

**Charakterisierung des Chrysovirus
FgV-ch9 aus *Fusarium graminearum*:
Sequenzen, Synthese und Funktion
der viralen Proteine**

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

vorgelegt von

Christine Blum

geb. 16.10.1987 in Hamburg

Hamburg, August 2017

Vorsitzende der Prüfungskommission: Prof. Dr. Sigrun Reumann

1. Gutachter: PD Dr. Cornelia Heinze

2. Gutachter: Prof. Dr. Wilhelm Schäfer

Datum der Disputation: 13. Oktober 2017

*Research is formalized curiosity.
It is poking and prying with a purpose.*

- Zora Neale Hurston -

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 <i>Fusarium graminearum</i>	1
1.2 Mykoviren und Hypovirulenz.....	3
1.3 Das Chrysovirus <i>Fusarium graminearum</i> Virus China 9	6
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Organismen.....	10
2.1.1.1 Bakterien.....	10
2.1.1.2 Pilze.....	10
2.1.1.3 Pflanzen.....	10
2.1.2 Synthetische Oligonukleotide (Primer).....	11
2.1.3 Plasmide	14
2.1.4 Antiseren.....	15
2.1.5 Medien.....	16
2.1.6 Chemikalien	18
2.2 Methoden	20
2.2.1 Anzucht von <i>Fusarium graminearum</i> und FgV-ch9.....	20
2.2.1.1 Anzucht von Myzel auf Festmedium	20
2.2.1.2 Anzucht von Myzel in Flüssigmedium.....	20
2.2.1.3 Anzucht von Konidien in Flüssigmedium	20
2.2.1.4 Infektion von <i>Fusarium graminearum</i> mit dem Virus FgV-ch9.....	20
2.2.1.5 Extraktion von Viruspartikeln	21
2.2.1.6 Extraktion von Polysomen	22
2.2.2 Vektorerstellung und Transformationsverfahren	23
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	23
2.2.2.2 Restriktionsverdau von DNA.....	24
2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	24

2.2.2.4	Modifikationen von Nukleinsäurefragmenten	25
2.2.2.5	Reinigung von Nukleinsäurefragmenten	25
2.2.2.6	Fällung von Nukleinsäurefragmenten	25
2.2.2.7	Einbau von DNA-Fragmenten in einen Vektor (Ligation)	26
2.2.2.8	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	26
2.2.2.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA	27
2.2.2.10	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.2.11	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	28
2.2.2.12	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.2.13	Protoplasten-Transformation von <i>Fusarium graminearum</i>	30
2.2.3	Molekulare Analyse der Transformanden	32
2.2.3.1	Expression und Extraktion von Proteinen	32
2.2.3.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.2.3.3	Western Blot	35
2.2.3.4	Proteasetest	36
2.2.3.5	RNA-Extraktion aus Myzel	37
2.2.3.6	Herstellung und Kontrolle von cDNA	38
2.2.3.7	Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	39
2.2.3.8	DNA-Extraktion mittels CTAB	39
2.2.3.9	Southern Blot	40
2.2.4	Phänotypische Analyse der Transformanden	42
2.2.4.1	Wachstumstest auf Festmedium	42
2.2.4.2	Infektionsstudien auf Weizenähren	43
2.2.4.3	DON-Quantifizierung mittels ELISA	43
2.2.4.4	Analyse von Infektionskissen auf Weizenspelzen	44
2.2.4.5	Auskeimungstest und Vereinzeln von Konidien	44
2.2.4.6	Anzucht von Perithezien auf Weizennodien	45
2.2.5	Analyse von möglicher <i>gene silencing</i> Suppressor Aktivität	45
2.2.5.1	Aktivierung und Infiltration transformierter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	45
2.2.5.2	Detektion und Dokumentation von Chemolumineszenz und Fluoreszenz sowie optische Analyse ihrer Intensität	46
2.2.5.3	Fluoreszenzbestimmung mittels Plate Reader	46

2.2.5.4	Statistische Auswertung von Datensätzen	46
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Charakterisierung der viralen Segmente und Proteine von FgV-ch9.....	48
3.1.1	Betrachtung der Prozessierung aller fünf Proteine von FgV-ch9 über einen Zeitraum von 20 Tagen	48
3.1.2	Nachweis von Duplikationen durch Re-Sequenzierung in drei der fünf Segmente von FgV-ch9 und Vergleich mit den Sequenzen der fünf Segmente von FgV2	52
3.2	Klonierungs- und Transformationsstrategien.....	58
3.2.1	Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Expression in <i>Escherichia coli</i>	58
3.2.1.1	Integration von ORF P1 in <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren.....	58
3.2.1.2	Integration von ORF P2 in <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren.....	58
3.2.1.3	Integration von ORF P3 in <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren.....	60
3.2.1.4	Integration von ORF P4 in <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren.....	61
3.2.1.5	Integration von ORF P5 in <i>E. coli</i> -Expressionsvektoren.....	63
3.2.1.6	Integration von eGFP in <i>pET-[P3]</i> und <i>pET-[P4]</i>	64
3.2.2	Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
3.2.3	Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Expression in <i>Fusarium graminearum</i>	66
3.2.4	Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Analyse des <i>gene silencing</i> Suppressors P5 aus FgV-ch9	67
3.2.4.1	Erstellung und Transformation von Konstrukten in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> zur Anwendung in einem <i>Transient Expression Assay</i>	67
3.2.4.2	Erstellung und Transformation von Konstrukten in <i>Fusarium graminearum</i> zur Anwendung in einem Fluoreszenz-Assay	68
3.3	Analyse der Integration, Transkription und Translation der ORFs von FgV-ch9 in den Transformanden von <i>Escherichia coli</i>, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Fusarium graminearum</i>.....	71
3.3.1	Nachweis der Integration und Transkription der ORFs aus FgV-ch9 in <i>Fusarium graminearum</i>	71
3.3.2	Analyse der Expression der Proteine P1 bis P5 von FgV-ch9 in <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Fusarium graminearum</i>	76
3.3.2.1	Expression von Protein P1 in <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77

3.3.2.2	Expression von Protein P2 in <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Fusarium graminearum</i>	78
3.3.2.3	Expression von Protein P3 in <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Fusarium graminearum</i>	79
3.3.2.4	Expression von Protein P4 in <i>Escherichia coli</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Fusarium graminearum</i>	83
3.3.2.5	Expression von Protein P5 in <i>Escherichia coli</i> und <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	86
3.4	Untersuchung der viralen Proteine P1 bis P5, exprimiert in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>, auf Protease-Aktivität.....	87
3.5	Charakterisierung der Transformanden zur Expression der fünf ORFs von FgV-ch9 in <i>Fusarium graminearum</i>.....	88
3.5.1	Wachstumstests auf CM-Medium unter Normal- und unter Stressbedingungen.....	88
3.5.1.1	Vergleich des Wachstums der virusinfizierten <i>Fusarium graminearum</i> -Stämme FgCh9 und FgPH1 unter Normal- und Stressbedingungen.....	88
3.5.1.2	Wachstumstest der P1-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ).....	90
3.5.1.3	Wachstumstest der P2-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ).....	91
3.5.1.4	Wachstumstest der P3-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ).....	93
3.5.1.5	Wachstumstest der P4-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ).....	95
3.5.1.6	Wachstumstest der P5-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ).....	97
3.5.2	Einfluss der viralen Proteine von FgV-ch9 in <i>Fusarium graminearum</i> auf die Infektiosität auf Weizen	99
3.5.3	Untersuchung der reduzierten Infektiosität bei P3-exprimierenden Mutanten und dem virusinfizierten Wildtyp FgPH1 VI.....	101
3.5.3.1	Untersuchung der Ausbreitung des Myzels innerhalb von Weizenähren	101
3.5.3.2	Einfluss der Expression von viralen Proteinen in FgPH1 auf die Bildung von Infektionskissen	102
3.5.3.3	Konzentration von Deoxynivalenol (DON) in infizierten Ährchen.....	103
3.5.3.4	Einfluss der Virusinfektion in FgPH1 auf die Transkription der Lipase FGL1 in infizierten Ährchen	104
3.5.4	Konidienbildung und -keimungsfähigkeit bei Expression von viralen Proteinen.....	105

3.5.5	Perithezienformation bei Expression von viralen Proteinen	106
3.6	Nachweis der <i>gene silencing</i> Suppressor-Funktion von P5	110
3.6.1	Überprüfung der <i>gene silencing</i> Suppressor-Funktion von P1-P5 mit einem <i>Transient Expression Assay</i>	110
3.6.2	Überprüfung der <i>gene silencing</i> Suppressor-Funktion von P5 in <i>Fusarium graminearum</i> mit einem Fluoreszenz Assay	112
4	Diskussion.....	115
4.1	Duplikationen an den 3'-Termini der Segmente 2, 3 und 5 von FgV-ch9	115
4.2	Protein P1 ist eine RdRp und hat Einfluss auf die Konidienbildung	119
4.3	Protein P2 ist Teil des Partikels und möglicherweise im Inneren lokalisiert	121
4.4	Protein P3 ist ein Hüllprotein und der Hauptfaktor bei der Induktion von Hypovirulenz	125
4.5	Protein P4 ist ein Nichtstrukturprotein und involviert in die frühzeitige Reife von Perithezien	132
4.6	Protein P5 ist ein Nichtstrukturprotein und besitzt <i>gene silencing</i> Suppressor-Funktion	136
4.7	Fazit.....	141
5	Zusammenfassung	143
6	Summary.....	145
7	Literatur.....	147
8	Anhang.....	165
	Danksagung.....	IX
	Eidesstattliche Versicherung.....	X

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Infektion mit <i>Fusarium graminearum</i>	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Replikation von dsRNA-Viren	5
Abbildung 3: Das Chrysovirus <i>Fusarium graminearum</i> Virus China 9 (FgV-ch9).....	7
Abbildung 4: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF, mit dem Antiserum <i>AK-P2N</i> detektiert.....	49
Abbildung 5: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF, mit dem Antiserum <i>AK-P3N</i> detektiert.....	50
Abbildung 6: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF, mit dem Antiserum <i>AK-P4N</i> detektiert.....	51
Abbildung 7: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF, mit dem Antiserum <i>AK-P5N</i> detektiert.....	52
Abbildung 8: RT-PCR zur Verifizierung der Duplikationen an den 3'-Termini der Segmente 2 und 3.....	54
Abbildung 9: Verifizierung der Abwesenheit von Sequenzen ohne Duplikation mittels RT-PCR.....	55
Abbildung 10: Alignment der Aminosäure-Sequenzen des von P5 mit Duplikation und ohne Duplikation.	56
Abbildung 11: Darstellung und Vergleich der Duplikationen an den 3'-Termini von Segment 2, 3 und 5 von FgV-ch9 und FgV2.....	57
Abbildung 12: Duplizierte Sequenz in Segment 3 von <i>Magnaporthe oryzae</i> virus 1	57
Abbildung 13: PCR zum Nachweis des Konstrukts der ORFs von FgV-ch9 in <i>F. graminearum</i>	72
Abbildung 14: Southern Blot zum Nachweis der Integration der Expressionskonstrukte für die ORFs von FgV-ch9 in den <i>Fusarium</i> -Stamm FgPH1 bzw. 8/1	74
Abbildung 15: PCR zum Nachweis der Transkription der ORFs von FgV-ch9 in die <i>Fusarium</i> -Transformanden	75
Abbildung 16: Expression von P1 in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i> sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem <i>F. graminearum</i>	77
Abbildung 17: Expression von P2 in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i>	78
Abbildung 18: Expression von P2 in <i>F. graminearum</i> sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem <i>F. graminearum</i>	79
Abbildung 19: Expression von P3 in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i> sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem <i>F. graminearum</i>	80
Abbildung 20: Expression von P3 in <i>F. graminearum</i> sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem <i>F. graminearum</i>	81
Abbildung 21: Expression von P3eGFP-C in <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> und <i>F. graminearum</i>	82
Abbildung 22: Expression von P4 in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i> sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem <i>F. graminearum</i>	83
Abbildung 23: Expression von P4eGFP-N in <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> und <i>F. graminearum</i>	85

