 3-19, siehe 4.2.). Durch Sequenzvergleiche der FgPK1 zu Proteinkinasen der Hefe kommen als Orthologe vor allem die YPK1 (Wang *et al.*, 2011), aber auch die PKC1 von *S. cerevisiae* in Frage. PKC1 ist essentiell für die Regulation der Zellwandbiosynthese (Heinisch *et al.*, 1999), weshalb der Verdacht besteht, dass FgPK1 ebenso diese in *F. graminearum* reguliert. Da dies aber nur Spekulationen sind, wurden weitere Untersuchungen bezüglich der deregulierten Zellwand von $\Delta pk1$ veranlasst.

Eine Genexpression von Zellwand-Strukturproteinen wurde durchgeführt. Die Ergebnisse ließen eine signifikant erhöhte Expression der getesteten Gene in den Proben der

Deletionsmutanten erkennen, wobei die Chitinsynthase 3 (*Fgchs 3*) eine um 2,5-fach höhere Expressionsstärke verglichen zum Wildtyp aufwies (Abb. 3-20). Bioinformatische Studien ergaben hohe Homologien der *Fgchs 3* zu der Chitinsynthase A (*Afchs A*) des Humanpathogens *A. fumigatus* (Rogg *et al.*, 2011), der Chitinsynthase 3 (*Ncchs 3*) von *N. crassa* (Beth-Din und Yarden, 2000) sowie der Chitinsynthase 1 von *F. oxysporum* (Martín-Udíroz *et al.*, 2004). Aufgrund dessen wird vermutet, dass es auch Übereinstimmungen bezüglich der biologischen Funktion gibt. Die *Afchs A* wird verstärkt nach einer Behandlung mit Enchinocandin, einem Antimykotikum mit inhibierender Wirkung auf die (1,3)- β -Glucansynthase, transkribiert, was zu einer erhöhten Chitinmenge in der Zellwand von *A. fumigatus* führt (Rogg *et al.*, 2011). Die *Ncchs 3* wird in einem frühen Stadium des Myzelwachstums von *N. crassa* exprimiert (Beth-Din und Yarden, 2000). Demnach könnte die *Fgchs 3* für die Erhöhung des Chitins in der Zellwand von $\Delta pk1$ verantwortlich sein. Ob *FgPK1* direkt als regulatorische Untereinheit der Chitinsynthase 3 fungiert, ist derzeit unklar. In *S. cerevisiae* reguliert *YPK1*, die putativ orthologe Proteinkinase von *FgPK1* (Wang *et al.*, 2011), nach derzeitigem Wissen nicht die Genexpression von Zellwand-Strukturproteinen. *PKC1* hingegen ist indirekt über eine MAP Kinase an der Genexpression von *FKS1/ FKS2*, zwei (1,3)- β -Glucansynthasen, *MNN1*, eine Mannosyltransferase und *CSD2*, einer Chitinsynthase, beteiligt (Igual *et al.*, 1996; Heinisch *et al.*, 1999). Infolgedessen scheinen *FgPK1* und *PKC1* eine größere funktionale Homologie zu besitzen, als *FgPK1* und *YPK1*.

PKC1 wird eine bedeutende Rolle in der Organisation des Zytoskeletts, vor allem der Aktinfilamente zugesagt (Helliwell *et al.*, 1998). Aber auch weitere Komponenten des *PKC1*-Signalwegs sollen mit der Organisation von Aktinfilamenten assoziiert sein (Sheu *et al.*, 1998; Pruyne und Bretscher, 2000). Zudem scheint die Proteinkinase *YPK1* für eine exakte Anordnung von Aktinfilamenten in Hefen essentiell zu sein (Roelants *et al.*, 2002). Im filamentösen Ascomycet *Ashbya gossypii* führte die Deletion des *Cdc42*-Proteins, eine orthologe Rho-GTPase von *S. cerevisiae*, zur Delokalisation von Aktinfilamenten und folglich zu einem unpolaren Hyphenwachstum (Wendland und Philippsen, 2001). Vesikel und Zellorganellen werden entlang von Aktinfilamenten durch die pilzliche Zelle transportiert, weshalb deren einwandfreie Funktion essentiell für das Überleben des Pilzes ist (Berepiki *et al.*, 2011; Momany, 2002; Pollard und Cooper, 2009).

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte untersucht werden, ob eine Fehlfunktion bezüglich der Organisation von Aktinfilamenten in der $\Delta pk1$ -Mutante vorliegt (Abb. 8-5, Anhang). In der Wildtyphyph 8-1 waren gleichmäßig verlaufende und langgestreckte Aktinfilamente zu

verzeichnen, wohingegen die Deletionsmutante verkürzte und ungeordnete Aktinstränge aufwies. Besonders deutlich wurde dies in der blasenartigen Struktur (Abb. 8-5 B, Anhang). Zudem konnte ein vermeintlich sichtbarer und delokalisierte Spitzenkörper im unteren Bereich der $\Delta pk1$ -Blase (Abb. 6-5 B, Pfeil) lokalisiert werden. Auch die unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten des Phalloidin-Alexa Fluor® 594-Farbstoffs zwischen 8-1 und $\Delta pk1$ deuteten auf strukturelle Unterschiede hin. Diese Fehlfunktion in der Aktinorganisation der $\Delta pk1$ hat unter anderem einen eingeschränkten Vesikeltransport zur Folge und könnte die Erklärung für eine Vielzahl der vorab beschriebenen phänotypischen Veränderungen sein. In Hinblick auf die Zellwand könnte dies einen unzureichenden oder verspäteten Transport von Strukturproteinen und deren regulatorischen Untereinheiten zu den Hyphenspitzen, dem Ort des Wachstums, bedeuten. Die beschriebenen Modifikationen der Zellwand könnten demzufolge Ergebnisse des gestörten Zytoskeletts sein. Zudem könnte diese Deregulation des Aktins das unpolare und stark verzweigte Hyphenwachstum der Deletionsmutante erklären (Abb. 3-10 D und 3-12). Das Aktinzytoskelett, aber auch Mikrotubuli, sind in filamentösen Pilzen essentiell für das polare Wachstum der Hyphen sowie dessen Verzweigungen und tragen somit zur Entstehung des typischen Myzelnetzwerks bei (Momany, 2002; Pollard und Cooper, 2009; Riquelme *et al.*, 2011).

Die Fehlfunktion des Aktinnetzwerkes scheint auch die Ursache für die Entstehung von den blasenartigen Verdickungen der $\Delta pk1$ -Mutante sein. In unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass als Folge der Inaktivierung von Aktin durch den Einsatz toxisch wirkender Substanzen das apikale Hyphenwachstum stoppte und die Zelle anschwellte (Knechtle *et al.*, 2006; Taheri-Talesh *et al.*, 2008; Torralba *et al.*, 1998). In *N. crassa* wurde neben dem Anschwellen der Hyphenspitze, auch der Verlust des arttypischen Spitzenkörpers sowie starke Verzweigungen der Hyphen beobachtet (Sánchez-León *et al.*, 2011; Virag und Griffiths, 2004). Ferner regulieren Rho-GTPasen die räumliche Anordnung von Aktinfilamenten in filamentösen Pilzen (Berepiki *et al.*, 2011). Der Ascomycet *A. gossypii* besitzt eine Rho-GTPase (AgRho3), deren Deletion zu blasenartigen Strukturen an den Hyphenspitzen führte (Wendland und Philippsen, 2001), vergleichbar mit dem Phänotyp von $\Delta pk1$ (Abb. 3-13). Grund dafür sollten multiple Polarisierungsstellen des Aktins in den Hyphenspitzen und das Fehlen eines zentralen Spitzenkörpers sein (Knechtle *et al.*, 2006). Zudem wies die *Agrho3*, ebenso wie die Deletionsmutante von FgPK1 in *F. graminearum*, ein deutlich reduziertes radiales Wachstum sowie vielkernige Zellen auf (Wendland und Philippsen, 2001). Aufgrund

dessen kann postuliert werden, dass FgPK1 möglicherweise in direkter Interaktion mit Rho-GTPasen in *F. graminearum* steht und durch Phosphorylierung deren Aktivität reguliert.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Entdeckung des deregulierten Aktinnetzwerkes in den Hyphen der Deletionsmutante (Abb. 8-5, Anhang) eine mögliche Erklärung für eine Vielzahl der beobachteten Phänotypen, wie Zellwanddefekte, Ausbildung von blasenartigen Strukturen sowie unpolares Hyphenwachstum, liefert. Inwiefern die Proteinkinase FgPK1 in der Regulation von Aktinfilamenten involviert ist, bleibt weiterhin unklar, ebenso wie deren Funktion in der Genregulation von Chitinsynthasen.

4.4. Identifizierung von strukturellen Modifikationen der Zellwand mittels hochauflösender Mikroskopiemethoden in $\Delta pk1$

Die Deletion der Proteinkinase FgPK1 führt zu erheblichen Zellwanddefekten, wie die Ergebnisse der Zellwandanalyse (Abb. 3-19) sowie die spontane Bildung von blasenartigen Verdickungen an Hyphenspitzen (Abb. 3-13) belegen. In diesem Zusammenhang konnten bereits eine erhöhte Genexpression der Chitinsynthase 3 (*Fgchs 3*, Abb. 3-20) und eine Deregulation des Aktinnetzwerkes identifiziert werden (Abb. 8-5, Anhang). Um Aussagen über den strukturellen Zellwandaufbau und der Anordnung von Zellwandpolysacchariden, insbesondere in den $\Delta pk1$ -Blasen, machen zu können, wurden verschiedene hochauflösende Mikroskopiemethoden angewandt.

Zunächst sollte untersucht werden, ob in den Zellwänden der Deletionsmutante die drei Polysaccharide (1,3)- β -Glucan, Chitin und Mannan vorkommen. Hierzu wurden diese mit spezifischen Fluorophoren angefärbt und am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mithilfe bestimmter Wellenlängen zum Leuchten angeregt. Betrachtet wurde der strukturelle Zellwandaufbau der Wildtyphyphe sowie die Hyphe und Blase der Deletionsmutante. Das (1,3)- β -Glucan konnte durch den Einsatz von Anilinblau visualisiert werden (Currier und Stugger, 1956; Eschrich und Currier, 1964). Eine entsprechende Fluoreszenz wurde in allen Proben lokalisiert, wobei diese an den Hyphenspitzen, der Ort der neuen Zellwandbiosynthese, die höchste Intensität besaß (Abb. 3-14 A, Beauvais *et al.*, 2001; Latgé, 2007). Das Lektin WGA, das spezifisch an Chitin bindet (Gooday, 1971), kann nur zugängliche und exponierte Bereiche detektieren und erschien daher gefleckt (Abb. 3-14 A, WGA-CFTM 488A; Schoffemeer *et al.*, 1999). Eine

besonders intensive WGA-Fluoreszenz war in der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase zu verzeichnen. Diese wurde in einer weiteren Mikroskopiestudie genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zellwand der blasenartigen Struktur ein signifikant stärkeres Fluoreszenzsignal aufwies, als die normal wachsende Hyphe der Deletionsmutante (Abb. 3-14 B). Demnach scheint ein erhöhter Chitingehalt in diesen speziellen Strukturen vorzuliegen, was in Korrelation mit der gesteigerten *Fgchs 3*-Genexpression (Abb. 3-20) sowie der erhöhten Glucosaminkonzentration in den Zellwänden von $\Delta pk1$ steht. Zudem könnte durch strukturelle Modifikationen der Zellwand die Zugänglichkeit des WGA verbessert worden sein, was die kontinuierliche Bindung an Chitin ermöglichte. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die äußere Zellwandschicht bestehend aus Mannoproteinen durch den Einsatz von Con A-CFTM 594 (Harris, 2005) mikroskopisch analysiert. Die Fluoreszenzintensität war in den Proben der Deletionsmutante sehr gering, was auf eine reduzierte oder gar fehlende Glycoproteinschicht hinwies (Abb. 3-14 A, Con A-CFTM 594). Diese Beobachtung korrelierte mit den Ergebnissen der Zellwandanalyse, da eine leichte Reduktion der Mannose, das Monosaccharide von Mannan, in den Proben der Deletionsmutanten gemessen wurde (Abb. 3-19). Durch das Fehlen der Mannoproteine in den blasenartigen Strukturen waren die strukturgebenden Polysaccharide Chitin und (1,3)- β -Glucan für die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe besser zugänglich. Dies könnte das intensive Fluoreszenzsignal, insbesondere des WGA-Farbstoff erklären (Abb. 3-14 B). Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen auch Schoffelmeer und Kollegen (1999), als sie die Zellwand von *F. oxysporum* analysierten. Ob zudem eine zusätzliche oder nach außen aufgelagerte Chitinschicht in der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase vorlag, konnte mit dieser Mikroskopiemethode nicht bestimmt werden.