Abbildung 24: Expression von P5 in <i>S. cerevisiae</i> und <i>E. coli</i> sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem <i>F. graminearum</i>	86
Abbildung 25: Proteaseaktivität in Gesamtextrakten der <i>E. coli</i> - und <i>S. cerevisiae</i> -Mutanten, die eines der Proteine von FgV-ch9 (P1-P5) exprimieren	87
Abbildung 26: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Stämme Ch9 (HT und LT) und FgPH1-GFP (VI und VF) unter Stressbedingungen	89
Abbildung 27: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Transformanden FgPH1-AlcA-P1.6 und FgPH1-AlcA-P1.10 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen	91
Abbildung 28: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Transformanden FgPH1-AlcA-P2.8 und FgPH1-AlcA-P2.9 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen	92
Abbildung 29: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Transformanden FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen	94
Abbildung 30: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Transformande Fg8/1- Δ GluA-P3.5 im Vergleich zum Kontrollstamm Fg8/1 VFI unter Stressbedingungen	95
Abbildung 31: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Transformanden FgPH1-AlcA-P4.2 und FgPH1-AlcA-P4.9 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen	96
Abbildung 32: Wachstumstest der <i>F. graminearum</i> -Transformanden FgPH1- Δ GluA-P5.2 und FgPH1- Δ GluA-P5.6 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen.....	98
Abbildung 33: Statistische Analyse der Infektionsstärke von Fusarium-Mutanten, die die ORFs 1-5 von FgV-ch9 exprimieren.....	99
Abbildung 34: Schadbilder von Weizenähren nach Infektion mit P3-exprimierenden <i>F. graminearum</i> -Mutanten.....	100
Abbildung 35: Längsschnitte von mit P3-Expressionsstämmen von <i>F. graminearum</i> und Vergleichsstämmen inokulierten Ährchen nach 10 dpi	101
Abbildung 36: Infektionskissen von Fusarium-Mutanten, die P3 von FgV-ch9 exprimieren, sowie FgPH1 VF und FgPH1 VI	102
Abbildung 37: Analyse der relativen DON-Konzentration im Myzel von FgPH1-AlcA-P3.11, FgPH1-AlcA-P3.27 und FgPH1 VI	103
Abbildung 38: Analyse der relativen Transkription von FGL1 im Myzel der Fusariumstämmen FgPH1 VF, FgPH1 VI, FgCh9 LT und FgCh9 HT	104
Abbildung 39: Statistische Analyse der relativen Konidienmenge von Fusarium-Mutanten	105
Abbildung 40: Statistische Auswertung der relativen Keimungsrate von Konidien	106
Abbildung 41: Perithezien von Fusarium-Mutanten, die die fünf ORFs von FgV-ch9 exprimieren, auf Weizenknospen.....	107
Abbildung 42: Grafische Darstellung der Zeitintervalle des ersten Auftretens von Perithezien nach Inokulation mit Konidien der Fusarium-Mutanten, die die fünf ORFs von FgV-ch9 exprimieren.	108
Abbildung 43: Untersuchung zum Virustiter in aus Ascosporen ausgekeimtem Myzel.....	111

Abbildung 45: Relative Änderung der Fluoreszenz in den mit *A. tumefaciens* infiltrierten Bereichen der Blätter von *N. benthamiana* Linie 16c zum Nachweis von *gene silencing* Suppression, 6 nach der Infiltration..... 112

Abbildung 46: Detektion von GFP in Kolonien von *Fusarium graminearum* Mutanten auf CM-Festmedium zum Nachweis der *gene silencing suppressor* Aktivität von P5 113

Abbildung 47: Statistische Auswertung der relativen Fluoreszenz von GFP, exprimiert im Mycel der *Fusarium graminearum* Mutanten PH1-GFP, PH1-SilentGFP, PH1-SilentGFP-bPAC und PH1-SilentGFP-P5 114

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Synthetische Oligonukleotide, verwendet für die Resequenzierung der kodierenden und nicht kodierenden Bereiche der dsRNAs 2, 3 und 5 von FgV-ch9	11
Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide, verwendet für die Vektorkonstruktion	11
Tabelle 3: Synthetische Oligonukleotide, verwendet in der qPCR.....	13
Tabelle 4: Synthetische Oligonukleotide zum Nachweis der Integration ins Genom und der Transkription bei <i>Fusarium</i> -Transformanden	13
Tabelle 5: Synthetische Oligonukleotide zur Erstellung von Sonden für den Southern Blot.....	14
Tabelle 6: Aufstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, ihre Funktion und ihre Quelle.....	14
Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten Peptidantiseren, der Aminosäuresequenz der Peptide und ihrer Position im Virusprotein.....	16
Tabelle 8: Zusammenfassung der Primer, die für die Sequenzierung und Verifizierung der Sequenzen sowie dem Ausschluss von unterschiedlichen Größen eines Segments, verwendet wurden.	53
Tabelle 9: Zusammenfassung der zur Erstellung von <i>S. cerevisiae</i> -Expressionsklonen verwendeten Inserts	66
Tabelle 10: Zusammenfassung der zur Erstellung von <i>F. graminearum</i> -Expressionsklonen benötigten Inserts	67
Tabelle 11: Zusammenfassung der zur Erstellung von <i>A. tumefaciens</i> -Infiltrationsklonen benötigten Inserts	68

Abkürzungsverzeichnis

AbV-1	Avian bornavirus Genotyp 1
AIX	Ampicillin, IPTG und X-Gal
Amp	Ampicillin
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
CHV1	Cryphonectria hypovirus 1
CM	Komplett-Medium
CTP	Cytosintriphosphat
cv.	Kultivar
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DI	defective interfering
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DND	DMSO und DTT
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DON	Deoxynivalenol
dpi	days past infection
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	und andere (et alii)
FGHV2	Fusarium graminearum hypovirus 2
FgV1	Fusarium graminearum virus 1
FgV2	Fusarium graminearum virus 2
FgV-ch9	Fusarium graminearum virus-china 9
FHB	Fusarium head blight
FSME	Frühsommer-Encephalitis
Gen	Gentamycin und Geneticin
GTP	Guanintriphosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histidin
HT	high titer
Hyg	Hygromycin
IBDV	Infectious bursal disease virus
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kana	Kanamycin
LAS	Luminescent Image Analyzer
LB	lysogenic broth

LT	low titer
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MoCV-1	Magnaporthe oryzae chrysovirus 1
mRNA	messenger RNA
NAT	Nourseothricin
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
qPCR	quantitative PCR
RdRP	RNA-abhängige RNA Polymerase
Rif	Rifampicillin
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RnMyRV3	Rosellinia necatrix mycoreovirus 3
RnQV1	Rosellinia necatrix quadrvirus 1
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur (25 °C)
SD	synthetic defined
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
siRNA	short interfering RNA
SOB	Super Optimal Broth
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
Spec	Spectinomycin
S-PTGS	sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFB	transmit frame buffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethyl
TTP	Thymintriphosphat
ün	über Nacht
Ura	Uracil
UTP	Uraziltriphosphat
UTR	untranslated region
VF	virusfrei
VI	virusinfiziert
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranoside
YPG	yeast extract-peptone-glycerol

1 Einleitung

1.1 *Fusarium graminearum*

Der phytopathogene Pilz *Fusarium graminearum* Schwabe (Teleomorph: *Gibberella zeae* [Schwein.] Petch) gehört zu den filamentösen Ascomyzeten und ist der Hauptauslöser der Ährenbleiche (*Fusarium head blight, FHB*) bei Weizen und Gerste (Abbildung 1A) und der Kolbenfäule (*ear rot*) bei Mais (Goswami & Kistler, 2004).

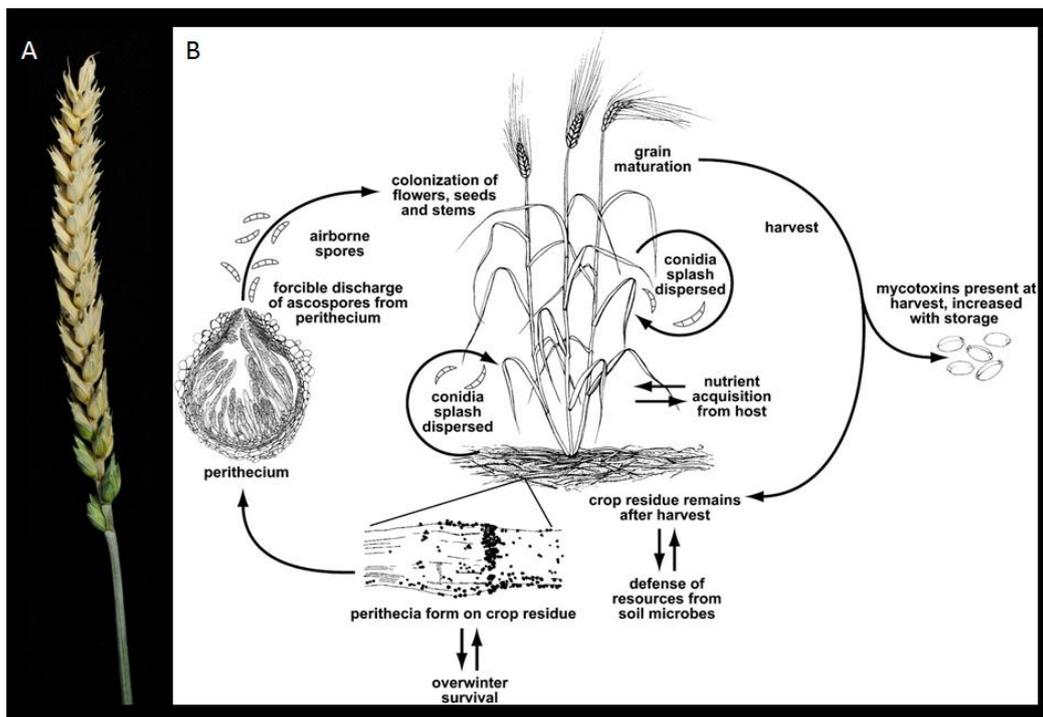


Abbildung 1: Infektion mit *Fusarium graminearum*

A: Weizenähre (*Triticum aestivum* cv. Nandu) mit typischen Symptomen von *Fusarium head blight*

B: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *F. graminearum*. Die sexuell gebildeten Ascosporen werden bei feuchtwarmer Witterung aus den Perithezien geschleudert und infizieren den Wirt während der Blüte. Auf befallenen Pflanzen werden asexuelle Sporen (Konidien) gebildet, die eine Sekundärinfektion auslösen. Der Pilz überwintert in Ernterückständen am Boden, auf denen im Frühjahr erneut Perithezien gebildet werden. Abbildung entnommen aus Trail (2009).

Zu Beginn eines neuen Lebenszyklus (Abbildung 1B) von *Fusarium graminearum* bilden sich bei feuchtwarmer Witterung im Frühjahr auf am Boden befindlichen Ernteresten Perithezien (Fruchtkörper), die sexuell gebildete Ascosporen freisetzen (Trail *et al.*, 2002). Diese werden durch Wind, Regen und Insekten auf die Wirtspflanzen gebracht (Sutton, 1982). Die Infektion erfolgt in erster Linie über blühende Ährchen (Markell & Francl, 2003) und breitet sich über die Leitbündel in Rachis und Rachilla aus (Ribichich *et al.*, 2000). Auf den infizierten Ähren werden dann asexuell Sporen gebildet, die Konidien, welche weitere Pflanzen infizieren können. Sie sind für die Verbreitung aber

von untergeordneter Bedeutung (Paulitz, 1999). Der Pilz überwintert als saprophytisches Myzel in Ernterückständen (Gilbert & Fernando, 2004).

Die Infektion von Pflanzengewebe mit *F. graminearum* erfolgt in drei Phasen. In der ersten Phase der Infektion von Blütenorganen keimen die Sporen (Ascosporen oder Konidien) aus und sogenannte Laufhyphen aus wenig verzweigtem Myzel breiten sich über die Oberfläche aus (Huang *et al.*, 2008; Boenisch & Schäfer, 2011). Zu diesem Zeitpunkt findet noch keine Penetration statt und Krankheitssymptome sind nicht nachzuweisen (Kang & Buchenauer, 2000).

In der zweiten Phase verzweigen und differenzieren sich die Laufhyphen, sodass sich drei unterschiedlich komplexe Infektionsstrukturen bilden. Zunächst entstehen die strukturell simplen Fuß-Strukturen, die aus kurzen Seitenhyphen mit füßchenartigen Verdickungen an der Spitze bestehen. Diese Seitenhyphen können sich durch Verzweigung und Aggregation auch zu komplexeren Infektionsstrukturen entwickeln. Dazu gehören die gelappten Appressorien, die aus einer kleineren Ansammlung von Hyphen bestehen, und Infektionskissen, die sich aus einer größeren Menge ineinander verschlungener Hyphen bilden. Diese Infektionsstrukturen dienen der Penetration der Gewebeoberfläche, sodass der Pilz in die unteren Zellschichten vordringen kann (Emmett & Parbery, 1975; Huang *et al.*, 2008; Boenisch & Schäfer, 2011). In den Infektionsstrukturen wird vermehrt das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) gebildet, welches für die Infektion unerlässlich ist (Proctor *et al.*, 1995; Maier *et al.*, 2006; Boenisch & Schäfer, 2011). Es gehört zu den Trichothecenen und wirkt als Protein-Synthese-Inhibitor (Snijders, 1990).

In der dritten Phase ist der Pilz sowohl intra- als auch interzellulär in das Gewebe der Pflanze eingedrungen und breitet sich in diesem aus. Deutliche Symptome wie Nekrosen sind zu erkennen. Auf der Oberfläche bildet *F. graminearum* Lufthyphen und Sporodochien aus (Boenisch & Schäfer, 2011).

Bei Befall von Nutzpflanzen mit *F. graminearum* kann es in kürzester Zeit zu erheblichen Ernteaufschlägen und stark verminderter Kornqualität kommen (McMullen *et al.*, 1997), was zu schweren ökonomischen Verlusten führt. Darüber hinaus sind infizierte Ähren in hohem Maße mit hitzestabilen Mykotoxinen belastet, die bei Mensch und Tier zu schweren gesundheitlichen Problemen führen können (Bennet & Klich, 2003). Neben

dem in infizierten Ährchen gebildeten DON wird während der Lagerung in kontaminiertem Saatgut das Toxin Zearalenon, ein nicht-steroides Mykoöstrogen, angereichert (Zinedine *et al.*, 2007). Daher darf solches Saatgut auch nicht weiter verarbeitet werden. In vielen Ländern wurden Höchstgrenzen für die Kontamination mit diesen Toxinen festgelegt (van Egmond & Jonker, 2004; Anonymus, 2005).

Fusarium head blight tritt hauptsächlich in den gemäßigten Klimazonen auf, wobei besonders schwere Ausbrüche in Nord- und Südamerika, Asien und Europa gemeldet wurden (Dubin *et al.*, 1997; Magdwick *et al.*, 2011). Durch feuchtwarmes Wetter und ausgedehnte Regenfälle im Frühjahr und Sommer wird das epidemiologische Risiko weiter erhöht (Stack, 1999). Da diese Wetterlagen auf Grund des Klimawandels immer häufiger der Fall sind, werden weitere schwere Ausbrüche erwartet.

Problematisch ist, dass bisher keine resistenten oder toxintoleranten Pflanzen zur Verfügung stehen, die wirtschaftlich nutzbar wären. Der Einsatz von Fungiziden gestaltet sich ebenfalls als schwierig, bedingt durch hohe Kosten und ein sehr kleines Zeitfenster, während der Blüte, für den optimalen Einsatz (McMullen *et al.*, 1997; Pirgozliev *et al.*, 2003). Auch steigt das Umweltbewusstsein in der Bevölkerung von Industrienationen, sodass nachhaltige Landwirtschaft und die Sicherheit von Lebensmitteln im Hinblick auf den Einsatz von Fungiziden immer wichtiger wird (Cho *et al.*, 2013). Daher wird verstärkt nach ökologisch vertretbaren Alternativen gesucht.

1.2 Mykoviren und Hypovirulenz

Mykoviren sind Viren, die in Pilzen replizieren. In allen wichtigen Phyla der Pilze, also Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Deuteromycota und Basidiomycota, konnten Mykoviren nachgewiesen werden (Ghabrial *et al.*, 2015). Vieles deutet darauf hin, dass bis zu 80 % aller Pilzarten mit einem Virus infiziert sein können (Ghabrial & Suzuki, 2009). In den 55 Jahren Forschung seit der ersten gesicherten Beschreibung einer Mykovirusinfektion (Hollings, 1962) wurden mehr als 250 Mykoviren sequenziert und in der NCBI Datenbank (National Center of Biotechnology Information) registriert (Xie & Jiang, 2014).

Die meisten Infektionen mit Mykoviren verlaufen kryptisch, was bedeutet, dass der Wirt keinerlei Symptome zeigt (Buck, 1986). In seltenen Fällen kann eine Virusinfektion für

den Wirt aber auch von Vorteil sein, so verhilft ein mit dem *Curvularia thermal tolerance* virus infizierter biotropher Pilz seinem pflanzlichen Wirt zu einer höheren Hitzetoleranz; Mykoviren können also auch in einer *three way*-Symbiose, also einer Symbiose zum gegenseitigen Nutzen von drei Parteien, aktiv sein (Márquez *et al.*, 2007). Andere Viren schaden ihrem Wirt erheblich. Besonderes Interesse in der Forschung wecken Viren, die pathogene Pilze infizieren und deren Virulenz reduzieren (Pearson *et al.*, 2009). Dieser Effekt wird als Hypovirulenz bezeichnet und kann zu reduziertem Myzelwachstum, reduzierter sexueller und asexueller Sporulation, verminderter Keimungsfähigkeit der Sporen, gesenkter Stressresistenz oder gesteigerter Pigmentierung beim infizierten Pilz führen (Chu *et al.*, 2002; Moleleki *et al.*, 2002; Ihrmark *et al.*, 2004; Nuss, 2005; Darissa *et al.*, 2012). Daraus ergibt sich die Möglichkeit ein Virus zum nachhaltigen Pflanzenschutz einzusetzen. Erfolgreich bekämpft wird bereits der Kastanienrindenkrebs (*chestnut blight*) in Nordamerika, ausgelöst durch den Ascomyzeten *Cryphonectria parasitica* (Nuss, 1992). Dazu werden befallene Bäume mit hypovirulenten Stämmen inokuliert. Die Hypovirulenz wird durch das Virus *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) verursacht. Bei der Inokulation wird das Hypovirus auf den ursprünglich vorhandenen Stamm übertragen und löst so bei diesem ebenfalls Hypovirulenz aus. Die Tumore können abheilen und der befallene Baum gerettet werden (Nuss, 1992). Auch in Europa wird dieses Verfahren mit großem Erfolg angewendet (Heiniger & Rigling, 1994; Robin & Heiniger, 2001). Aber auch bei der Bekämpfung von Pilzerkrankungen, die für landwirtschaftliche Kulturpflanzen von Bedeutung sind, wie beispielsweise die Weißstängeligkeit (*rapeseed stem rot*) bei Raps (*Brassica napus*), ausgelöst durch *Sclerotinia sclerotiorum* (Ju *et al.*, 2013; Xie & Jiang, 2014), oder der Wurzelschimmel (*white root rot*) bei diversen Reben und Obstgehölzen, ausgelöst durch *Rosellinia necatrix* (Chiba *et al.*, 2010), sind durch Hypovirulenz induzierende Viren vielversprechende Ergebnisse erzielt worden. Um die Kontrolle von Pathogenen durch Viren zu beschreiben, wurde der Begriff „Virocontrol“ geprägt (Chiba *et al.*, 2010).

Obwohl alle Schritte einer Virusinfektion von diversen spezifischen Interaktionen zwischen viralen Elementen und Wirtsfaktoren abhängig sind, ist über die Identität und Funktion von diesen Faktoren nicht allzu viel bekannt (Son *et al.*, 2016). Gerade für die Erforschung der Hypovirulenz ist es essenziell die genaue Wirkung und Funktion der viralen Proteine sowie ihrer Interaktionspartner im Wirt zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurden vermehrt Profile differenzieller Genexpression von virusinfizierten,

phytopathogenen Pilzen mittels *Transcriptomics* und *Proteomics* erstellt (Allan & Nuss, 2004; Kwon *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2014).

Mykoviren haben viele Charakteristika mit Viren aus Tieren und Pflanzen gemein, zeigen aber auch einige einzigartige Unterschiede. Die meisten Mykoviren haben keine extrazelluläre Phase und werden an andere Individuen nur über Sporulation oder Zellfusion (Anastomosen) weitergegeben. Darüber hinaus verfügen sie über kein *movement*-Protein, das essenziell für die meisten Pflanzenviren ist (Son *et al.*, 2015). Außerdem sind keine natürlichen Vektoren, wie beispielsweise Insekten oder Spinnentiere, bekannt (Ghabrial *et al.*, 2015).

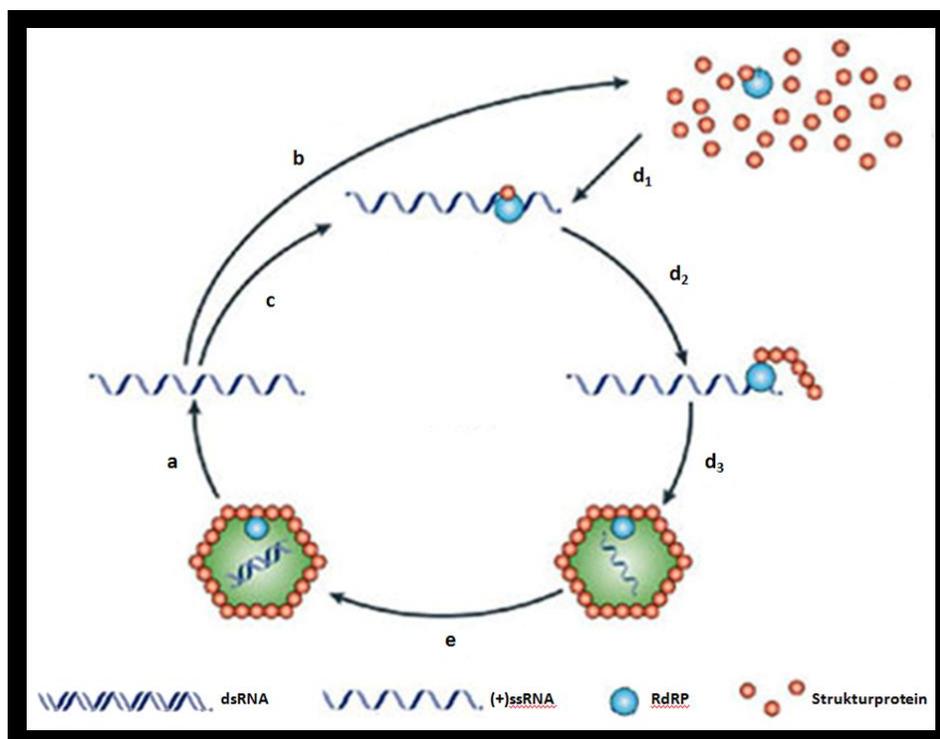


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Replikation von dsRNA-Viren. (a) Im Partikel wird mit Hilfe der RdRP der (+)ssRNA synthetisiert und ins Zytoplasma abgegeben. (b) Die (+)ssRNA dient als Template für die Synthese von viralen Proteinen. (c und d₁) Die exprimierte RdRP bindet an die (+)ssRNA. (d₂ und d₃) Weitere Strukturproteine bilden um die (+)ssRNA und die RdRP das Partikel. (e) Im Partikel wird die (-)ssRNA mit Hilfe der RdRP synthetisiert und der Doppelstrang bildet sich. Abbildung modifiziert nach Schmitt & Breinig (2006).