Aus diesem Grund wurde der strukturelle Zellwandaufbau der blasenartigen Struktur von $\Delta pk1$ im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) analysiert. Zahlreiche Aufnahmen belegen den typischen zweischichtigen Zellwandaufbau, bestehend aus einer dunkel erscheinenden Außenschicht und einer transparenten inneren Schicht (Gow *et al.*, 2012; Dichtl *et al.*, 2015; Hunsley und Burnett, 1970). Diese Erkenntnisse konnten für die *F. graminearum*-Zellwand in der vorliegenden Arbeit (Abb. 1-2 A und 3-16 B, WT 8-1), aber auch schon vor über 20 Jahren von Barbosa und Kimmelmeier (1993) bestätigt werden. Die TEM-Aufnahmen von den Zellwänden des *F. graminearum*-Wildtyps 8-1 und der Deletionsmutante $\Delta pk1$ ließen einen signifikanten Unterschied bezüglich des Zellwanddurchmessers erkennen (Abb. 3-16; $\Delta pk1$ -Hyphe: 120 nm und 8-1: 60 nm). Die

Blasenzellwände erreichten sogar einen mittleren Wert von 185 nm. Auffallend war zudem die unterschiedliche Kontrastierung in der Zellwand des Wildtyps und der Mutante, was auf strukturelle Modifikationen hinwies (Abb. 3-16 B).

Um diese Hypothese zu verifizieren und die Anordnung der strukturgebenden Polysaccharide Chitin und (1,3)- β -Glucan im TEM zu visualisieren, wurde die hochspezifische Methode der Immunogoldmarkierung angewandt. Dazu wurden die gewünschten Strukturen mit einem primären Antikörper detektiert, welcher wiederum durch einen sekundären Gold-gekoppelten Antikörper markiert wurde. Zur Visualisierung des Chitins wurden Ultradünnschnitte der Wildtypphyphpe und der blasenartigen Struktur der Deletionsmutante mit dem Fluoreszenzfarbstoff WGA-CFTM 488A, welcher bereits in der Laserscanning-Mikroskopie zum Einsatz kam (Abb. 3-14), inkubiert. Anschließend wurde das WGA durch einen entsprechenden Anti-WGA-Antikörper markiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass die spezifische Bindung des WGA-Farbstoffs im Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden kann. Die Etablierung und erstmalige Anwendung dieses Verfahrens wurde im Zuge der vorliegenden Doktorarbeit durchgeführt. Die TEM-Aufnahmen zeigten, dass sich die Anzahl und Verteilung der Goldpartikel in den Zellwänden des Wildtyps und der Mutante signifikant unterschieden (Abb. 3-17 A), wobei eine hohe Dichte an Goldpartikeln in der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase zu verzeichnen war. Diese befanden sich vermehrt an der Außenseite, was auf eine stark ausgeprägte oder zusätzlich aufgelagerte Chitinschicht hinwies (Abb. 3-17 A, $\Delta pk1$ -Blase, vergrößerte Ausschnitte). Diese Beobachtungen stimmen mit den Erkenntnissen vom konfokalen Laserscanning-Mikroskop überein (Abb. 3-14 B). Das zusätzliche Chitin würde zudem den größeren Zellwanddurchmesser der $\Delta pk1$ -Blase erklären (Abb. 3-16 B). Neben der strukturellen Anordnung des Chitins wurde auch die Verteilung des (1,3)- β -Glucans analysiert. Hierzu wurde das Polysaccharide direkt über einen Anti-(1,3)- β -Glucan-Antikörper und anschließender Detektion mit einem entsprechenden Gold-gekoppelten Sekundärantikörper markiert. Signifikante Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der Mutante waren nicht zu verzeichnen und eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel über die gesamte Zellwand lag in beiden Proben vor (Abb. 3-17 B). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der gezeigten Anilinblaufluoreszenz (Abb. 3-14 A).

Um einen noch tieferen Einblick in den Aufbau der Zellwand zu bekommen, wurde die hochauflösende *dSTORM*-Methode, die direkte stochastische optische Rekonstruktionsmikroskopie, in Kooperation mit dem Heinrich-Pette-Institut angewandt. Hierbei können zelluläre Strukturen in lebenden Organismen mit Standardfluoreszenzfarbstoffen

visualisiert und deren Position im Nanometerbereich bestimmt werden (Eggert, 2015; Heilemann *et al.*, 2008). Die Polysaccharide Chitin und (1,3)- β -Glucan wurden mit den entsprechenden Farbstoffen WGA-Alexa Fluor[®] 647 und Anilinblau markiert. Die mikroskopischen Aufnahmen und die anschließende computergestützte Auswertung der Mikroskopiebilder wurden von Dr. Dennis Eggert (Heinrich-Pette-Institut – Leibniz-Institut für Experimentelle Virologie) durchgeführt. In den Übersichtsaufnahmen (Abb. 3-18 A) waren rote Bereiche, visualisierten Chitin, blaue Markierungen, entsprachen dem (1,3)- β -Glucan, sowie pink eingefärbte Überlappungszonen beider Farbstoffe/ Polymere zu erkennen. Hochaufgelöste Vergrößerungen von ausgesuchten Zellwandbereichen (Abb. 3-18 B) ließen die strukturellen Unterschiede deutlich erkennen. Demzufolge existiert eine starke Vernetzung beider Zellwandpolymere, dargestellt als gelbe B-Zonen, in den Hyphenzellwänden der Deletionsmutante und des Wildtyps (Abb. 3-18 B, gelbes und rotes Rechteck). Im Gegensatz dazu, schien die Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase aus separierten (1,3)- β -Glucan- und Chitinschichten zu bestehen (Abb. 3-18 B, grünes Rechteck). Diese verringerte Vernetzung führt vermutlich zur Instabilität der Zellwand und könnte die Erklärung für das spontane Entstehen sowie Zerplatzen der Blasen sein (Abb. 3-13 A). Hinzukommt, dass die Anordnung der Zellwandpolysaccharide in der blasenartigen Struktur nicht dem allgemein bekannten Modell zum Aufbau einer pilzlichen Zellwand entsprach (Abb. 1-2 B). Die Chitinschicht war nach außen exponiert, was mit den Ergebnissen der TEM-Aufnahmen (Abb. 3-17 A) sowie der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie (Abb. 3-14 B) korreliert. Ein entsprechendes Phänomen der strukturellen Deregulation im Zellwandaufbau wurde bisher in vergleichbaren Organismen noch nicht beschrieben. Ebenso wurde die *dSTORM*-Methode zur Lokalisation von Zellwandkomponenten in filamentösen Pilzen im Zuge dieser Arbeit erstmals angewandt. Hingegen wurden in der Zellwand von *A. thaliana* bereits erste Erkenntnisse zum strukturellen Aufbau und Vernetzung von Polysacchariden mittels *dSTORM* erzielt (Eggert *et al.*, 2014).

Die angewandten Mikroskopiemethoden offenbarten strukturelle Modifikationen im Zellwandaufbau bezüglich der Deletionsmutante. Insbesondere die Verteilung und Anordnung des Chitins sowie dessen Vernetzung zum (1,3)- β -Glucan sind in der blasenartigen Struktur der $\Delta pk1$ -Mutante dereguliert. Derzeit wird angenommen, dass die Fehlfunktion des Aktinnetzwerkes (Abb. 8-5 B, Anhang) Ursache für den beobachteten Zellwandphänotyp ist. Die fehlende Mannoproteinschicht auf der Zellwandaußenseite der Blasen wurde im konfokalen Mikroskop entdeckt und im TEM bestätigt. Eine mögliche

Erklärung dieses Phänomens liefern die *dSTORM*-Bilder. Mannoproteine sind vorrangig über kurzkettiges (1,6)- β -Glucan mit dem Chitin-Glucan-Netzwerk verknüpft (Pérez und Ribas, 2013; Gow *et al.*, 2012; Klis, 1994). Diese konnten vermutlich, aufgrund der vertauschten Chitin- und (1,3)- β -Glucanschicht in der Blasenzellwand, nicht mehr an das 1,6- β -Glucan binden und wurden folglich in die Umgebung freigesetzt. Somit könnte die Delokalisation der strukturgebenden Zellwandpolymere das Fehlen von Glycoproteinen verursachen.

4.5. Rekonstruktion des strukturellen Zellwandaufbaus der Deletionsmutante $\Delta pk1$ und des Wildtyps von *F. graminearum*

Die mikroskopischen Untersuchungen der Zellwand (Abb. 3-14, 3-17 und 3-18) sowie die Ergebnisse der Zellwandanalyse (Abb. 3-19) gaben Einblicke in den strukturellen Aufbau der Zellwand des Wildtypen und der Deletionsmutante. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wird im Folgenden ein bildgebendes Modell zum pilzlichen Zellwandaufbau beider Stämme generiert.

Das allgemein bekannte Modell zum Zellwandaufbau von Pilzen (Abb. 1-2 B) besteht aus einer dünnen Chitinschicht, die kovalent an das darüberliegende (1,3)- β -Glucan gebunden ist. Auf der Zellwandaußenseite befinden sich glykolysierte Proteine, die vor allem über (1,6)- β -Glucan an der Zellwand assoziiert und in ihrer Zusammensetzung individuell für jede Pilzart sind (Klis, 1994; Pérez und Ribas, 2013; Free, 2013; Gow *et al.*, 2012).