Die meisten Mykoviren haben ein dsRNA-Genom (Jiang & Ghabrial, 2013). Die Replikation von dsRNA Viren erfolgt in fünf Schritten (Abbildung 2). Zunächst wird mit Hilfe der viralen *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRP) die (+)ssRNA synthetisiert und als mRNA in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen. Dort werden die viralen Proteine exprimiert und gegebenenfalls prozessiert (Irigoyen *et al.*, 2012). Die exprimierte virale RdRP bindet an die (+)ssRNA und ein neues Partikel wird durch Anlagerung von Hüllproteinen um diesen Komplex gebildet. Im Partikel erfolgt die Synthese der

(-)ssRNA und ein neuer Doppelstrang entsteht. Dadurch, dass zu keiner Zeit ein Doppelstrang frei im Zytoplasma vorliegt, soll eine Abwehrreaktion des Wirtes mittels *gene silencing* vermieden werden. Diese könnte allerdings auch durch intramolekulare *hairpin*-Strukturen der (+)ssRNA induziert werden (Molnar et al., 2005), weshalb einige dsRNA-Viren als zusätzlichen Schutz einen *gene silencing* Suppressor kodieren (Hammond et al., 2001).

Beim *gene silencing*, in Pilzen auch *quelling* genannt (Romano & Macino, 1992), handelt es sich um einen Mechanismus, der posttranskriptional die Genexpression regulieren kann (Chang et al., 2012). Desweiteren dient dieser auch der Abwehr von fremder Nukleinsäure, insbesondere von Viren (Matzke et al., 2000). Auch *F. graminearum* ist zum *gene silencing* fähig (Chen et al., 2015).

Die Anwesenheit von dsRNA im Zytoplasma induziert den spezifischen Abbau von komplementärer mRNA durch *gene silencing*. Eine Nuklease, genannt Dicer, zerlegt die dsRNA in Abschnitte von 21-25 bp. Diese werden *short interfering RNAs* (siRNA) genannt. Die siRNA, der Dicer sowie einige weitere Proteine, darunter die *Argonaute*-Proteine, interagieren und bilden zusammen den *RNA-induced gene silencing complex* (RISC), der durch die Entwindung der dsRNA aktiviert wird. Die so präsentierte einzelsträngige siRNA bindet an homologen RNA-Strängen und der Dicer im RISC spaltet diese. Der Prozess wird durch die Replikation von einzelsträngiger siRNA mittels RdRPs aufrechterhalten (Hamilton & Baulcombe, 1999; Bernstein et al., 2001; Lipardi et al., 2001; Tabara et al., 2002).

1.3 Das Chrysovirus *Fusarium graminearum* Virus China 9

Die Viren der Familie *Chrysoviridae* mit ihrem einzigen Genus *Chrysovirus* zeichnen sich dadurch aus, dass diese über ein dsRNA-Genom verfügen, das aus vier monocistronischen Segmenten besteht (Ghabrial & Castón, 2011). Mit den *Chrysoviridae* werden allerdings auch Viren assoziiert, die über 3 oder 5 Segmente verfügen, welche allerdings noch nicht offiziell vom ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) anerkannt sind (Urayama et al., 2010; Darissa et al., 2011; Li et al., 2013; Wang et al., 2014).

Die Segmente sind jeweils einzeln in unbehüllte, isometrische Partikel verpackt, die mindestens aus Kapsidproteinen und RdRP bestehen (Ghabrial & Castón, 2011). Für

eine erfolgreiche Replikation müssen wahrscheinlich alle Segmente in der Zelle vorliegen.

Bei dem Mykrovirus *Fusarium graminearum virus china 9* (FgV-ch9) ließen Sequenzvergleiche eine Zugehörigkeit zu den *Chrysoviridae* vermuten (Darissa *et al.*, 2011). Das Genom dieses Virus besteht allerdings aus fünf monocistronischen dsRNAs, die wahrscheinlich jeweils einzeln in Partikel (Abbildung 3C) verpackt sind. Auf Grund dieses Partikelbaus gehört FgV-ch9 in die Familie der *Chrysoviridae*. Ob in Zukunft ein eigenes Genus für Viren mit fünf Segmenten geschaffen wird, bleibt abzuwarten.

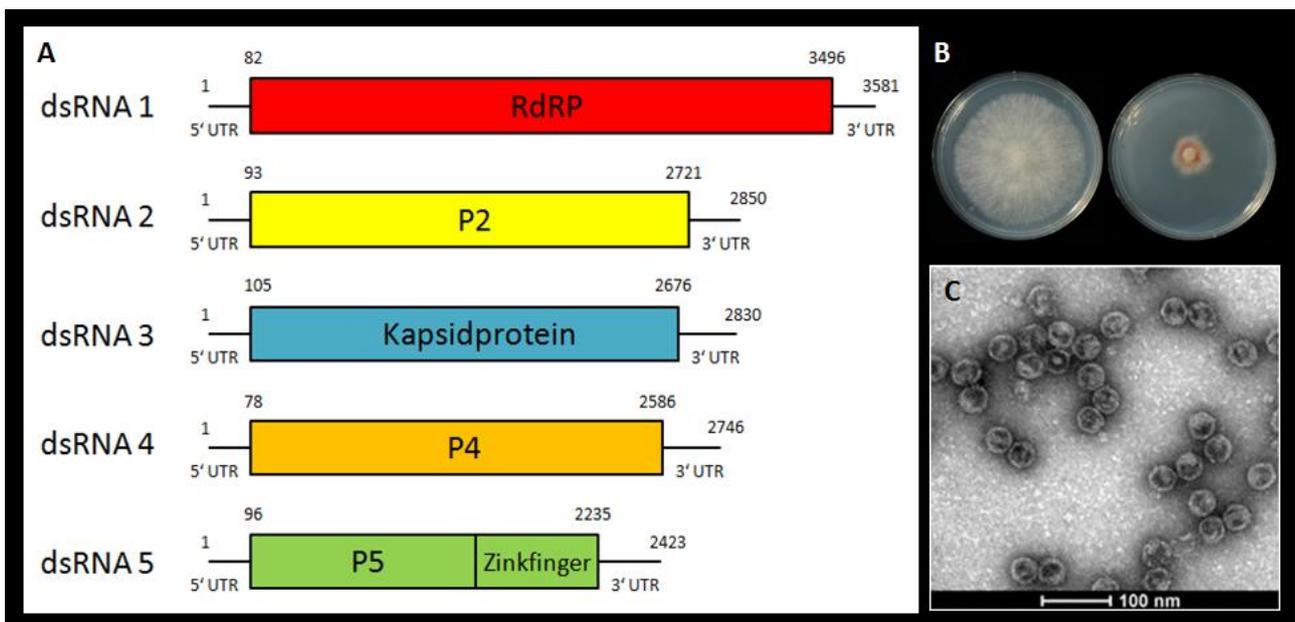


Abbildung 3: Das Chrysovirus *Fusarium graminearum virus china 9* (FgV-ch9).

A: Schematische Darstellung der fünf dsRNA Segmente von FgV-ch9. Die Leserahmen (ORF) sind als farbige Kästen dargestellt. Der ORF 1 kodiert für eine *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRP), der ORF 3 für ein Kapsidprotein. Die Funktion der Proteine P2, P4 und P5 ist nicht bekannt. Die Zahlen beschreiben (von links nach rechts) das erste Nucleotid des Segments, das erste Nucleotid des ORFs, das letzte Nucleotid des ORFs und das letzte Nucleotid des Segments. Abbildung erstellt nach Darissa (2011).

B: Typischer Phänotyp eines virusfreien (links) und eines mit dem Mykrovirus FgV-ch9 infizierten (rechts) *F. graminearum* auf CM-Festmedium, 3dpi.

C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von FgV-ch9 Partikeln. Abbildung entnommen aus Alder (2014).

© Julius-Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Institut für Epidemiologie und Pathogendiagnostik. Foto: K. R. Richert-Pöggeler.

Das virusinfizierte Isolat fiel wegen seines Phänotyps auf (Abbildung 3B); es zeigte verstärkte Pigmentierung, reduziertes Wachstum, verringerte Konidienbildung und verminderte Infektiosität auf der Wirtspflanze (Darissa *et al.*, 2011). Diese Symptome wurden mit Hypovirulenz in Verbindung gebracht (Darissa *et al.*, 2012) und können eindeutig auf FgV-ch9 zurückgeführt werden (Darissa, 2011; Magsig, 2013; Götsch, 2013). Die weitere Forschung richtet sich nun darauf welche Funktionen die einzelnen viralen Proteine haben und wie das Virus die Hypovirulenz induziert. Diese Kenntnisse

sind Voraussetzung dafür, ob und in welcher Form dieses im Pflanzenschutz eingesetzt werden kann.

Durch Sequenzanalysen auf bekannte Motive und Proteinvergleiche konnten einigen viralen Proteinen mögliche Funktionen bereits zugeordnet werden (Darissa *et al.*, 2011). P1, kodiert auf Segment 1, zeigt hohe Homologien zu RdRPs und konnte im Partikel nachgewiesen werden. Die Proteine P2 und P3 sind auf den Segmenten 2 und 3 kodiert und lassen sich ebenfalls im Partikel nachweisen. P2 zeigt Homologien zum Strukturprotein von *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1* (MoCV1-A; Urayama *et al.*, 2012), weshalb Darissa *et al.* (2011) vermuten, dass es sich um ein Hüllprotein handelt.

P3 zeigt ebenfalls Homologien zu den Hüllproteinen vom Avian bornavirus Genotyp 1 (AbV-1; Mirhosseini *et al.*, 2012), MoCV1-A und *Fusarium graminearum virus 2* (FgV2; Yu *et al.*, 2011). Desweiteren legen Markierungsexperimente nahe, dass P3 das Kapsid bildet und nach außen exponiert ist (Darissa, 2011). Das Protein P4, kodiert auf Segment 4, zeigt keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen, während das Protein P5, kodiert auf Segment 5, über mehrere Zinkfinger-Domänen verfügt. Die Funktion der Proteine ist unbekannt, sie sind allerdings beide kein Bestandteil des Partikels (Darissa *et al.*, 2011). Eine Übersicht über die dsRNAs von FgV-ch9 ist in Abbildung 3A gezeigt.

Die im Partikel ermittelten Molekulargewichte der Proteine P2 und P3 stimmen nicht mit den berechneten überein, was darauf schließen lässt, dass diese vermutlich prozessiert werden (Darissa, 2011). Virale Proteine können durch vom Virus kodierte Proteine prozessiert werden (Dougherty & Semler, 1993). Dabei werden sie entweder autoproteolytisch (Shapira & Nuss, 1991) oder durch ein anderes virales Protein mit Protease-Aktivität (Lee *et al.*, 2012) umgesetzt. Außerdem können auch wirtseigene Proteasen die Prozessierung von viralen Proteinen übernehmen (Soldevila *et al.*, 1998; Irigoyen *et al.*, 2012). Welche dieser Mechanismen bei FgV-ch9 zum Einsatz kommen, ist nicht bekannt.

In *F. graminearum* sind eine Reihe Mykoviren beschrieben, von denen allerdings nur einige wenige Anzeichen für Hypovirulenz zeigen (Cho *et al.*, 2013). Dazu gehören neben FgV-ch9 die Hypoviren *Fusarium graminearum virus 1 strain DK21* (FgV1-DK21; Chu *et al.*, 2002) und *Fusarium graminearum hypovirus 2* (FgHV2; Li *et al.*, 2015).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel der Arbeit war, mehr über die viralen Proteine P1-P5 von FgV-ch9 zu erfahren. Schlüsse über deren Zeitpunkt der Synthese, Prozessierung, Funktion und Wechselwirkung mit dem Wirt *F. graminearum* sollten gezogen werden.

Die zeitliche Einordnung der Expression sowie die natürliche Prozessierung sollten mittels spezifischen Antisera und Zeitreihen von virusinfiziertem Myzel ermittelt werden.

Mit Hilfe von Expressionsmutanten der fünf Proteine in den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie im natürlichen Wirt *Fusarium graminearum* sollten Folgerungen über Prozessierung und andere mögliche posttranslationale Modifikationen abgeleitet werden. Darüber hinaus sollten über die Charakterisierung der *F. graminearum*-Expressionsmutanten Informationen über die Wirkung auf den Wirt und die Funktion der viralen Proteine gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen

2.1.1.1 Bakterien

Zur Erstellung der Konstrukte (2.2.2.7) wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* NM522 (Sambrook *et al.*, 2001) verwendet.

Zur Expression von Proteinen (2.2.3.1) in *E. coli* wurde der Stamm BL21 Gold (Stratagene, USA) genutzt. Dieser enthält ein durch IPTG induzierbares T7-RNA-Polymerasegen.

Für die transiente Pflanzentransformation mittels Infiltration (2.2.5.1) wurde der Stamm *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pPM90 (DNA Cloning Service, Deutschland) eingesetzt.

2.1.1.2 Pilze

Für die Expression von Proteinen (2.2.3.1) in *Saccharomyces cerevisiae* wurde der Stamm INV Sc1 (Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet.

Für die Expression von Proteinen (2.2.3.1) in *Fusarium graminearum* und die Charakterisierung der Mutanten (2.2.4) wurde der Wildtypstamm FgPH1 (Strain Passport: NRRL 31084) verwendet.

Als Referenzstamm diente die Mutante FgPH1-eGFP (Brückner, 2012), die konstitutiv eGFP exprimiert und über eine Hygromycinresistenz verfügt. Sie wurde auch als Ausgangsmutante für die Überprüfung eines putativen *gene silencing* Suppressors (2.2.5.3) verwendet.

Als Donor-Stamm für die Infektion von *Fusarium*-Stämmen mit dem Virus FgV-ch9 (2.2.1.4) diente der virusinfizierte Stamm FgCh9 (Darissa *et al.*, 2011).

2.1.1.3 Pflanzen

Für alle Untersuchungen der Virulenz von *F. graminearum* auf Wirtspflanzen (2.2.4) wurde das anfällige Weizenkultivar *Triticum aestivum* cv. Nandu (KWS Lochow-Petkus, Deutschland) verwendet. Die Pflanzen wurden in einer Klimakammer über ca. 6 Wochen bei 18-20° C mit 60 % relativer Luftfeuchtigkeit und 16 Tageslichtstunden angezogen.

Für die transiente Expression mittels *A. tumefaciens* (2.2.5.1) wurde die transgene Tabaklinie *Nicotiana benthamiana* Domin. Linie 16c (Ruiz *et al.*, 1998) und der Wildtyp (WT) *Nicotiana benthamiana* Domin. als Referenzlinie verwendet. In einer Gewächshauskammer wurden die Pflanzen bei 22-24° C mit 16 h Zusatzbeleuchtung bei Tag angezogen.

2.1.2 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Deutschland) synthetisiert. Die Bezeichnung, Sequenz und ggf. Quelle sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 1-5) aufgeführt.

Für die Resequenzierung der ORFs (*open reading frames*) von FgV-ch9 (3.1.2) wurden die folgenden Primer verwendet (Tabelle 1):

Tabelle 1: Synthetische Oligonukleotide, verwendet für die Resequenzierung der kodierenden und nicht kodierenden Bereiche der dsRNAs 2, 3 und 5 von FgV-ch9

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Quelle
RNA2_rev	GCC ATT AAA GTC CCA TGA C	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA2_fw	CAT ATT GTC ACG AGC GAC G	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA2_fw/rev	AGT CAT GGG ACT TTA ATG GC	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA3_rev	GCC ATT TAA GGG TTC TCC TTA A	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA3_coding fw 1	GCA CCT GTG GAT GAT GAC TC	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA3_coding fw 2	GGT AGA AGC GGC ACG GGC CGG	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA3_fw/rev	TTA AGG AGA ACC CTT CCC TGG C	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA5_rev	GCC ATT TAG GGG TAG GCC	Blum <i>et al.</i> , 2017
RNA5_fw	GAT TTG CTT CGA GCC ACA ACG	Blum <i>et al.</i> , 2017
Poly-G	CGG AAT TCC G ₁₅	Heinze <i>et al.</i> , 1995

Die aufgeführten Primer in Tabelle 2 wurden zur Erstellung der Konstrukte (2.2.2) verwendet:

Tabelle 2: Synthetische Oligonukleotide, verwendet für die Vektorkonstruktion

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Quelle
pET_hin	AGT ACT TTA AGA AGG AGA TAT AC	Götsch, 2015
pET_rück	GTT AGC AGT ACT ATC TCA GTG G	Götsch, 2015
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AG	Tan, 2008
T7	TAA TAC GAC TCA CTA T	Tan, 2008

AlcA-Spel	ACT AGT CGG GAT AGT TCC GAC CTA G	
GluA_Mfe	CCA TTA ACC TAG GTA CAG AAA AGT CCA ATT GC	Götsch, 2015
pQE_hin	CCC GAA AAG TGC CAC CTG	Garten, 2013
35S_for	CAA CAT GGT GGA GCA CGA CAC TCT CGT C	
600rev	GAT TGT TTC CTC GTC GGC TTT	
P2_BamHI	GGA TCC ATG TCA GGA CAA TTG AAC ATT C	
P2_HindIII	AAG CTT TTC CGA ACC AAA ACA C	
24upR	CAA GAT GAG CGG TTG AAC	
21DR	CTG TAC TGG CCA TGG CAT ATT GT	Darissa, 2011
21DI	TTG TCG TGC CTG GGT GCT TAT	Darissa, 2011
rt21R	ACA TCA ATC GAA TGT CCT CAG	Darissa, 2011
P3_BamHI	GAT TTG GAT CCA TGG CAT CG	Garten, 2013
P3_HindIII	TTT AAG CTT TAA CGT CGA CGG	Garten, 2013
P3_NTR_5'_R	GAT CAG CTC GCT GGT TGA C	
3116_upR	ACG TCT GTC GAA CAA TGC GT	
14MF	CGT TAG TTG CTG TCC TTC CTC A	Darissa, 2011
P4_XhoI	CTA GCT CGA GGT CTT TGC TGG C	
P4_NcoI	TGC AAC ACC ATG GCA AC	
siRNA_P4_rev	ACT GGT GAA GCC CGG CTC ACG	
1010R	TGT TGT GTC CGG CAG TAT G	
P5_SmaI	TTC CCC GGG ATG TAT TCG	
zinkR2	GTG CAG TGT TGC ACC TGG	Götsch, 2015
rtzinkR	TCA GTT ATC GGG TAG GTG TC	Darissa, 2011
eGFP_BstBI	TTC GAA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GA	
eGFP_BglII	AGA CTC TTG TAC AGC TCG TCC ATG CCG	Götsch, 2015
si_eGFP_rev	GGC AGC AGC ACG GGG CCG TCG	
eGFP_XhoI_for	GAG CTC CCT CGA GAG CAG CAA GGG CG	
eGFP_XhoI_rev	CGA GAT TAG CTC GAG CTT GTA CAG C	
si_eGFP_for	CGA CGG CCC CGT GCT GCT GCC	Götsch, 2015
3116_RR	CAG TTA GCG GTG TGG TTG GC	Darissa, 2011
NAT_for	CTC TTG ACG ACA CGG CTT AC	Mentges, 2012
NAT_rev	CGT TGA CGT TGG TGA CCT C	Mentges, 2012
M13_rev	CAG GAA AGC TAT GAC	Brune <i>et al.</i> , 1999
P5_Stopp	ATA CAT AAT GGC ACC AC	

Die Primer in Tabelle 3 fanden in der qPCR (2.2.3.7) Verwendung:

Tabelle 3: Synthetische Oligonukleotide, verwendet in der Quantitativen Real-Time PCR (qPCR)

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Quelle
GScreen_fw	GTT GTA TCT GTG ACC CTT GTT GAG	Bönnighausen, 2014
GScreen_rev	GAT GTC GTT GCC TTC CTC CT	Bönnighausen, 2014
Fg06611_fw	CGC ATA CCA CGG AAC TTC AG	
Fg06611_rev	TCA AGA TCG ACC AGA ACA GCA	
Wheat_GABA_for	AGG TCA TTA CCG CAT TTG GA	Bönnighausen, 2014
Wheat_GABA_rev	CAC ATA CGC AGA CGA AAG AG	Bönnighausen, 2014
qPCR_FGL1_fw	TCG TTC AAG GTC GTC TCC G	
qPCR_FGL1_rev	GGT CCT TGG CGT TCG TAA C	

Um die Integration von Konstrukten ins Genom und Transkripte nachzuweisen, wurden Primer aus Tabelle 4 verwendet:

Tabelle 4: Synthetische Oligonukleotide zum Nachweis der Integration ins Genom und der Transkription bei Fusarium-Transformanden

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Quelle
Poly-dT	GCG GGA TCC T ₁₇	Heinze <i>et al.</i> , 1995
3116_F	TGG GTC GTG CGC AAG GAA A	Darissa, 2011
3116_RR	CAG TTA GCG GTG TGG TTG GC	Darissa, 2011
4for4	GGC GCT TGA AAC GTC ATT GT	
rtRDRP_R	CCA GTG CCT TAT TGT AAC CC	Darissa, 2011
CB8 (P2)	GAC GTGGCT GAG CTA GG	
CB7 (P3)	AAA CAA TTT CAC GGC AGA CC	
rtFF	GCA GCT ACA CCA GTT AAC AG	Darissa, 2011
CB10 (P5)	ACA AAC GTG ATT GGC AGG	
21for	CTT CCT GGC AAT GGC AAT GCT G	
rt21R	ACA TCA ATC GAA TGT CCT CAG	Darissa, 2011
pET_rück	GTT AGC AGT ACT ATC TCA GTG G	Götsch, 2015
3346up_R	CTG GAG GCG TAG CGT TTA CT	Darissa, 2011
3346up_F	TGT TAC GGC GAG CTA ATG TAC C	
rtzinkR	TCA GTT ATC GGG TAG GTG TC	Darissa, 2011
rtzinkF	AGT AGT TAT GAC GAT GAT GCA C	Darissa, 2011

Zur Erstellung aller Sonden, die im Southern Blot Verwendung fanden (2.2.3.9), wurden folgende Primer, dargestellt in Tabelle 5, benötigt:

Tabelle 5: Synthetische Oligonukleotide zur Erstellung von Sonden für den Southern Blot

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Quelle
4for_new	ACA AGC CGA ACA GTT TCA CG	
4rev_new	TTG CCT GCC CGA TGT TGA	
21DR	CTG TAC TGG CCA TGG CAT ATT GT	Darissa, 2011
21DI	TTG TCG TGC CTG GGT GCT TAT	Darissa, 2011
3116_RR	CAG TTA GCG GTG TGG TTG GC	Darissa, 2011
3116_F	TGG GTC GTG CGC AAG GAA A	Darissa, 2011
rt_FR	AAA GTG CCG ATT CTA TAC ATG G	Darissa, 2011
3346up_F	TGT TAC GGC GAG CTA ATG TAC C	
rtzinkR	TCA GTT ATC GGG TAG GTG TC	Darissa, 2011
pQE_hin	CCC GAA AAG TGC CAC CTG	Garten, 2013

2.1.3 Plasmide

In Tabelle 6 werden alle Plasmide aufgeführt, die in dieser Arbeit Verwendung fanden.