Die, aus dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zum Zellwandaufbau des *F. graminearum*-Wildtyps 8-1 stimmen im Allgemeinen mit dem bestehenden Modell überein. Jedoch scheint eine stärkere Vernetzung des Chitin-Glucan-Netzwerkes vorzuliegen (Abb. 4-1 A). Dies belegen die TEM-Aufnahmen zur Immunogoldmarkierung des Chitin und (1,3)- β -Glucans, da eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel über die gesamte Zellwand für beide Polymere zu beobachten war (Abb. 3-17). Dieser Befund wird durch die ausgewerteten *dSTORM*-Bilder bestätigt. Eine große Überlagerungszone des Chitins und (1,3)- β -Glucans wurden durch pink gefärbte Bereiche in der Übersichtsaufnahme (Abb. 3-18 A) sowie einer gelben Schicht in dem vergrößerten Zellwandausschnitt (Abb. 3-18 B, rotes Rechteck) verdeutlicht. In der Zellwand von *F. graminearum* liegt demnach keine Schichtung des Chitins und (1,3)- β -Glucans vor, sondern ein komplexes Netzwerk (Abb. 4-1 A). Eine nach außen aufgelagerte Mannoproteinschicht, wie sie in der Literatur beschrieben wird (Pérez und Ribas, 2013; Klis, 1994), konnte einerseits durch die

Markierung des Mannans mit dem fluoreszierenden Lektin Con A-CFTM 594 (Abb. 3-14 A) und andererseits durch TEM-Aufnahmen (Abb. 1-2 A, 3-16 B) bestätigt werden.

Die Deletion der Proteinkinase FgPK1 in *F. graminearum* führt zu erheblichen Veränderungen des strukturellen Zellwandaufbaus. Eine Deregulation des Aktinnetzwerks scheint die maßgebende Ursache dieses Phänotyps zu sein (Abb. 8-5, Anhang). Die Auswertung aller Ergebnisse bezüglich der $\Delta pk1$ -Hyphenzellwand resultiert in einem Modell mit einer deutlich größeren Schicht des Chitin-Glucan-Netzwerkes im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 4-1 B). Diese Annahme geht aus den Messungen der Zellwandstärke hervor (Abb. 3-16 B). Eine starke Vernetzung der strukturgebenden Polysaccharide, ähnlich zum Wildtyp, war in dem entsprechenden Zellwandausschnitt der *dSTORM*-Aufnahme zu erkennen (Abb. 3-18 B, gelbes Rechteck). Dabei waren die Signale des WGA-Farbstoffs auf bestimmte Bereiche beschränkt. Dies lag wahrscheinlich an der eingeschränkten Bindefähigkeit des Fluorochroms (Schoffemeer *et al.*, 1999). Trotzdem kann eine Anordnung des Chitins in sogenannte *Patches* derzeit nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4-1 A und B, grüne Querbalken). Hinsichtlich der glykolysierten Proteine belegten die mikroskopischen Aufnahmen, dass diese, verglichen zum Wildtyp, in geringer Anzahl in der Hyphenzellwand von $\Delta pk1$ vorkamen (Abb. 3-14 A). Zudem waren diese in den TEM-Bildern kaum sichtbar (Abb. 3-16 B). Das rekonstruierte Modell zur Zellwand der $\Delta pk1$ -Hyphel zeigt das Vorhandensein aller Zellwandkomponenten sowie einer stark ausgeprägten Chitin-Glucan-Schicht (Abb. 4-1 B).

Abschließend soll ein bildgebendes Modell zur Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase vorgestellt werden (Abb. 4-1 C). Diese spezielle Struktur zeichnet sich durch eine ungewöhnliche Größe (Abb. 3-15 A), deren spontane Bildung und Lyse (Abb. 3-13 A), das Vorkommen von mehreren Zellkernen (Abb. 3-15, Sternchen und Abb. 3-10 E) sowie einer großen Vakuole (Abb. 3-17) aus. Unabhängige Untersuchungen zur Zellwand ergaben, dass diese einen erhöhten Chitingehalt (Abb. 3-14 B, 3-17 A) und keine Mannoproteine (Abb. 3-14 A, 3-16 B) beinhaltet. Die Ergebnisse der Genexpression von Chitinsynthase (Abb. 3-20) und der Zellwandanalyse (Abb. 3-19) unterstützen diese Erkenntnisse. Eine Trennung der Chitin- und (1,3)- β -Glucanschicht sowie deren Delokalisation wurden durch *dSTORM*-Aufnahmen belegt (Abb. 3-18 B, grünes und weißes Rechteck). Dies könnte eine erhebliche Instabilität der Zellwand der $\Delta pk1$ -Blase zur Folge haben und ist vermutlich für das schnelle Lysieren der Blasen verantwortlich. Die Zellwanddicke der Blase war dreimal so groß im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3-16 B, 4-2 C). Die umgekehrte Schichtung des Chitin und (1,3)- β -Glucans könnte die Bindung der Mannoproteine an das (1,6)- β -Glucan

verhindern. Infolgedessen bildet Chitin die äußere Zellschicht (Abb. 4-1 C), weshalb das WGA dieses Polymer effektiv detektieren konnte und somit die intensive Fluoreszenz vom konfokalen Lancerscanning-Mikroskop erklärt wäre (Abb. 3-14 B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Deletion der Proteinkinase FgPK1 zu erheblichen strukturellen Zellwandveränderungen führt. Durch den Einsatz von bildgebenden und hochauflösenden Mikroskopiertechniken gelang es, das allgemein bekannte Modell zum pilzlichen Zellwandaufbau bezüglich des filamentösen Pilzes *F. graminearum* zu erweitern und anzupassen. Die zahlreichen Erkenntnisse über die Zellwand von $\Delta pk1$, die aus den Untersuchungen dieser Doktorarbeit resultieren, ermöglichten deren schematische Rekonstruktion sowie die Aufklärung einer Vielzahl der beschriebenen Phänotypen. Somit tragen die Ergebnisse entscheidend zur funktionalen Charakterisierung der FgPK1 bei. Zudem konnten neue Mikroskopiemethoden an dieser *F. graminearum*-Mutante etabliert werden. Weiterhin wurde eindrucksvoll gezeigt, dass auch alt bewährten Methoden, wie TEM, unerlässlich für eine umfassende Charakterisierung von zellulären Strukturen sind.

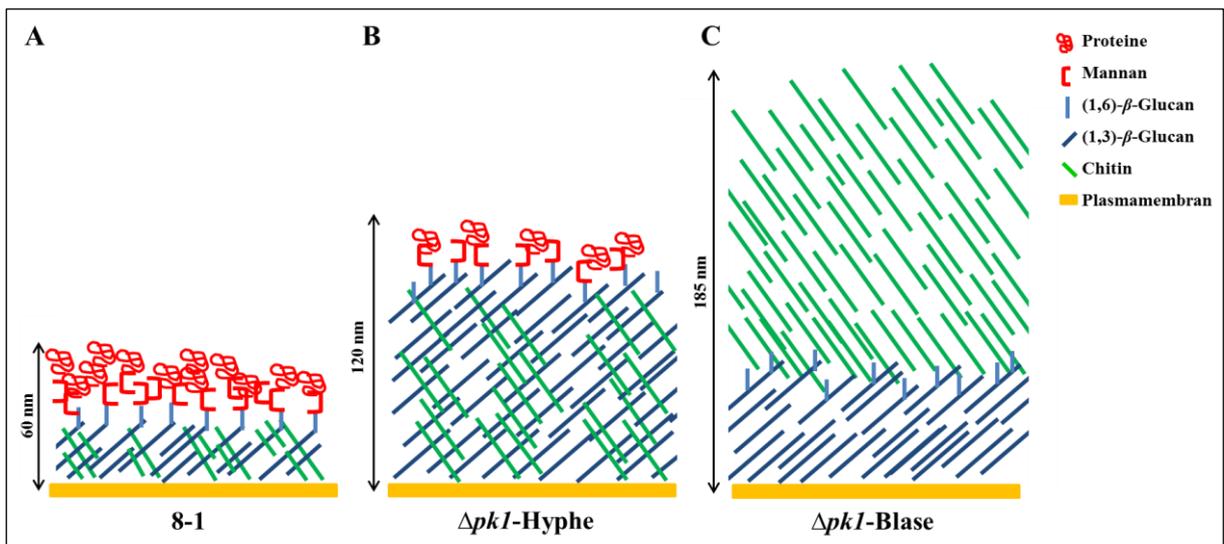


Abbildung 4-1: Schematische Rekonstruktion der Zellwände von 8-1 und $\Delta pk1$.

Grundlage zur Generierung dieser Modelle sind die Ergebnisse bezüglich des strukturellen Zellwandaufbaus des Wildtyps und der Deletionsmutante.

A: Wildtyp 8-1; B: Hyphenzellwand von $\Delta pk1$ und C: Zellwand der blasenartigen Struktur der Deletionsmutante.

4.6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit stand die biologische Charakterisierung der (1,3)- β -Glucansynthase FgGSL1 des Ascomyceten *F. graminearum* im Fokus. Um Lokalisationsstudien dieses Enzyms durchführen zu können, wurden fluoreszierende Fusionsproteine generiert. Diese führten trotz verschiedener Klonierungsstrategien (N- und C-terminale Fusion, Integration des GFP in die kodierende Sequenz nach Cortés *et al.*, 2005) und der Anwendung von zwei Fluoreszenzproteinen (GFP und mCherry) nicht zur gewünschten Fluoreszenz der FgGSL1. In künftigen Versuchen könnte die Verwendung von kleineren oder strukturell anders aufgebauten, fluoreszierenden Proteinen (eine Übersicht dazu geben Shaner *et al.*, 2005; Giepmans *et al.*, 2006), aber auch eine ektopische Integration des Fusionsproteins ins *F. graminearum*-Genom zur erfolgreichen Proteinlokalisierung führen. Zur Charakterisierung der FgGSL1 scheint die Anwendung der RNA-Interferenz hilfreich zu sein, wie dies bereits in einigen filamentösen Pilzen gezeigt wurde (Tentler *et al.*, 1997; Oliveira-Gracia und Deising, 2013; Ha *et al.*, 2006; Dichtl *et al.*, 2015; siehe 4.1.4.).

Im zweiten Teil der Dissertation wurde eine biologische Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$, eine Gendeletion der Serin/ Threonin Proteinkinase gad8 (FgPK1), von *F. graminearum*, vor allem in Hinblick auf Zellwandveränderungen vorgenommen. Neben dem auffällig reduzierten und unpolarem Wachstum, ist die spontane Bildung von blasenartigen Verdickungen an den Hyphenspitzen ein prägendes Merkmal dieser Mutante (Abb. 3-13). Die Anwendungen verschiedener hochauflösender Mikroskopiemethoden offenbarte strukturelle Zellwandmodifikationen bezüglich der $\Delta pk1$ -Blasen. Ein entsprechendes schematisches Modell konnte generiert werden (Abb. 4-1 C). Ob der veränderte Zellwandaufbau die Voraussetzung zur Entstehung der blasenartigen Verdickung ist oder diese Zellwandmodifikationen als Folge der enormen Ausdehnung der Zelle induziert werden, müssen künftige mikroskopische Untersuchungen klären. Die Anfertigung eines Genexpressionsprofils von bedeutenden Zellwand-Strukturproteinen ergab eine signifikante Erhöhung der Chitinsynthase 3 (*Fgchs 3*) in den Proben von $\Delta pk1$ (Abb. 3-20). Entsprechend dazu konnte ein erhöhter Chitingehalt in der Zellwand der Deletionsmutante festgestellt werden. Welche Funktion hierbei der FgPK1 zukommt, könnten weitere biochemische Untersuchungen der Proteine *Fgchs3* und FgPK1 klären. Dazu wäre die Generierung von fluoreszierenden Fusionsproteinen zur Durchführung von Lokalisationsstudien *in vivo* hilfreich. Eine biochemische Charakterisierung von FgPK1, wie etwa der Nachweis der Kinaseaktivität, könnte durch

eine heterologe Proteinexpression und anschließender Isolierung erreicht werden. Zudem ließen sich mit hochauflösenden Methoden zur Strukturaufklärung, wie der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) oder Proteinkristallographie, aktive Zentren und mögliche Phosphorylierungsstellen lokalisieren. Weiterhin bestünde die Möglichkeit mit der aufgereinigten FgPK1 über die Methode des Co-IP (Co-Immunopräzipitation) Interaktionspartner zu identifizieren, die anschließend durch BiFC (Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation) *in vivo* verifiziert werden könnten.

5. Zusammenfassung

F. graminearum ist ein Blütenpathogen, das insbesondere kleinkörnige Getreidearten befällt. Die landwirtschaftlichen Folgen eines Befalls sind sowohl quantitative Einbußen, als auch qualitative Verluste, da das Pathogen durch die Sekretion von Mykotoxinen das Erntegut verunreinigt. Aufgrund dessen ist es von größter Bedeutung die Pathogenität von *F. graminearum* näher zu untersuchen. Während einer Pflanzeninfektion wird der pilzlichen Zellwand, die den ersten Kontakt zum Wirtsorganismus herstellt, eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Die strukturgebenden Polysaccharide Chitin und (1,3)- β -Glucan bilden mit über 90 % die Hauptbestandteile pilzlicher Zellwände. Trotz der essentiellen Bedeutung ist bisher nur wenig über die Biosynthese des (1,3)- β -Glucans und dessen Enzym, der (1,3)- β -Glucansynthase, bekannt.

In der vorliegenden Dissertation sollte eine biologische Charakterisierung der (1,3)- β -Glucansynthase FgGSL1 von *F. graminearum* durchgeführt werden. Um Lokalisationsstudien des Proteins *in vivo* durchführen zu können, wurden verschiedene fluoreszierende Fusionsproteine generiert und über eine homologe Rekombination in den nativen *FgGSL1*-Genlocus transformiert. Diese Klonierungsstrategien führten nicht zur erwarteten Fluoreszenz des Zielproteins. Jedoch wiesen die Mutantenstämme morphologische Veränderung, wie eine Reduktion des radialen Wachstums und der Virulenz auf Weizen, auf. Dabei trug die Position des Fluoreszenzproteins, also die N- oder C-terminale Fusion, entscheidend zur Ausprägung des Phänotyps bei. Auch das Fluoreszenzprotein an sich schien einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie des Pilzes zu haben, da zwischen Mutanten mit N-terminal fusioniertem GFP und mCherry signifikante Unterschiede hinsichtlich der Konidienlänge ermittelt wurden. Aufgrund der Tatsache, dass FgGSL1 die Biosynthese des (1,3)- β -Glucans katalysiert, lag der Verdacht nahe, dass die Modifikation des Proteins zu Zellwandveränderungen führt. Daher wurde eine effiziente Methode zur Zellwandanalyse im Zuge dieser Arbeit etabliert und durchgeführt. Die Auswertung der erhaltenen Daten ergab eine Reduktion des (1,3)- β -Glucans sowie eine Zunahme an Chitin in den Zellwänden der GSL1-Mutanten verglichen zum Wildtyp. Durch die Klonierung und Transformation eines Komplementationskonstrukts konnten die beschriebenen Phänotypen der Mutantenstämme aufgehoben werden. Dies bestätigt, dass die homolog integrierten *FgGSL1*-Fusionskonstrukte für die phänotypischen Veränderungen verantwortlich sind.

Im weiteren Verlauf dieser Doktorarbeit sollte eine biologische Charakterisierung der Deletionsmutante $\Delta pk1$ von *F. graminearum*, insbesondere in Hinblick auf

Zellwandveränderungen durchgeführt werden. In dieser Mutante wurde die essentielle Serin/ Threonin Proteinkinase FgPK1 deletiert (durchgeführt von Dr. Christian Voigt), was zu erheblichen Wachstumsdefiziten des Pilzes führte. Die zelluläre Lokalisation dieses Proteins sowie putative Interaktionspartner sind nicht unbekannt und können nur über orthologe Proteinkinasen der Hefe postuliert werden. In mikroskopischen Untersuchungen konnte die spontane Entstehung sowie Lyse von blasenartigen Verdickungen an den Hyphenspitzen identifiziert und dokumentiert werden. Folglich wurde vermutet, dass Veränderungen der Zellwand in diesen speziellen Strukturen vorlagen. Eine anschließende Zellwandanalyse des Pilzmyzels der $\Delta pk1$ ergab einen erhöhten Chitingehalt. Dies korrelierte mit einer signifikant erhöhten Genexpression der Chitinsynthase 3. Ebenso konnte dieser Befund durch die Anwendung von hochauflösenden Mikroskopietechniken (CLSM, TEM, *dSTORM*) verifiziert werden. Anhand der generierten Ergebnisse bezüglich des strukturellen Zellwandaufbaus, wurde dieser rekonstruiert und in bildgebende, schematische Modelle wiedergegeben. Folglich konnte eine Anpassung und Erweiterung des allgemein bekannten Modells zum Aufbau pilzlicher Zellwände im Fall von *F. graminearum* vorgenommen werden.

6. Abstract

F. graminearum is a phytopathogen that infects small grains and causes *Fusarium Head Blight* (FHB), one of the most destructive crop diseases worldwide. The infected grains are contaminated with mycotoxins that are harmful to animals and humans. Because of its economic importance, investigations targeting the molecular basis of a *F. graminearum* infection would be essential to improve plants resistance and to develop new anti-fungal drugs. The fungal cell wall plays an important role during plant infection, because it represents the first compartment that gets into contact with the plant surface. The cell wall of filamentous fungi basically consists of polysaccharides mainly formed by chitin and (1,3)- β -glucan. Despite its importance, only little is known about the biosynthesis of (1,3)- β -glucan and its corresponding enzyme (1,3)- β -glucan synthase.

The aim of this PhD thesis was to characterize the (1,3)- β -glucan synthase FgGSL1 of the plant pathogenic fungus *F. graminearum*. To study the localization of this enzyme *in vivo*, I generated different fusion proteins using GFP or mCherry. I also tried an N- and C-terminal fusion to get a successful intracellular localization of FgGSL1. The constructs were transformed into the native *FgGSL1* locus by homologue recombination strategy. Against all expectations, none of the mutants showed a bright fluorescent signal, but all displayed a reduction in growth and pathogenicity. Thereby the position of the GFP or mCherry, that means the N- or C- terminal fusion, has differently strong effects to the phenotype. But also the type of the fluorescent protein seems to influence the morphology of *F. graminearum* as shown by different length of the conidia. Due to the fact that FgGSL1 catalyzes the formation of the important cell wall polymer (1,3)- β -glucan, it would be assumed that modifications of this protein lead to significant cell wall changes. Therefore I established an effective and simple method to determine the composition of the cell wall via chemical hydrolysis and HPLC. It could be shown that the cell wall of the mutants contains less (1,3)- β -glucan but more chitin compared to the wildtype. To prove that the homologue integrated FgGSL1 fusion constructs were responsible for all observed phenotypes, I generated a complementary construct to reconstruct the wildtype *FgGSL1* locus. This mutant did not show any differences to the wildtype.

The aim of the second part of this work was to characterize the *F. graminearum* deletion mutant $\Delta pk1$, a gene deletion of the essential serine/ threonine protein kinase *gad8* (FgPK1). This mutant was generated by Dr. Christian Voigt and showed morphological changes like a significant reduction in growth. Furthermore, the function and intracellular localization of FgPK1 are unknown. Here, I concentrated on phenotypes related to cell

wall defects. Microscopic observations revealed a spontaneous and rapid formation of huge bulb-like structures at hyphal tips. It has been assumed that these bubbles would be related to cell wall changes. Therefore a cell wall analysis was performed which indicated an increase of chitin in the cell wall of $\Delta pk1$. Accordingly to this result, a gene expression analysis revealed a significant increase in chitin synthase 3 expression in the mutant. In addition, the pictures of different high-resolution microscopic methods (CLSM, TEM, *dSTORM*) verified the findings of an increased amount of chitin in the cell wall of these bulb-like structures. Combining all obtained results, the cell walls of the wildtype and mutant were reconstructed and summarized in an advanced and new model of fungal cell wall, respectively.

7. Literaturverzeichnis

- Anjos, J., Fernandes, C., Silva, B. M., Quintas, C., Abrunheiro, A., Gow, N. A., Gonçalves, T. (2012) β (1, 3)-glucan synthase complex from *Alternaria infectoria*, a rare dematiaceous human pathogen. *Medical Mycology* 50 (7): 716-725
- Araki, Y., Ito, E. (1975) A pathway of chitosan formation in *Mucor rouxii*. *European Journal of Biochemistry* 55 (1): 71-78
- Aspinall, G. O., Kessler, G. (1957) The structure of callose from the grape vine. *J. Soc. Chemistry and Industry* 1296 39p
- Bacic, A., Fincher, G. B., Stone, B. A. (2009) Chemistry, Biochemistry, and Biology of 1-3 Beta Glucans and Related Polysaccharides. *Academic Press*
- Bai, G., Shaner, G. (1994) Scab of wheat: prospects for control. *Plant Disease* 78 (8): 760-766
- Barbosa, I. P., Kimmelmeier, C. (1993) Chemical Composition of the Hyphal Wall from *Fusarium graminearum*. *Experimental Mycology* 17 (4): 274-283
- Bartnicki-Garcia, S. (1968) Cell Wall Chemistry, Morphogenesis, and Taxonomy of Fungi. *Annual Review of Microbiology* Vol 22: 87-108
- Beauvais, A., Bruneau, J. M., Mol, P. C., Buitrago, M. J., Legrand, R., Latgé, J. P. (2001) Glucan Synthase Complex of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Bacteriology* 183 (7): 2273-2279
- Berepiki, A., Lichius, A., Read, N. D. (2011) Actin organization and dynamics in filamentous fungi. *Nature Reviews Microbiology* 9 (12): 876-887
- Beth-Din, A., Yarden, O. (2000) The *Neurospora crassa* chs3 gene encodes an essential class I chitin synthase. *Mycologia* 65-73
- Blümke, A. (2013) Induktion der Resistenz gegenüber dem Weizenpathogen *Fusarium graminearum* durch gezielte Zellwandveränderungen in *Brachypodium distachyon*. Dissertation Universität Hamburg
- Blümke, A., Falter, C. C., Herrfurth, C., Sode, B., Bode, R., Schäfer, W., Feussner, I., Voigt, C. A. (2014) Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. *Plant Physiology* 165 (1): 346-358
- Boenisch, M. J., Schäfer, W. (2011) *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Biology* 2011 11:110