Tabelle 6: Aufstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, ihre Funktion und ihre Quelle

pBluescript Sk-	als T-Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	Stratagene, USA
<i>pBluescript Sk-T+eGFP</i>	enthält die komplette Sequenz von eGFP	Götsch, 2015
<i>21FullRe1</i>	pGEM-T mit der kompletten Sequenz von dsRNA 2 (FgV-ch9)	Darissa, 2011
<i>P16 3116Full</i>	pGEM-T mit der kompletten Sequenz von dsRNA 3 (FgV-ch9)	Darissa, 2011
<i>Fcontig</i>	pGEM-T mit der kompletten Sequenz von dsRNA 4 (FgV-ch9)	Darissa, 2011
pQE-32	zur Expression von Proteinen in E. coli, T7-Promotor, N-terminaler His-Tag	Qiagen GmbH, Deutschland
pET-30a	zur Expression von Proteinen in E. coli, T7-Promotor, N-terminaler His-Tag und S-Tag, C-terminaler His-Tag	Novagen, USA
<i>pET[His+S+P1_ATG+His]</i>	enthält die komplette Sequenz des ORFs von dsRNA 1 (FgV-ch9)	Götsch, 2015

pCR2.1	als T-Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten	Thermo Fisher Scientific, USA
pYES-A	zur Expression von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i> , Gal1-Promotor, N-terminaler His-Tag	Thermo Fisher Scientific, USA
p7 35S	zur transienten Expression von Proteinen mittels <i>A. tumefaciens</i> , 2x 35S-Promotor	DNA Cloning Service, Deutschland
<i>pBIN-[eGFP]</i>	zur transienten Expression von eGFP mittels <i>A. tumefaciens</i>	Tan, 2008
<i>pBIN-[P19]</i>	zur transienten Expression von P19 (tomato bushy stunt virus; Ye et al., 2003) mittels <i>A. tumefaciens</i>	E. Maiss, Universität Hannover
pSilent-AlcA	zur Expression von Proteinen in <i>F. graminearum</i> , alcA-Promotor, hervorgegangen aus pSilent1 (Nakayashiki et al., 2015)	C. Heinze, Universität Hamburg
pSilent-ΔGluA	zur Expression von Proteinen in <i>F. graminearum</i> , verkürzter gpdA-Promotor, hervorgegangen aus pSilent1 (Nakayashiki et al., 2015)	Götsch, 2015
<i>pSilent Dual2-[eGFP]</i>	RNA silencing Konstrukt, das durch zwei gegenläufige trpC-Promotoren dsRNA von eGFP erzeugt	Nguyen QB, 2008
<i>pFg-[bPAC]</i>	pAN7.1-GluA mit der kompletten Sequenz von bPAC (photoaktivierte Adenylatzyklase; Jansen et al., 2015)	M. Mentges, Universität Hamburg
<i>pNR1</i>	enthält die komplette Sequenz der NAT-Resistenz-Kassette	J. Bormann, Universität Hamburg

2.1.4 Antiseren

Zur spezifischen Detektion von Proteinen im Western Blot (2.2.3.3) wurden diverse Antiseren verwendet. Dazu gehören die gegen einen Tag gerichteten Antiseren, wie das gegen einen Histidin-Tag (His-Tag) gerichtete monoklonale Antiserum *Anti-polyHistidin* (produziert in Maus; Sigma-Aldrich, USA) und das gegen einen S-Tag gerichtete polyklonale Antiserum *S-Tag* (produziert in Kaninchen; Biomol, Deutschland).

Das polyklonale Antiserum *AS0115*, das gegen die Partikel des Virus FgV-ch9 gerichtet ist, und das polyklonale Antiserum *Anti-GFP* wurden in Kaninchen im Laboratorium von Prof. Dr. F. Rabenstein (Julius Kühn-Institute, Quedlinburg, Deutschland) hergestellt (Darissa, 2011).

Die folgenden Antiseren wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) gegen künstlich synthetisierte Peptide von FgV-ch9 hergestellt. Dazu wurden Kaninchen nach der ersten Injektion mit dem spezifischen Peptid noch nach 14, 21 und 56 Tagen immunisiert. Blutproben (Blutungen) wurden vor der ersten Injektion sowie nach 38 und 66 Tagen genommen. Nach 87 Tagen erfolgte die finale Blutung, wobei das gesamte Blut des Kaninchens entnommen und das Serum extrahiert wurde. Die genaue Aminosäuresequenz der Peptide und die Position im Virus-Protein sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Peptide wurden über ein Cystein an den Träger gekoppelt.

Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten Peptidantiseren, der Aminosäuresequenz der Peptide und ihrer Position im Virusprotein.

ORF	Aminosäuresequenz	Position im Virus-Protein	Bezeichnung
P2	H-CNATLPYKARENPKAD-NH ₂	AS 368-382	<i>AK-P2N</i>
P3	H-CPVNQRADRSRRDVA-NH ₂	AS 127-142	<i>AK-P3N</i>
P4	H-CFTTKDEGSGPSKLTG-NH ₂	AS 54-69	<i>AK-P4N</i>
P5	H-CQWSDERIPTGPGYDL-NH ₂	AS 68-63	<i>AK-P5N</i>

Als sekundäre Antiseren wurden die mit Alkalischer Phosphatase konjugierten *Anti-Mouse IgG* A3562 und *Anti-Rabbit IgG* A3687 (beide produziert in Ziege; Sigma-Aldrich, USA) verwendet.

2.1.5 Medien

Die einzelnen Bestandteile der Medien wurden in ddH₂O gelöst und bei 121° C und 1 bar für 20 min autoklaviert. Temperaturempfindliche Substanzen, wie Antibiotika oder Zucker, wurden nach dem Autoklavieren in das handwarme Medium gegeben.

LB-Flüssigmedium	10 g	Trypton	LB-Festmedium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt		5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl		10 g	NaCl
	ad 1000 ml	ddH ₂ O		15 g	Mikroagar
				ad 1000 ml	ddH ₂ O

LB-Amp	150 mg ad 1000 ml	Ampicillin LB-Medium	LB-Kana	50 mg ad 1000 ml	Kanamycin LB-Medium
LB-Rif/Gen	50 mg 50 mg ad 1000 ml	Gentamycin Rifampicin LB-Medium	LB-Rif/Gen/Spec	50 mg 50 mg 100 mg ad 1000 ml	Gentamycin Rifampicin Spectinomycin LB-Medium
LB-AIX	150 mg 47 mg 40 mg ad 1000 ml	Ampicillin IPTG X-Gal LB-Medium	LB-Rif/Gen/Kana	50 mg 50 mg 50 mg ad 1000 ml	Rifampicin Gentamycin Kanamycin LB-Medium
SOB-Medium pH 7,5	20 g 5 g 500 mg 200 mg ad 1000 ml	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl ddH ₂ O	SOC-Medium pH 7,5	100 µl 100 µl ad 10 ml	Glukose (2 M) MgCl ₂ (2 M) SOB-Medium
SD-Ura-Flüssigmedium pH 5,8	20 g 6,7 g 770 mg ad 1000 ml	Glukose Difco®-Hefe-Stickstoffquelle o. Aminosäuren Clontech -Ura Zusatz H ₂ O	YPG-Medium	10 g 10 g 20 g ad 1000 ml	Trypton Hefeextrakt Glukose ddH ₂ O
SD-Ura-Festmedium pH 5,8	20 g 6,7 g 770 mg 16 g ad 1000 ml	Glukose Difco®-Hefe-Stickstoffquelle o. Aminosäuren Clontech -Ura Zusatz Mikroagar ddH ₂ O	SD-Ura-Induktion pH 5,8	6,7 g 770 mg 10 g 20 g ad 1000 ml	Difco®-Hefe-Stickstoffquelle o. Aminosäuren Clontech -Ura Zusatz Raffinose Galactose ddH ₂ O
CM-Lösung A	100 g ad 1000 ml	Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O ddH ₂ O	Weizen-Medium	16 g ad 1000 ml	Weizenblätter ddH ₂ O
CM-Lösung B	20 g 25 g 10 g ad 1000 ml	KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ ×7H ₂ O NaCl ddH ₂ O	CM-Flüssigmedium	1 g 500 mg 500 mg 10 ml 10 ml 50 ml 1 ml ad 1000 ml	Hefeextrakt Casein (enzymatisch) Casein (hydrolytisch) CM-Lösung A CM-Lösung B CM-Lösung C CM-Lösung D ddH ₂ O
CM-Lösung C	200 g ad 1000 ml	Glukose ddH ₂ O			

CM-Lösung D	60 g	H ₃ BO ₃	CM-Festmedium	1 g	Hefeextrakt
	390 mg	CuSO ₄ ×5H ₂ O		500 mg	Casein (enzymatisch)
	13 mg	KI		500 mg	Casein (hydrolytisch)
	60 mg	MuSO ₄ ×H ₂ O		10 ml	CM-Lösung A
	51 mg	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ×4H ₂ O		10 ml	CM-Lösung B
	5,48 mg	ZnSO ₄ ×7H ₂ O		50 ml	CM-Lösung C
	923 mg	FeCl ₃ ×6H ₂ O		1 ml	CM-Lösung D
	567 mg	FeCl ₃		16 g	Mikroagar
	2 ml	Chloroform		ad 1000 ml	ddH ₂ O
	ad 1000 ml	ddH ₂ O			
CM-Lösung L	200 g	Laktose	CM-Induktions- Flüssigmedium	1 g	Hefeextrakt
	ad 1000 ml	ddH ₂ O		500 mg	Casein (enzymatisch)
CM-Hyg	250 mg	Hygromycin B		500 mg	Casein (hydrolytisch)
	ad 1000 ml	CM-Medium		10 ml	CM-Lösung A
CM-Gen	100 mg	Geneticin		10 ml	CM-Lösung B
	ad 1000 ml	CM-Medium		50 ml	CM-Lösung L
				1 ml	CM-Lösung D
				1,2 g	L-Threonin
				ad 1000 ml	ddH ₂ O
CM-NAT	100 mg	Nourseothricin	CM-Induktions- Festmedium	1 g	Hefeextrakt
	ad 1000 ml	CM-Medium		500 mg	Casein (enzymatisch)
Minimal- Flüssigmedium	10 ml	CM-Lösung A		500 mg	Casein (hydrolytisch)
	10 ml	CM-Lösung B		10 ml	CM-Lösung A
	50 ml	CM-Lösung C		10 ml	CM-Lösung B
	1 ml	CM-Lösung D		50 ml	CM-Lösung L
	ad 1000 ml	ddH ₂ O		1 ml	CM-Lösung D
Minimal- Festmedium	10 ml	CM-Lösung A		16 g	Mikroagar
	10 ml	CM-Lösung B		1,2 g	L-Threonin
	50 ml	CM-Lösung C		ad 1000 ml	ddH ₂ O
	1 ml	CM-Lösung D	H₂O-Festmedium	15 g	Mikroagar
	16 g	Mikroagar		ad 1000 ml	ddH ₂ O
	ad 1000 ml	ddH ₂ O			

2.1.6 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien, Reagenzien und Enzyme wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Avegene (Taipeh, Taiwan)

Duchefa Biochemie (Haarlem, Niederlande)

Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)

Merck (Darmstadt, Deutschland)

New England Biolab (=NEB) (Frankfurt am Main, Deutschland)

peqLab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland)

Promega (Mannheim, Deutschland)

Roche (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Serva (Heidelberg, Deutschland)

Sigma (München, Deutschland)

Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Solis Bio Dyne (Tartu, Estland)

Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA)

Th. Geyer (Renningen, Deutschland)

Die Chemikalien entsprachen, wenn nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad *pro analysis*. Soweit nicht anders angegeben wurden alle Medien und Lösungen mit Reinstwasser (PureLab Flex, ELGA LabWater, Celle) hergestellt. Die Versuche wurden, falls nicht anders beschrieben, mit autoklaviertem Reinstwasser (ddH₂O) durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von *Fusarium graminearum* und FgV-ch9

2.2.1.1 Anzucht von Myzel auf Festmedium

Von auf Festmedium gewachsenem Myzel wurde mit einem Korkbohrer ein Agarblock (\emptyset 6 mm) ausgestanzt und auf frisches Festmedium (2.1.5) umgesetzt. Alternativ wurden mindestens 500 Konidien (2.2.1.3) auf das Festmedium übertragen. Anschließend wurden die Platten bei 28° C für 3 Tage im Dunkeln inkubiert.

2.2.1.2 Anzucht von Myzel in Flüssigmedium

Von auf Festmedium gewachsenem Myzel (2.2.1.1) wurde mit einem Korkbohrer ein Agarblock (\emptyset 6 mm) ausgestanzt und in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben in 10 ml CM-Flüssigmedium (2.1.5) übertragen. Alternativ wurden mindestens 500 Konidien (2.2.1.3) in 10 ml CM-Flüssigmedium in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben gegeben. Die Kolben wurden schüttelnd (150 rpm) bei 28° C für 3 Tage im Dunkeln inkubiert.

2.2.1.3 Anzucht von Konidien in Flüssigmedium

Von auf Festmedium gewachsenem Myzel (2.2.1.1) wurde mit einem Korkbohrer ein Agarblock (\emptyset 6 mm) ausgestanzt und in 50 ml Weizen-Medium (2.1.5) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Kultur wurde bei 28° C für 3 Tage im Dunkeln schüttelnd (150 rpm) inkubiert und dann über ein Wilson-Sieb (200 mesh) filtriert. Der Durchfluss wurde zentrifugiert (2000 rpm, 5 min; Heraeus Megafuge 11R, Thermo Fisher Scientific, USA), der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml ddH₂O aufgenommen. Mittels einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde die Konidiendichte bestimmt und mit ddH₂O auf die gewünschte Dichte eingestellt.

2.2.1.4 Infektion von *Fusarium graminearum* mit dem Virus FgV-ch9

Auf CM-Festmedium (2.1.5) wurde ein Agarblock (\emptyset 6 mm) virusinfiziertes Myzel (2.2.1.2) gesetzt und für 3 Tage bei 28° C im Dunkeln inkubiert, bevor zwei Agarblöcke des zu infizierenden Myzels mit anderer Resistenz im Abstand von je 1 cm dazugesetzt und für weitere 3-7 Tage bei 28° C im Dunkeln inkubiert wurden. Aus dem Überschneidungsbereich der beiden Kolonien wurden mehrere Agarblöcke ausgeschnitten und auf CM-Festmedium mit dem jeweiligen Antibiotikum überführt und für 3 Tage bei 28° C im Dunkeln inkubiert. Von den potentiell infizierten Kolonien

wurden Flüssigkulturen (2.2.1.2) angelegt, aus welchen RNA (2.2.3.5) extrahiert wurde. Die RNA wurde mittels Gelelektrophorese (2.2.2.3) aufgetrennt.

2.2.1.5 Extraktion von Viruspartikeln

Phosphat-Puffer 1 pH 7,0	100 mM	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
Phosphat-Puffer 2 pH 7,0	50 mM	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
Phosphat-Puffer 3 pH 7,0	10 mM	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
Sucroselösung	20 % (w/v)	Sucrose

Für die Extraktion von Viruspartikeln wurde ein modifiziertes Protokoll nach Aoki *et al.* (2009) verwendet.

Zunächst wurden etwa 1,5-2,5 g in Flüssigkultur (2.2.1.2) angezogenes Myzel durch Auspressen auf Graupapier vom Medium befreit und in einem Haushaltsmixer in 60-100 ml Phosphatpuffer 1 für 1-2 min zerkleinert. Nach Filtration durch ein Nylonnetz (60 den) wurden noch vorhandene grobe Zellbestandteile durch Zentrifugation (10 min, 7000 rpm, RT; Centrikon H-401, Rotor A6.14, Kontron Hermle, Deutschland) entfernt und der Überstand mit 20 % (v/v) Chloroform:n-Butanol (1:1) für eine Minute kräftig geschüttelt. Es wurde erneut zentrifugiert (10 min, 7000 rpm, RT; Centrikon H-401, Rotor A6.14, Kontron Hermle, Deutschland), Viruspartikel aus dem Überstand wurden mit 8 % (w/v) PEG 6000 und 1 % (w/v) NaCl vermischt und ün bei 4° C unter Rühren ausgefällt. Diese wurden für 15 min bei 10000 rpm und RT pelletiert (Centrikon H-401, Rotor A6.14, Kontron Hermle, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 55 ml Phosphatpuffer 2 aufgenommen. In einem Ti45-Zentrifugenröhrchen wurde mit 10 ml Sucroselösung ein Kissen vorgelegt, auf das die Virussuspension aufgetragen wurde. Es folgte eine Zentrifugation für 2 h bei 40000 rpm und 4° C (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Rotor Ti45, Beckmann, USA). Die wässrige Phase und das Sucrosekissen wurden verworfen, das Pellet wurde mit einem Glasstab zerstoßen. Die Konzentration an Protein und Nukleinsäure wurde photometrisch bestimmt (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Schweden).

2.2.1.6 Extraktion von Polysomen

Extraktionspuffer pH 9,0	200 mM	Tris-HCl
	400 mM	KCl
	35 mM	MgCl ₂
	25 mM	EGTA
	200 mM	Sucrose
	1 % (w/v)	Triton-X-100
	0,05 % (w/v)	β-Mercaptoethanol
Sucroslösung pH 8,5	40 mM	Tris-HCl
	200 mM	KCl
	30 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
	1,75 M	Sucrose
Resuspensionspuffer pH 7,6	25 mM	Tris-HCl
	25 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂

Zur Extraktion von Polysomen aus Myzel wurde ein modifiziertes Protokoll nach Jackson & Larkins (1976) verwendet. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden auf Eis gekühlt verwendet.

Zum Aufarbeiten des in Flüssigkultur angezogenen Myzels (2.2.1.2) wurde dieses durch Auspressen auf Graupapier vom Medium befreit und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 1,5-2,5 g des Myzelpulvers wurden in 25 ml Extraktionspuffer aufgenommen. Zur Entfernung grober Bestandteile folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15300 rpm und 4° C (Sigma 2k15, Rotor 12139, Deutschland). Der Überstand wurde auf 5 ml Sucroslösung in einem sterilen SW28-Zentrifugenröhrchen überschichtet und für 2 h bei 28000 rpm und 4° C zentrifugiert (Optima™ LE-80K Ultracentrifuge, Rotor SW28, Beckmann, USA). Die obere Phase wurde bis zum Sucrosekissen abgesaugt und verworfen. Um mögliche Verunreinigungen zu entfernen wurden die Wände des Zentrifugenröhrchens mit ddH₂O gespült, welches ebenfalls abgesaugt wurde. Anschließend wurde das Sucrosekissen abgesaugt und verworfen. Das verbliebene Pellet wurde mit einem sterilen Glasstab zerstoßen und in 200 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Abschließend wurde die Suspension zentrifugiert (5 min, 14000 rpm; Sigma 1-15, Sigma, Deutschland). Der Überstand wurde aliquotiert und bei -70° C gelagert. Die Konzentration an Protein und Nukleinsäure im Überstand wurde photometrisch bestimmt (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Schweden).

2.2.2 Vektorerstellung und Transformationsverfahren

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Puffer (10×)	200 mM	Tris-HCL
pH 8,75	100 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	100 mM	KCl
	1 % (v/v)	Triton-X-100

Für die Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels kurzer komplementärer Oligonukleotide (=Primer, 2.1.2) wurden drei verschiedene Polymerasen verwendet. Die Standard-PCR wurde mit „GoTaq® G2 DNA Polymerase“ (Promega, Deutschland) durchgeführt. Für die Erstellung von Transformations-Inserts (2.2.2.7) wurde „Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase“ (= Phusion Polymerase; NEB, Deutschland) verwendet. Zur Untersuchung von Plasmiden in Bakterien (2.2.2.10) wurde eine von einem *E. coli* (erhalten von P. Roggero, Instituto di Fitoviologia applicata del CNR, Turin, Italien) exprimierte Taq-Polymerase (=pTaq) verwendet.

Folgende Ansätze wurden vorbereitet:

	GoTaq Polymerase	Phusion Polymerase	pTaq
Template	1 µl DNA	1 µl DNA	1 µl Suspension
Puffer	5 µl GoTaq-Puffer (5×)	5 µl Phusion-Puffer (5×)	2,5 µl PCR-Puffer (10×)
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	1 µl	2 µl
dNTPs (2 mM)	2 µl	2,5 µl	2 µl
5'-3'-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
3'-5'-Primer (10 µM)	1 µl	1 µl	1 µl
Polymerase	0,25 µl (5 U/µl)	0,25 µl (2 U/µl)	0,2 µl Polymerase
ddH ₂ O	ad 25 µl	ad 25 µl	ad 25 µl

Zur Amplifikation wurden im TPersonal Thermocycler oder TGradient Thermocycler (Biometra, Deutschland) folgende Programme eingestellt:

	GoTaq/pTaq	Phusion Polymerase
Initiale Denaturierung	4 min, 94° C	30 s, 98° C
Denaturierung	30 s, 94° C	30 s, 98° C
Primer-Hybridisierung	1 min, 45° C-65° C	20 s, 42° C-72° C
Elongation	1 min, 72° C	40 s, 72° C
Finale Elongation	5 min, 72° C	5 min, 72° C

} } } } }

Insgesamt wurden die Schritte 2-4 in 30 Zyklen wiederholt. Bei Gebrauch eines PolydT-Primers (2.1.2) wurden den eigentlichen 30 Zyklen 3 Zyklen mit einer Hybridisierungstemperatur von 42° C vorausgestellt.

Ein Aliquot der jeweiligen Reaktion wurde auf einem analytischen Agarosegel (2.2.2.3) kontrolliert.

2.2.2.2 Restriktionsverdau von DNA

Verwendet wurden Restriktionsendonukleasen und das Puffersystem „CutSmart®“ von NEB (Deutschland). Folgender Ansatz oder ein Vielfaches davon wurde für mindestens eine Stunde inkubiert:

0,5 µg-1 µg DNA
 1,5 µl CutSmart Puffer (10×)
 0,5 µl Restriktionsendonuklease (10 U/µl)
 ad 15 µl ddH₂O

Die Inkubationstemperatur war von der jeweiligen Restriktionsendonuklease abhängig. Zur Überprüfung wurde der gesamte Ansatz oder ein Aliquot davon gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.2.3).