- Bowman, S. M., Free, S. J. (2006) The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays* 28 (8): 799-808
- Bulawa, C. E. (1992) CSD2, CSD3, and CSD4, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the CSD2 gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Molecular and Cellular Biology* 12 (4): 1764-1776
- Bushnell, W. R., Hazen, B. E., Pritsch, C., Leonard, K. J. (2003) Histology and physiology of *Fusarium* head blight. *Fusarium head blight of wheat and barley*, pp. 44-83
- Cabib, E., Silverman, S. J., Shaw, J. A. (1992) Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 138 (1): 97-102
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B., Varma, A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 276 (23): 19679-19682
- Casamayor, A., Torrance, P. D., Kobayashi, T., Thorner, J., Alessi, D. R. (1999) Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Current Biology* 9 (4): 186-197
- Chen, P., Lee, K. S., Levin, D. E. (1993) A pair of putative protein kinase genes (*YPK1* and *YPK2*) is required for cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG* 236 (2-3): 443-447
- Chen, X. Y., Kim, J. Y. (2009) Callose synthesis in higher plants. *Plant Signaling & Behavior* 4 (6): 489-492
- Choquer, M., Boccara, M., Gonçalves, I. R., Soulié, M. C., Vidal-Cros, A. (2004) Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six eucaryotic genomes. *European Journal of Biochemistry* 271 (11): 2153-2164
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., Hieter, P. (1992) Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119-122
- Cohen, P. (1976) Regulation of protein function by multisite phosphorylation. *Trends in Biochemical Sciences* 1(2): 38-40
- Cohen, P. (1999) The development and therapeutic potential of protein kinase inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology* 3 (4): 459-465
- Cohen, P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 596-601
- Cohen, P. (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature Cell Biology* 4 (5): E127-E130

- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., Dunlap, J. C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *PNAS* 103: 10352-10357
- Cortés, J. C. G., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A., Ribas, J. C. (2005) The novel fission yeast (1, 3) β -D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *Journal of Cell Science* 118 (1): 157-174
- Cortés, J. C. G., Konomi, M., Martins, I. M., Muñoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Durán, A., Ribas, J. C. (2007) The (1,3) β -d-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Molecular Microbiology* 65 (1): 201-217
- Cos, T., Ford, R. A., Trilla, J. A., Duran, A., Cabib, E., Roncero, C. (1998) Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *European Journal of Biochemistry* 256 (2): 419-426
- Crouch, J. A., Beirn, L. A. (2009) Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* 39: 19-44
- Cuomo, C. A., Güldener, U., Xu, J. R., Trail, F., Turgeon, B. G., Di Pietro, A. *et al.* (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317 (5843): 1400-1402
- Currier, H. B., Strugger, S. (1956) Aniline blue and fluorescence microscopy of callose in bulb scales of *Allium cepa* L. *Protoplasma* 45 (4): 552-559
- Deininger, M., Buchdunger, E., Druker, B. J. (2005) The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* 105 (7): 2640-2653
- Desjardins, A. E., Hohn, T. M. (1997) Mycotoxins in Plant Pathogenesis. *MPMI* Vol. 10 (2): 147-152
- Dhanasekaran, N., Reddy, E. P. (1998) Signaling by dual specificity kinases. *Oncogene* 17 (11): 1447-1455
- Dichtl, K., Samantaray, S., Amanianda, V., Zhu, Z., Prévost, M.-C., Latgé, J-P., Ebel, F., Wagener, J. (2015) *Aspergillus fumigatus* devoid of cell wall β -1,3-glucan is viable, massively sheds galactomannan and is killed by septum formation inhibitors. *Molecular Microbiology* 95 (3): 458-471
- D'Mello, J. P. F., Placinta, C. M., Macdonald, A. M. C. (1999) *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology* 80 (3): 183-205

- Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Mandala, S. M., Frommer, B. R., Kurtz, M. B. (1994) *The Saccharomyces cerevisiae FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-β-D-glucan synthase. PNAS* 91 (26): 12907-12911
- Douglas, C. M., D'ippolito, J. A., Shei, G. J., Meinz, M., Onishi, J., Marrinan, J. A., Li, W., Abruzzo, G. K., Flattery, A., Bartizal, K., Mitchell, A., Kurtz M. B. (1997) Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41 (11): 2471-2479
- Douglas, C. M. (2001) Fungal β (1,3)-D-glucan synthesis. *Medical Mycology* 39 (1): 55-66
- Eggert, D., Naumann, M., Reimer, R., Voigt, C. A. (2014) Nanoscale glucan polymer network causes pathogen resistance. *Scientific Reports* 4: 4159
- Eggert, D. (2015) Romeis - Mikroskopische Techniken: Kapitel 2: Hochauflösende Mikroskopie. Springer-Verlag S. 47-54
- El Gueddari, N. E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B. M., Deising, H. B. (2002) Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytologist* 156 (1): 103-112
- Ellinger, D., Naumann, M., Falter, C., Zwikowics, C., Jamrow, T., Manisseri, C., Somerville, S. C., Voigt, C. A. (2013) Elevated Early Callose Deposition Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew in Arabidopsis. *Plant Physiology* 161 (3): 1433-1444
- Ellinger, D., Voigt, C. A. (2014) Callose biosynthesis in arabidopsis with a focus on pathogen response: what we have learned within the last decade. *Annals of Botany*, mcu120
- Ellinger, D., Glöckner, A., Koch, J., Naumann, M., Stürtz, V., Schütt, K., Manisseri, C., Somerville, S. C., Voigt, C. A. (2014) Interaction of the *Arabidopsis* GTPase RabA4c with Its Effector PMR4 Results in Complete Penetration Resistance to Powdery Mildew. *The Plant Cell* 26 (7): 3185-3200
- Enderlin, C. S., Selitrennikoff, C. P. (1994) Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* gene required for (1,3) beta-glucan synthase activity and cell wall formation. *PNAS* 91 (20): 9500-9504
- Eschrich, W., Currier, H. B. (1964) Identification of Cause by its Diachrome and Fluorochrome Reactions. *Stain Technology* 39 (5): 303-307
- Falter, C., Ellinger, D., Von Hülsen, B., Heim, R., Voigt, C. A. (2015). Simple preparation of plant epidermal tissue for laser microdissection and downstream quantitative proteome and carbohydrate analysis. *Frontiers in Plant Science* 6: 194

- Farkas, V. (1985) The fungal cell wall. *Fungal Protoplasts: Applications in Biochemistry and Genetics* 3-29
- Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M., Latgé, J. P. (2000) Molecular Organization of the Alkali-insoluble Fraction of *Aspergillus fumigatus* Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* 275 (36): 27594-27607
- Ford, R. A., Shaw, J. A., Cabib, E. (1996) Yeast chitin synthases 1 and 2 consist of a non-homologous and dispensable N-terminal region and of a homologous moiety essential for function. *Molecular and General Genetics MGG* 252 (4): 420-428
- François, J. M. (2007) A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nature Protocols* 1: 2995-3000
- Free, S. J. (2013) Fungal Cell Wall Organization and Biosynthesis. *Advances in Genetics* 81 (2): 34-71
- Futerman, A. H., Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Reports* 5 (8): 777-782
- Gaffor, I., Brown, D. W., Plattner, R. D., Proctor, R. H., Qi, W., Trail, F. (2005) Functional Analysis of the Polyketide Synthase Genes in the Filamentous Fungus *Gibberella zeae* (Anamorph *Fusarium graminearum*). *Eukaryotic Cell* 4: 1926-1933
- García-Rodríguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A., Roncero, C. (2000) Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the fks1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 478 (1-2): 84-88
- Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V., Latgé, J. P. (2009) *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future Microbiology* 4 (5): 583-595
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y. (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312 (5771): 217-224
- Gilbert, J., Fernando, W. G. D. (2004) Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae* / *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 464-472
- Gooday, G. W. (1971) An autoradiographic study of hyphal growth of some fungi. *Microbiology* 67 (2): 125-133
- Goswami, R. S., Kistler, H. C. (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5 (6): 515-525
- Gow, N. A., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J., Netea, M. G. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology* 10 (2): 112-122

- Ha, Y., Covert, S. F., Momany, M. (2006) FsFKS1, the 1,3- β -Glucan Synthase from the Caspofungin-Resistant Fungus *Fusarium solani*. *Eukaryotic Cell*: 1036-1042
- Hanks, S. K., Hunter, T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB journal* 9 (8): 576-596
- Harris, S. D. (2005) Morphogenesis in germinating *Fusarium graminearum* macroconidia. *Mycologia* 97 (4): 880-887
- Hartland, R. P., Fontaine, T., Debeaupuis, J. P., Simenel, C., Delepierre, M., Latgé, J. P. (1996) A Novel β -(1,3)-Glucanosyltransferase from the Cell Wall of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Biological Chemistry* 271 (43): 26843-26849
- Heilemann, M., van de Linde, S., Schüttpelz, M., Kasper, R., Seefeldt, B., Mukherjee, A., Tinnefeld, P., Sauer, M. (2008) Subdiffraction-Resolution Fluorescence Imaging with Conventional Fluorescent Probes. *Angewandte Chemie International Edition* 47 (33): 6172-6176
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., Jacoby, J. J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 32 (4): 671-680
- Helliwell, S. B., Schmidt, A., Ohya, Y., Hall, M. N. (1998) The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Current Biology* 8 (22): 1211-1214
- Hong, Z., Zhang, Z., Olson, J. M., Verma, D. P. S. (2001) A Novel UDP-Glucose Transferase Is Part of the Callose Synthase Complex and Interacts with phragmoplastin at the Forming Cell Plate. *The Plant Cell* 13 (4): 769-779
- Horiuchi, H. (2008) Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation. *Medical Mycology* 47: S47-S52
- Hunsley, D. B. J. H., Burnett, J. H. (1970) The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. *Microbiology* 62 (2): 203-218
- Hunter, T. (2000) Signaling - 2000 and beyond. *Cell* 100 (1): 113-127
- Igual, J. C., Johnson, A. L., Johnston, L. H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *The EMBO Journal* 15 (18): 5001-5013
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M. N., Matsumoto, K. (1999) PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Molecular and Cellular Biology* 19 (12): 8344-8352

- Inoue, S. B., Takewakt, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., Watanabe, T. (1995) Characterization and gene cloning of 1, 3- β -D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 231 (3): 845-854
- Ishihara, S., Hirata, A., Nogami, S., Beauvais, A., Latge, J. P., Ohya, Y. (2007) Homologous Subunits of 1,3-Beta-Glucan Synthase Are Important for Spore Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* 6 (2): 143-156
- Jacobs, A. K., Lipka, V., Burton, R. A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., Fincher, G. B. (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell* 15 (11): 2503-2513
- Jenczmionka, N. J., Maier, F. J., Lösch, A. P., Schäfer, W. (2003) Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase gpmk1. *Current Genetics* 43 (2): 87-95
- Jenczmionka, N. J., Schäfer, W. (2005) The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current Genetics* 47 (1): 29-36
- Johnson, M. E., Edlind, T. D. (2012) Topological and Mutational Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryotic Cell* 11 (7): 952-960
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C. P., Anraku, Y., Ohya, Y., Levin, D. E. (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9193-9196
- Kelly, R., Register, E., Hsu, M. J., Kurtz, M., Nielsen, J. (1996) Isolation of a Gene Involved in 1, 3-beta-Glucan Synthesis in *Aspergillus nidulans* and Purification of the Corresponding Protein. *Journal of Bacteriology* 178 (15): 4381-4391
- Kim, J. E., Lee, H. J., Lee, J., Kim, K. W., Yun, S. H., Shim, W. B., Lee, Y. W. (2009) *Gibberella zeae* chitin synthase genes, *GzCHS5* and *GzCHS7*, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. *Current Genetics* 55 (4): 449-459
- Kleemann, J., Rincon-Rivera, L. J., Takahara, H., Neumann, U., Ver Loren van Themaat, E., van der Does, H. C., Hacquard, S., Stüber, K., Will, I., Schmalenbach, W., Schmelzer, E., O'Connell, R. J. (2012) Sequential Delivery of Host-Induced Virulence Effectors by Appressoria and Intracellular Hyphae of the Phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*. *PLOS Pathogen* 8 (4): e1002643
- Klis, F. M. (1994) Review: Cell Wall assembly in Yeast. *Yeast* 10 (7): 851-869
- Klis, F. M., Boorsma, A., De Groot, P. W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23 (3): 185-202

- Knechtle, P., Wendland, J., Philippsen, P. (2006) The SH3/PH domain protein AgBoi1/2 collaborates with the Rho-type GTPase AgRho3 to prevent nonpolar growth at hyphal tips of *Ashbya gossypii*. *Eukaryotic Cell* 5 (10): 1635-1647
- Knox, J. P. (2008) Revealing the structural and functional diversity of plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11 (3): 308-313
- Kollár, R., Petráková, E., Ashwell, G., Robbins, P. W., Cabib, E. (1995) Architecture of the Yeast Cell Wall THE LINKAGE BETWEEN CHITIN AND β (1 \rightarrow 3)-GLUCAN. *Journal of Biological Chemistry* 270 (3): 1170-1178
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petráková, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonová, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M., Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall β (1 \rightarrow 6)-glucan interconnects mannoprotein, β (1 \rightarrow 3)-glucan, and chitin. *Journal of Biological Chemistry* 272 (28): 17762-17775
- Lange, M., Oliveira-Garcia, E., Deising, H. B., Peiter, E. (2014) A modular plasmid system for protein co-localization and bimolecular fluorescence complementation in filamentous fungi. *Current Genetics* 60 (4): 343-350
- Latgé, J. P., Calderone, R. (2005) The fungal cell wall, pp 73-104. *The Mycota. I. Growth, Differentiation and Sexuality*. Springer-Verlag, Berlin, Germany
- Latgé, J.-P. (2007) The cell wall: a carbohydrate amour for the fungal cell. *Molecular Microbiology* 66 (2): 279-290
- Latgé, J.-P. (2010) Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* 12 (7): 863-872
- Latgé, J. P., Beauvais, A. (2014) Functional duality of the cell wall. *Current Opinion in Microbiology* 20: 111-117
- 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
- Lesage, G., Bussey, H. (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (2): 317-343
- Leslie, J. F., Summerell, B. A. (2006) The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Arnes, Iowa, USA
- Lev, S., Sharon, A., Hadar, R., Ma, H., Horwitz, B. A. (1999) A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *PNAS* 96 (23): 13542-13547
- Ma, L. J., van der Does, H. C., Borkovich, K. A., Coleman, J. J., Daboussi, M. J., Di Pietro, A. *et al.* (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*. *Nature* 464 (7287): 367-373

- Magdwick, J. W., West, J. W., White, R. P., Semenov, M. A., Townsend, J. A., Turner, J. A., Fitt, B. D. L. (2011) Impacts of climate change on wheat anthesis and fusarium ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology* 130: 117-131
- Magnelli, P., Cipollo, J. F., Abeijon, C. (2002) A Refined Method for the Determination of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Composition and β -1,6-Glucan Fine Structure. *Analytical Biochemistry* 301 (1): 136-150
- Malz, S., Grell, M. N., Thrane, C., Maier, F. J., Rosager, P., Felk, A., Albertsen, K. S., Salomon, S., Bohn, L., Schäfer, W., Giese, H. (2005) Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of aurofusarin in the *Fusarium graminearum* species complex. *Fungal Genetics and Biology* 42 (5): 420-433
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudersanam, S. (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* Vol. 298: 1912-1934
- Manning, G. (2005) Genomic overview of protein kinases. *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*
- Martín-Udíroz, M., Madrid, M. P., Roncero, M. I. G. (2004) Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150 (10): 3175-3187
- Matsuo, T., Kubo, Y., Watanabe, Y., Yamamoto, M. (2003) *Schizosaccharomyces pombe* AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO Journal* 22 (12): 3073-3083
- Maurer, R. A. (1988) Isolation of the yeast protein kinase gene by screening with a mammalian protein kinase cDNA. *DNA* 7 (7): 469-474
- Mauro, C., Dietrich, S. M. C. (1981) Effect of culture conditions on the cell wall composition of *Mucor javanicus* Wehmer (Zygomycetes). *Rickia* 9: 107-111
- McMullen, M., Jones, R., Gallenberg, D. (1997) Scab of Wheat and Barley: A Re-emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348
- Medentsev, A. G., Kotik, A. N., Trufanova, V. A., Akimenko, V. K. (1992) Identification of aurofusarin in *Fusarium graminearum* isolates, causing a syndrome of worsening of egg quality in chickens. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* 29 (4): 542-546
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D. W., Rodriguez-Tudela J. L., Latgé, J. P. (2003) Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (chsG-/chsE-) of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genetics and Biology* 38 (1): 98-109
- Mey, G., Held, K., Scheffer, J., Tenberge, K. B., Tudzynski, P. (2002) CPMK2, an SLT2-homologous mitogen-activated protein (MAP) kinase, is essential for pathogenesis of *Claviceps purpurea* on rye: evidence for a second conserved pathogenesis-related MAP kinase cascade in phytopathogenic fungi. *Molecular Microbiology* 46 (2): 305-318

- Mio, T., Adachi-Shimizu, M., Tachibana, Y., Tabuchi, H., Inoue, S. B., Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Watanabe, T., Yamada-Okabe, H. (1997) Cloning of the *Candida albicans* homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *GSC1/FKS1* and Its Involvement in beta-1,3-Glucan Synthesis. *Journal of Bacteriology* 179 (13): 4096-4105
- Momany, M. (2002) Polarity in filamentous fungi: establishment, maintenance and new axes. *Current Opinion in Microbiology* 5 (6): 580-585
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P., Latgé, J. P. (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored Glucanoyltransferases Play an Active Role in the Biosynthesis of the Fungal Cell Wall. *Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 14882-14889
- Mouyna, I., Henry, C., Doering, T. L., Latgé, J. P. (2004) Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters* 237 (2): 317-324
- Mouyna, I., Hartl L., Latgé, J. P. (2013) β -1,3-glucan modifying enzymes in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in Microbiology* 4: 81
- Munro, C. A., Gow, N. A. R. (2001) Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Medical Mycology* 39 (1): 41-53
- Munro, C. A., Winter, K., Buchan, A., Henry, K., Becker, J. M., Brown, A. J., Bulawa, C. E., Gow, N. A. (2001) Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Molecular Microbiology* 39 (5): 1414-1426
- Murray, M. G., Thomposon, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8 (19): 4321-4325
- Nguyen, T. V., Schäfer, W., Bormann, J. (2012) The Stress-Activated Protein Kinase FgOS-2 is a Key Regulator in the Life Cycle of the Cereal Pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25 (9): 1142-1156
- Nguyen, T. V., Kröger, C., Bönninghausen, J., Schäfer, W., Bormann, J. (2013) The ATF/CREB Transcription Factor Atf1 Is Essential for Full Virulence, Deoxynivalenol Production, and Stress Tolerance in the Cereal Pathogen *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26 (12): 1378-1394
- Nishimura, M. T., Stein, M., Hou, B. H., Vogel, J. P., Edwards, H., Somerville, S. C. (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* 301 (5635): 969-972
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal* 14 (23): 5931

- Oliveira-Garcia, E., Deising, H. B. (2013) Infection Structure-Specific Expression of β -1,3-Glucan Synthase Is Essential for Pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and Evasion of β -Glucan-Triggered Immunity in Maize. *The Plant Cell* 25 (6): 2356-2378
- Oliveira-Garcia, E. (2013) Infection structure-specificity of β -1,3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of glucan-triggered immunity. Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Orlean, P. (2012) Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics* 192 (3): 775-818
- Paulitz, T. C. (1999) Fusarium head blight: a re-emerging disease. *Phytoprotection* 80: 127-133
- Parry, D. W., Jenkinson, P., McLeod, L. (1995) *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant Pathology* 44 (2): 207-238
- Pérez, P., Ribas, J. C. (2013) Fungal Cell Wall Analysis. *Current Methods in Fungal Biology* 12: 175-196
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30: e36-e36
- Pollard, T. D., Cooper, J. A. (2009) Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement. *Science* 326 (5957): 1208-1212
- Pritsch, C., Muehlbauer, G. J., Bushnell, W. R., Somers, D. A., Carroll, P. V. (2000) Fungal Development and Induction of Defense Response Genes During Early Infection of Wheat Spikes by *Fusarium graminearum*. *MPMI* Vol. 13 (2): 159-169
- Proctor, R. H., Hohn, T. M., McCormick, S. P. (1995) Reduced Virulence of *Gibberella zea* Caused by Disruption of a Trichthecine Toxin Biosynthetic Gene. *Molecular Plant Microbe Interactions* 8 (4): 593-601
- Pruyne, D., Bretscher, A. (2000) Polarization of cell growth in yeast. II. The role of the cortical actin cytoskeleton. *Journal of cell science*
- Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G. H., Heller, H. G. (2006) Biologie 7. Auflage. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E., Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1, 3-beta-glucan synthase. *Science* 272: 279-281
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S. (2008) Advances in understanding hyphal morphogenesis: Ontogeny, phylogeny and cellular localization of chitin synthases. *Fungal Biology Reviews* 22 (2): 56-70

- Riquelme, M., Yarden, O., Bartnicki-Garcia, S., Bowman, B., Castro-Longoria, E., Free, S. J., Fleißner, A., Freitag, M., Lew, R. R., Mourino-Pérez, R., Rasmussen, C., Richthammer, C., Roberson, R. W., Sanchez-Leon, E., Seiler, S., Plamann, M., Watters, . K. (2011) Architecture and development of the *Neurospora crassa* hypha – a model cell for polarized growth. *Fungal Biology* 115 (6): 446-474
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., Bezman, N., Thorner, J. (2002) Pkh1 and Pkh2 Differentially Phosphorylate and Activate Ypk1 and Ykr2 and Define Protein Kinase Modules Required for Maintenance of Cell Wall Integrity. *Molecular Biology of the Cell* 13 (9): 3005-3028
- Roelants, F. M., Torrance, P. D., Thorner, J. (2004) Differential roles of PDK1-and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* 150 (10): 3289-3304
- Roelants, F. M., Breslow, D. K., Muir, A., Weissman, J. S., Thorner, J. (2011) Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 und Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 108 (48): 19222-19227
- Rogg, L. E., Fortwendel, J. R., Juvvadi, P. R., Lilley, A., Steinbach, W. J. (2011) The chitin synthase genes *chsA* and *chsC* are not required for cell wall stress responses in the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 411 (3) 549-554
- Roncero, C., (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetic* 41: 367-378
- Sánchez-León, E., Verdín, J., Freitag, M., Roberson, R. W., Bartnicki-Garcia, S., Riquelme, M. (2011) Traffic of Chitin Synthase 1 (CHS-1) to the Spitzenkörper and Developing Septa in Hyphae of *Neurospora crassa*: Actin Dependence and Evidence of Distinct Microvesicle Populations. *Eukaryotic Cell* 10 (5): 683-695
- Sánchez-León, E., Riquelme, M. (2015) Live imaging of β -1,3-glucan synthase FKS-1 in *Neurospora crassa* hyphae. *Fungal Genetics and Biology* 82: 104-107
- Schäfer, K. (2009) Charakterisierung der Serin/ Threonin-Proteinkinase 1 (Fgpk1) in dem phytopathogenen Pilz *Fusarium graminearum*. Masterarbeit Universität Hamburg
- Schmidt, M. (2004) Survival and cytokinesis of *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chitin. *Microbiology* 150 (10): 3253-3260
- Schoffemeer, E. A. M., Klis, F. M., Sietsma, J. H., Cornelissen, B. J. C. (1999) The Cell Wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* 27 (2): 275-282
- Schroeder, H. W., Christensen, J. J. (1963) Factors affecting resistance of wheat to scab caused by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53 (7, 1): 831-838

- Seiler, S., Vogt, N., Ziv, C., Gorovits, R., Yarden, O. (2006) The STE20/germinal center kinase POD6 interacts with the NDR kinase COT1 and is involved in polar tip extension in *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the cell* 17 (9): 4080-4092
- Seong, K. Y., Zhao, X., Xu, J. R., Güldener, U., Kistler, H. C. (2008) Conidial germination in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 45 (4): 389-399
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2 (12): 905-909
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Durán, A., Cabib, E. (1991) The Function of Chitin Synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology* 114 (1): 111-123
- Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., Snyder, M. (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 18 (7): 4053-4069
- Smith, S. M. (2011) Strategies for the Purification of Membrane Proteins. Protein Chromatography: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* (681): 485-496
- Smits, G. J., Kapteyn, J. C., van den Ende, H., Klis, F. M. (1999) Cell wall dynamics in yeast. *Current Opinion in Microbiology* 2 (4): 348-352
- Sobko, A. (2006) Systems biology of AGC kinases in fungi. *Science Signaling* 352: re9-re9
- Sode B. (2015) Phosphorylierung als Regulator in der stressinduzierten Callosebiosynthese in *Arabidopsis thaliana* (L.). Dissertation Universität Hamburg
- Stone, B. A., Clarke, A. E. (1992) Chemistry and Biology of β -1,3-Glucans. *La Trobe Univ. Press*, Melbourne, Australia
- Stratford, M. (1994) Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell envelope. *Yeast* 10 (13): 1741-1752
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazán, L., Dou, X., Espeso, E. A., Peñalva, M. A., Osmani, S. A., Oakley, B. R. (2008) The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell* 19 (4): 1439-1449
- Tentler, S., Palas, J., Enderlin, C., Campbell, J., Taft, C., Miller, T. K., Wood, R. L., Selitrennikoff, C. P. (1997) Inhibition of *Neurospora crassa* Growth by a Glucan Synthase-1 Antisense Construct. *Current Microbiology* 34 (5): 303-308
- Thompson, J. R., Douglas, C. M., Li, W., Jue, C. K., Pramanik, B., Yuan, X., Rude, T. H., Toffaletti, D. L., Perfect, J. R., Kurtz, M. (1999) A Glucan Synthase FKS1 Homolog in *Cryptococcus neoformans* Is Single Copy and Encodes an Essential Function. *Journal of Bacteriology* 181 (2): 444-453

- Torralba, S., Raudaskoski, M., Pedregosa, A. M., Laborda, F. (1998) Effect of cytochalasin A on apical growth, actin cytoskeleton organization and enzyme secretion in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* 144 (1): 45-53
- Van de Linde, S., Sauer, M. (2010) BIOform 2/2010, S. 10-12, GIT VERLAG GmbH & Co. KG, Darmstadt
- Verma, D. P. S., Hong, Z. (2001) Plant callose synthase complexes. *Plant Molecular Biology* 47 (6): 693-701
- Virag, A., Griffiths, A. J. (2004) A mutation in the *Neurospora crassa* actin gene results in multiple defects in tip growth and branching. *Fungal Genetics and Biology* 41 (2): 213-225
- Vogel, J., Somerville, S. (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *PNAS*, 97 (4): 1897-1902
- Voigt, C. A., Schäfer, W., Salomon, S. (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant Journal* 42 (3): 364-375
- Voigt, C. A., Schäfer, W., Salomon, S. (2006) A comprehensive view on organ-specific callose synthesis in wheat (*Triticum aestivum* L.): glucan synthase-like gene expression, callose synthase activity, callose quantification and deposition. *Plant Physiology and Biochemistry* 44 (4): 242-247
- Wang, C., Zhang, S., Hou, R., Zhao, Z., Zheng, Q., Xu, Q., Zheng, D., Wang, G., Liu, H., Gao, X., Ma, J. W., Kistler, C., Kang, Z., Xu, J.-R. (2011) Functional Analysis of the Kinome of the Wheat Scab Fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens* 7 (12): e1002460
- Wendland, J., Philippsen, P. (2001) Cell polarity and hyphal morphogenesis are controlled by multiple rho-protein modules in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics* 157 (2): 601-610
- Wessels, J. G. H., Sietsma, J. H. (1981) Fungal cell walls: a survey. In *Plant Carbohydrates II* pp: 352-394, Springer Berlin Heidelberg
- Winston, F., Dollard, C., Ricupero-Hovasse, S. L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11: 53-55
- Xu, J. R. (2000) MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology* 31 (3): 137-152
- Zadoks, J. C., Chang, T. T., Konzak, C. F. (1974) A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed research* 14: 415-421
- Zhao, X., Mehrabi, R., Xu, J. R. (2007) Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell* 6 (10): 1701-1714

Ziv, C., Kra-Oz, G., Gorovits, R., März, S., Seiler, S., Yarden, O. (2009) Cell elongation and branching are regulated by differential phosphorylation states of the nuclear Dbf2-related kinase COT1 in *Neurospora crassa*. *Molecular Microbiology* 74 (4): 974-989

8. Anhang

8.1. Klonierungsstrategie und Nachweis der homologen Integration des Komplementationskonstrukts

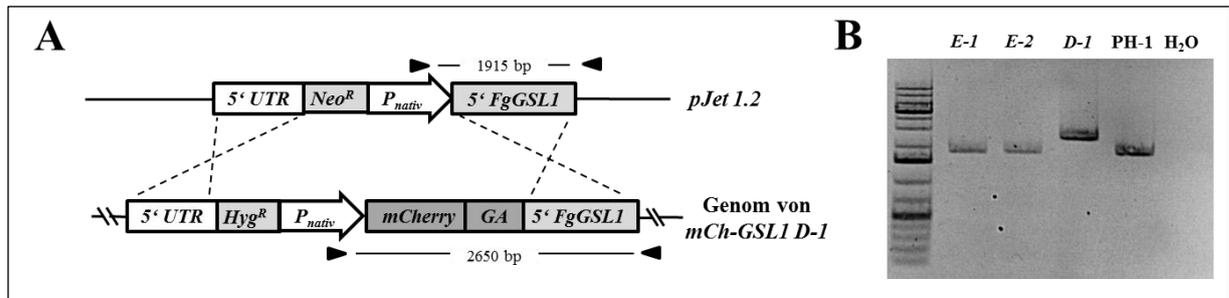


Abbildung 8-1: Generierung der *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1]* E-1 und E-2 Mutanten.

A Komplementation der *F. graminearum*-Mutante *mCh-GSL1 D-1*. Die Klonierung erfolgte im Plasmid *pJet1.2* in zwei Schritten über *MluI*- und *NotI*-Schnittstellen. Die Hygromycin-Resistenzkassette (*Hyg^R*) im Ausgangsgenom von *mCh-GSL1 D-1* wird durch eine Geneticin-Resistenz (*Neo^R*) ersetzt und dient zur Selektion erhaltener Transformanden.

B Bestätigung der Mutanten *FgGSL1[mCh-GSL1 D-1]* E-1 und E-2 mittels PCR. Die Primer N-GFP_Integr_fwd und N-GFP_integr_rev (siehe A, Pfeilspitzen) wurden angewandt. Die unterschiedlichen Größen der erhaltenen PCR-Fragmente (E-1/ E-2/ PH-1: 1915 bp, *mCh-GSL1 D-1*: 2650 bp) beweisen die Integration des Komplementationskonstrukts in den gewünschten Genlocus.

8.2. Monosaccharid-Bestimmung zur Zellwandanalyse von *GSL1*-Mutanten

Tabelle 8-1: Berechnete Werte aus der Monosaccharid-Bestimmung mittels HPAEC-PAD. Jede Zeile stellt eine Versuchsdurchführung mit 2 technischen Wiederholungen dar (Werte gemittelt). Je *F. graminearum*-Stamm wurden mindestens zwei biologische Replikate analysiert. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Mutanten je *FgGSL1*-Fusionskonstrukt wurden gemittelt und sind in dem Balkendiagramm (Abb. 3-9) wiederzufinden.

<i>F. graminearum</i> Stamm	Monosaccharide in Mol %			
	Glucosamin	Galaktose	Glukose	Mannose
PH-1	43,50	3,40	37,20	16,00
	44,90	3,60	37,40	14,10
	44,90	3,20	38,70	13,50
	43,50	3,90	39,50	13,20
	43,30	3,80	37,80	15,00
Mittelwerte	44,02	3,58	38,10	14,36

<i>GSLI-GFP A-1</i>	49,10	4,00	31,00	15,60
	49,20	4,30	31,40	15,10
	50,90	4,00	30,20	14,90
Mittelwerte	49,73	4,10	30,87	15,30
<i>GSLI-GFP B-1</i>	61,20	5,30	19,00	14,60
	60,70	5,70	19,10	14,50
Mittelwerte	60,95	5,50	19,05	14,55
<i>GSLI-GFP B-2</i>	64,60	5,40	16,00	14,00
	64,70	5,20	16,00	14,10
	63,60	4,90	15,80	15,50
Mittelwerte	64,30	5,17	15,93	14,53
<i>GFP-GSLI C-1</i>	51,90	3,30	31,10	13,70
	52,80	3,40	31,00	12,80
	56,60	3,80	25,10	14,50
	56,90	3,70	25,00	14,50
Mittelwerte	54,55	3,55	28,05	13,88
<i>GFP-GSLI C-2</i>	57,00	4,70	26,60	11,70
	57,80	4,40	26,00	11,80
	56,30	4,80	24,00	14,90
	55,60	5,00	24,00	15,50
Mittelwerte	56,68	4,73	25,15	13,48
<i>mCh-GSLI D-1</i>	48,90	5,0	29,70	16,40
	49,90	4,30	29,40	16,40
Mittelwerte	49,40	4,65	29,55	16,40
<i>mCh-GSLI D-2</i>	58,00	4,10	23,10	14,80
	54,20	4,20	25,60	16,00
Mittelwerte	56,10	4,15	24,35	15,40
<i>FgGSLI [mCh-GSLI D-1] E-1</i>	54,40	4,00	26,60	14,90
	55,10	3,90	26,20	14,80
Mittelwerte	54,75	3,95	26,40	14,85
<i>FgGSLI [mCh-GSLI D-1] E-2</i>	54,50	3,90	27,30	14,30
	54,40	4,10	27,50	14,10
Mittelwerte	54,45	4,00	17,40	14,20

8.3. Mikroskopische Analyse von $\Delta pk1$ -Kolonie auf SNA-Minimalmedium

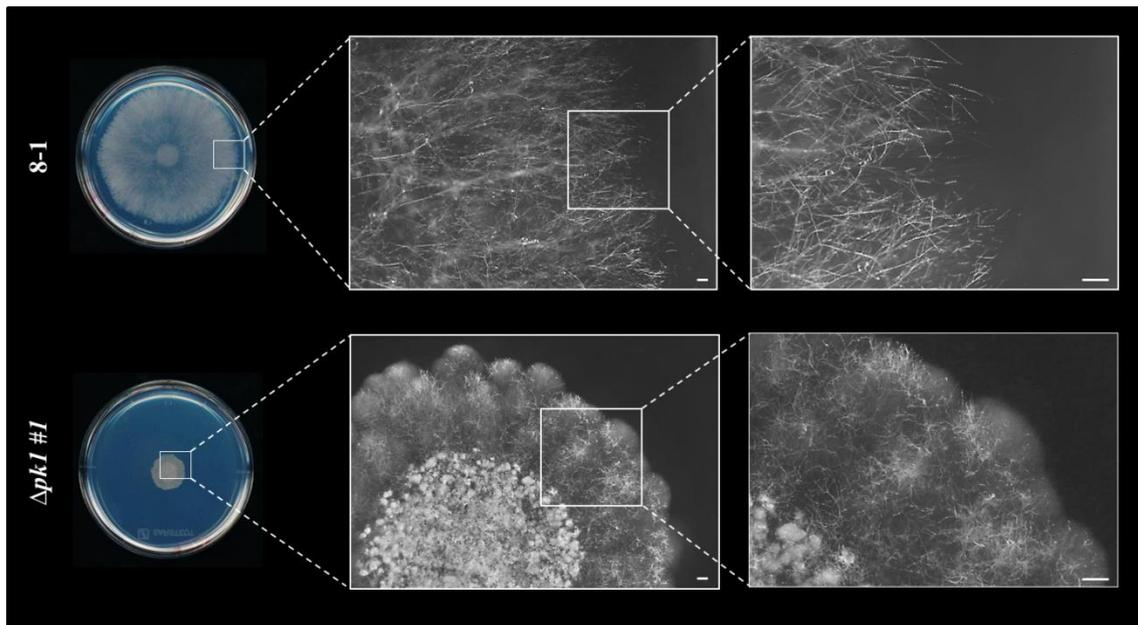


Abbildung 8-2: Mikroskopische Analyse des Hyphenwachstums von $\Delta pk1$ auf SNA-Festmedium.

Dargestellt ist das Hyphenwachstum von $\Delta pk1$ #1 und dem Wildtyp 8-1. Die Aufnahmen wurden mit einer Stereoleupe angefertigt. Größenmaßstab: 500 μm .

8.4. *FgGSL1*-Expressionsanalyse

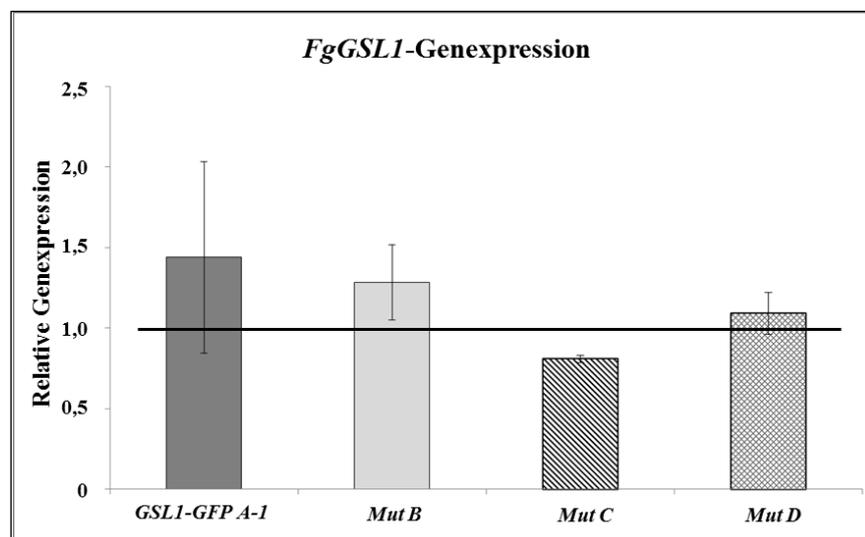


Abbildung 8-3: Expressionsniveau der (1,3)- β -Glucansynthase in den *GSL1*-Mutanten.

Aus Pilzmyzel der *GSL1*-Mutanten *GSL1-GFP A-1*, *B-1* und *B-2*, *GFP-GSL1 C-1* und *C-1* sowie *mCh-GSL1 D-1* und *D-2* wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Letztere wurde in der qPCR zur Messung der *FgGSL1*-Expression eingesetzt. Zum Vergleich diente der Wildtyp PH-1 (Expressionsniveau auf 1,0 gesetzt, schwarze Linie). Werte von zwei unabhängigen Transformanten eines Fusionskonstrukts wurden gemittelt und zusammenfassend als *Mut B*, *Mut C* und *Mut D* dargestellt. Es wurden drei Messungen mit jeweils zwei technischen Replikaten durchgeführt. Fehlerbalken: Standardabweichungen.

8.5. Protoplastierung der *F. graminearum*-Mutante *GSLI-GFP A-1* im Vergleich zum Wildtyp PH-1

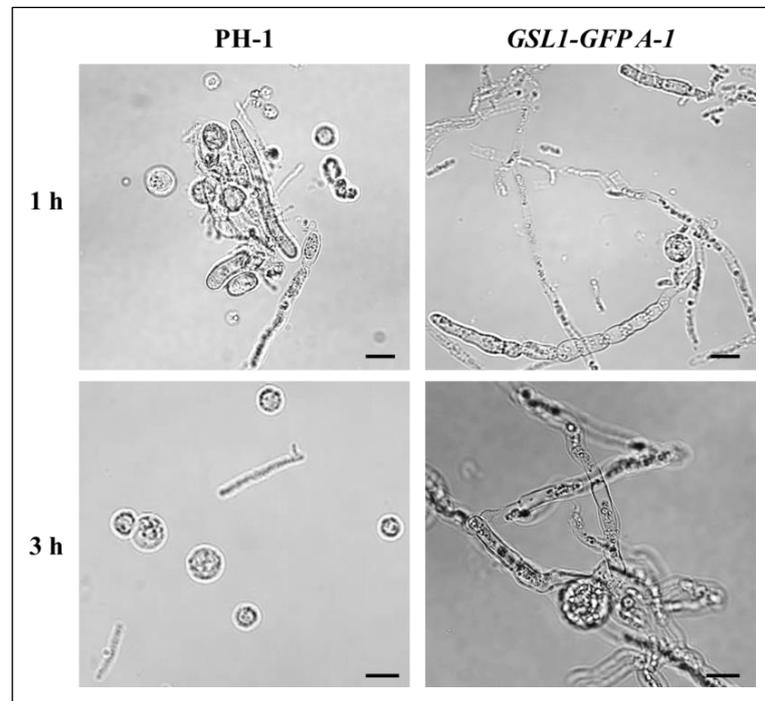


Abbildung 8-4: Mikroskopische Dokumentation zur Protoplastierung von *F. graminearum*-Myzel.

Konidien des Wildtyps PH-1 und der Mutante *GSLI-GFP A-1* wurden für 20 Stunden in Vollmedium angezogen und anschließend für 3 Stunden in einem Enzym-Mix (Driselase[®] und zellwandabbauende Enzyme) inkubiert. Nach einer und drei Stunden wurde eine Probe entnommen und der Fortschritt der Protoplastierung mikroskopisch analysiert. Maßstab: 10 µm.

8.6. Anordnung und Verteilung von Aktinfilamenten in der Hyphe des Wildtyps 8-1 sowie der Deletionsmutante $\Delta pk1$

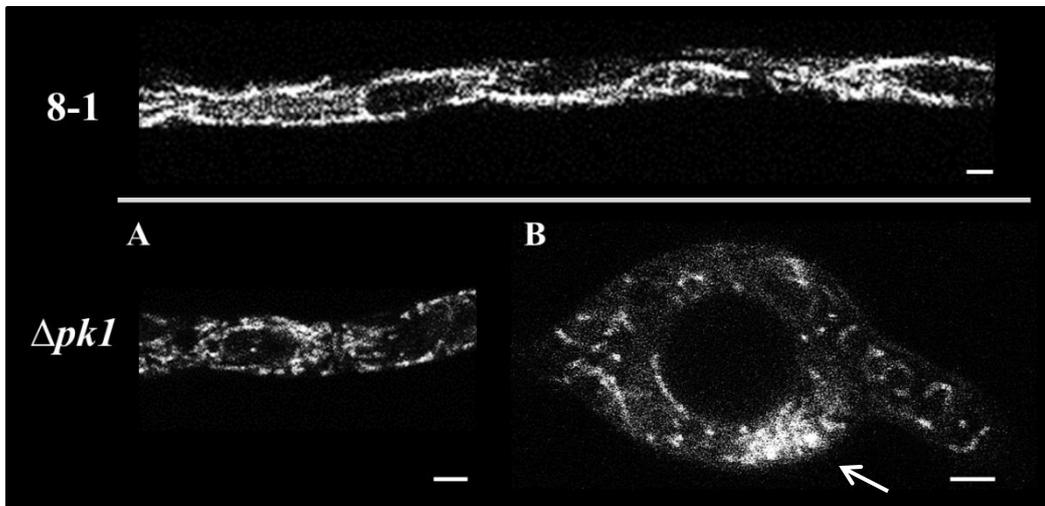


Abbildung 8-5: Verteilung und Anordnung von Aktinfilamenten in den Hyphen von 8-1 und $\Delta pk1$.

Die Aktinfilamente im Myzel des Wildtyps 8-1 (oben) und der Deletionsmutante (A: $\Delta pk1$ -Hyphe und B: $\Delta pk1$ -Blase) wurden mit Phalloidin-Alexa Fluor[®] 594 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) angefärbt und anschließend mikroskopisch dokumentiert (weiße Bildpunkte). Ein vermeintlich sichtbarer Spitzenkörper (B, Pfeil) ist im unteren Bereich der Blase lokalisiert. Maßstab: 2 μm .

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die zur erfolgreichen Anfertigung dieser Dissertation beigetragen haben.

Ein besonderer Dank galt meinem Betreuer Herrn Dr. Christian Voigt, der mir die Möglichkeit gab mein Forschungsprojekt und draus resultierende Promotion in seiner Arbeitsgruppe durchführen und anfertigen zu können. Zudem möchte ich mich für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge, die meist zu vielen neuen Denkansätzen und Ideen führten, bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Übernahme des Erstgutachters sowie bei Prof. Dr. Stefan Hoth für die Übernahme des Zweitgutachters bedanken.

Ich danke allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Molekulare Phytopathologie“ für die zahlreichen Unterstützungen im Labor, hilfreichen Ratschläge, aufmunternden Worte, spannenden Meetings, schlaflosen Nächten in Pevestorf, ausgelassenen Grillabende auf unserer Sonnenterrasse, süffigen Feierabendgespräche, zauberhaften Weihnachtsfeiern und vielem mehr.

Ein ganz besonderer Dank galt „meiner TA“ Barbara, ohne deren Unterstützung diese Vielzahl an hervorragenden Ergebnissen nie erreicht worden wäre. Des Weiteren bedanke ich mich sehr herzlich bei meinen ehemaligen „Leidensgenossen“ der PhyBi-Gruppe Marcel, Björn und Chris für die Einarbeitung in diverse Techniken und Geräte zu Beginn meiner Promotion sowie für jegliche Ratschläge. Durch eure Erfahrungen im Laboralltag konnte ich mir viele Fehlritte ersparen. Ein großes Dankschön galt zudem allen meinen TA-Schülern und Bachelor- sowie Masterstudenten.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung bedanken, die mir in schwierigen Zeiten Kraft und Durchhaltevermögen gaben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den 08.08.16

Annemarie Glöckner