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (1×)	40 mM	Tris-Acetat
pH 8,3	1 mM	EDTA
Probenpuffer (5×)	10 mM	NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄
	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	0,25 % (w/v)	Xylencyanol
	50 % (v/v)	Glycerol

Je nach Größe des erwarteten Fragments wurden 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer (1x) geschmolzen und nach Abkühlung auf etwa 60° C mit Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) versetzt, bevor dieses zum Auspolymerisieren in einen Träger gegossen wurde. Probenaschen wurden mit Hilfe eines Kammes ausgeformt.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer (5x) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-120 V unter TAE-Puffer (1x).

Unter UV-Licht (254 nm) wurden die Nukleinsäuren anschließend detektiert und zur Dokumentation fotografiert (Gene Genius Bio Image System, Syngene/Synoptics, UK).

Zur Isolation von Nukleinsäuren einer bestimmten Größe, wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht (254 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend die Nukleinsäure von der Agarose gereinigt (2.2.2.5).

2.2.2.4 Modifikationen von Nukleinsäurefragmenten

Die Enden eines restringierten Nukleinsäurefragments (2.2.2.2) oder eines PCR-Fragments (2.2.2.1) wurden auf unterschiedliche Weise modifiziert.

Einzelsträngige 5' Überhänge wurden mit dem „Klenow-Fragment“ (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers aufgefüllt.

Einzelsträngige 3' Überhänge wurden mit Hilfe der „T4 DNA Polymerase“ (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers entfernt.

Die Erzeugung von Nukleotid-Überhängen erfolgte mit „Terminal Deoxynucleotidyl Transferase“ (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Angaben des Herstellers.

Zum Dephosphorylieren von Fragmentenden wurde die „FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase“ von Thermo Fisher Scientific (USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zum Anhängen einer Base an ein Fragmentende (Tailing) wurde folgender Ansatz 30 min bei 70° C inkubiert:

- 1-4 µl DNA-Fragment (blunt end)
- 3 µl GoTaq-Puffer (5×)
- 2 µl dATP, dTTP, dGTP oder dCTP (1 mM)
- 0,5 µl MgCl₂ (25mM)
- 0,5 µl GoTaq Polymerase (Promega, Deutschland)
- ad 15 µl ddH₂O

2.2.2.5 Reinigung von Nukleinsäurefragmenten

Zur Reinigung von Nukleinsäurefragmenten von Puffersystemen oder Agarosegelresten wurde das Kit „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ von Macherey-Nagel (Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.2.6 Fällung von Nukleinsäurefragmenten

Es wurde 1 Vol der in wässriger Lösung befindlichen DNA mit 1/10 Vol Stamm-Natriumacetat und 2,5 Vol 100 % Ethanol vermischt und bei -20° C für 30 min inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (30 min, 4° C, 14000 rpm; Heraeus Biofuge fresco, Thermo Fisher Scientific, USA) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und zentrifugiert (5 min, 4° C, 14000 rpm; Heraeus Biofuge

fresco, Thermo Fisher Scientific, USA). Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde bei 75° C getrocknet und in ddH₂O resuspendiert.

2.2.2.7 Einbau von DNA-Fragmenten in einen Vektor (Ligation)

Zum Einbau von DNA-Fragmenten (2.2.2.2) in Vektoren (2.1.3) wurde die „T4 DNA Ligase“ von Thermo Fisher Scientific (USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Allerdings wurde die Reaktionszeit auf 2 h bei RT oder üN bei 15° C angepasst.

2.2.2.8 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Lösung A pH 8,0	25 mM 50 mM 10 mM	Tris-HCl Glukose EDTA
Lösung B	200 mM 1 % (w/v)	NaOH SDS
Lösung C pH 4,8	3 M	Natriumacetat
Lösung D pH 8,3	50 mM 100 mM	Tris-HCl Natriumacetat
RNase A (10 mg/ml)	10 mg RNase pro ml wurden in 0,01 M Acetat (pH 5,2) für 15 min gekocht und dann auf RT abgekühlt. 0,1 Vol 1 M Tris-HCl (pH 7,4) wurde zugefügt. Die RNase wurde bei -20° C gelagert.	

Zur Isolation von kleineren Mengen Plasmid-DNA wurde eine modifizierte Form des von Birnboim & Doly (1979) entwickelten Verfahrens verwendet.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 14.000 rpm und RT in einer Tischzentrifuge Sigma 1-15 (Sigma, Deutschland) durchgeführt.

Es wurden 10 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (2.1.5) mit rekombinanten Bakterienzellen beimpft und bei 37° C üN unter starkem Schütteln inkubiert. Von 2 ml Kultur wurden in einem 2 ml-Reaktionsgefäß die Zellen durch Zentrifugation (1 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 10 min bei -20° C gekühlt. Danach wurde das Pellet in 200 µl Lösung A durch sanftes Schütteln vollständig resuspendiert und für 10-30 min bei RT inkubiert.

Zur alkalischen Lyse wurden 400 µl Lösung B hinzugegeben und durch Invertieren vermischt. Mit 300 µl Lösung C wurde neutralisiert, der Ansatz wurde invertiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Der nun sichtbare weiße Niederschlag wurde durch Zentrifugation (10 min) sedimentiert und der Überstand in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde wiederholt.

Zur Fällung der Nukleinsäuren wurden 600 µl Isopropanol zugefügt, vermischt und für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt.

Zum Waschen wurden die Nukleinsäuren in 200 µl Lösung D vollständig resuspendiert, mit 400 µl absolutem Ethanol zum erneuten Fällen versetzt und die Plasmid-DNA durch Zentrifugation (10 min) sedimentiert. Das Pellet wurde vollständig vom Überstand befreit, bei 70° C im Heizblock getrocknet und anschließend in 50 µl RNase A (1 mg/ml) aufgenommen.

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu gewinnen, wurde das „NucleoBond® Xtra Midi Kit“ von Macherey-Nagel (Deutschland) weitestgehend nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Präzipitation und alle folgenden Schritte wurden modifiziert.

Nach Zugabe von 3,5 ml Isopropanol wurde der Ansatz durch Schütteln vermischt und auf vier 2 ml-Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (14.000 rpm, 30 min, 4° C; Heraeus Biofuge fresco, Thermo Fisher Scientific, USA) pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Alle Ansätze wurden mit je 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und bei 70° C getrocknet. Die Pellets wurden in je 70 µl ddH₂O resuspendiert und alle Ansätze wurden zusammengeführt.

2.2.2.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung wurde gereinigte Plasmid-DNA (2.2.2.5) mit dem gewünschten Primer (2.1.2) vermischt an die Firma StarSEQ (Deutschland) nach deren Vorgaben übermittelt.

2.2.2.10 Transformation von *Escherichia coli*

MES-KOH pH 6,3	1 M	MES pH-Wert einstellen mit KOH
TFB pH 6,3	45 mM 10 mM 100 mM 3mM 10 mM	MnCl ₂ CaCl ₂ RbCl Cl ₃ CoH ₁₈ N ₆ MES-KOH
DND pH 7,5	1 M 12,5 M 10 mM	DTT DMSO Kaliumacetat

Für die chemokompetente Transformation von *Escherichia coli* wurde ein modifiziertes Protokoll von Hanahan (1983) verwendet.

Auf einer LB-Agarplatte (2.1.5) wurden *E. coli*-Zellen (2.1.1.1) ausgestrichen und üN bei 37° C inkubiert. In einen 1-Liter Erlenmeyerkolben wurden 30 ml SOB-Medium (2.1.5) und 300 µl MgCl₂ (2M) mit einer Impföse der frisch gewachsenen Zellen inokuliert. Die Anzucht erfolgte unter Schütteln bei 37° C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45-0,55. Die Suspension wurde in ein vorgekühltes 30 ml-Glas-Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (2000 rpm, 4° C, 12 min; Sigma 2k15, Rotor 12139, Deutschland) geerntet, in 10 ml TFB resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation (2000 rpm, 4° C, 12 min; Sigma 2k15, Rotor 12139, Deutschland). Das Pellet wurde in 2 ml TFB aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 70 µl DND wurde die Suspension vorsichtig gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Weitere 90 µl DND wurden zugegeben, vermischt und für 15 min auf Eis inkubiert.

Es wurden 200 µl der nun kompetenten Zellen auf den Ligationsansatz (2.2.2.7) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellsuspension für genau 90 s einem Hitzeschock von 42° C ausgesetzt und sofort danach für 2 min auf Eis abgekühlt wurde. Der Ansatz wurde mit 800 µl SOC-Medium (2.1.5) versetzt und für 45-60 min unter Schütteln bei 37° C inkubiert. Je 200 µl Suspension wurden auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (2.1.5) ausgestrichen und üN bei 37° C inkubiert.

Bei einer erfolgreichen Transformation erschienen am Folgetag Kolonien auf den LB-Platten.

2.2.2.11 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

HEPES pH 7,0	1 mM	HEPES
------------------------	------	-------

Glycerinlösung	10 % (v/v)	Glycerin
-----------------------	------------	----------

Die Herstellung elektrokompenter *Agrobacterium tumefaciens* (2.1.1.1) erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von McCormac *et al.* (1998).

Auf einer LB-Agarplatte (2.1.5) wurden *A. tumefaciens*-Zellen (2.1.1.1) ausgestrichen und üN bei 28° C inkubiert. Dann wurden 20 ml LB-Flüssigmedium (2.1.5) mit 5 Einzelkolonien beimpft und üN bei 28° C schüttelnd inkubiert. Davon wurden 10 ml in einen 2 l-Erlenmeyerkolben überführt und mit 500 ml antibiotikahaltigem LB-Medium (2.1.5) aufgefüllt. Die Kultur wurde bei 28° C schüttelnd inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,8 erreicht wurde. Anschließend wurde die Kultur für 20 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (2000 rpm, 15 min, 4° C; Centrikon H-401, Rotor A6.14, Kontron Hermle, Deutschland). Das Pellet wurde in 100 ml HEPES auf Eis resuspendiert und zentrifugiert

(2.000 rpm, 15 min, 4° C; Centrikon H-401, Rotor A6.14, Kontron Hermle, Deutschland). Dieser Schritt wurde wiederholt. Das Pellet wurde in 1 ml Glycerinlösung aufgenommen, in 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Transformation wurden die gefrorenen Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 50-100 ng Plasmid-DNA (2.2.2.8) für 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Elektrodenabstand, Eppendorf AG, Deutschland) überführt und im Elektroporator 2510 (Eppendorf AG, Deutschland) einer Spannung von 1250 V ausgesetzt. Aus der Küvette wurden die Zellen mit 1 ml SOC-Medium (2.1.5) herausgespült und für 3-4 h bei 28° C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden je 200 µl der Bakteriensuspension auf antibiotikahaltigen LB-Platten (2.1.5) ausplattiert und für 48 h bei 28° C inkubiert. Bei einer erfolgreichen Transformation erschienen nach zwei Tagen Kolonien auf den LB-Platten.

2.2.2.12 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Lithiumacetat	1 M	Lithiumacetat
PEG 4000	50 % (w/v)	PEG 4000

Auf SD-Festmedium (2.1.5) wurden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* inokuliert und üN bei 28° C inkubiert. In 10 ml YPG-Medium (2.1.5) wurden etwa 5 Kolonien übertragen und üN bei 28° C schüttelnd inkubiert. Die OD₆₀₀ dieser Vorkultur wurde bestimmt und in 50 ml YPG-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt. Nach 5 h Inkubation bei 28° C wurde die Kultur zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT; Heraeus Megafuge 11R, Thermo Fisher Scientific, USA) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml ddH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, RT; Heraeus Megafuge 11R, Thermo Fisher Scientific, USA). Die pelletierten Hefezellen wurden in 300 µl ddH₂O aufgenommen. Parallel dazu wurde Lachssperma-DNA (durchschnittliche Fragmentgröße: 7 kb) für 5 min bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Folgender Ansatz wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß vorbereitet:

50 µl Lachssperma-DNA
 300-500 ng Plasmid-DNA (2.2.2.8)
 50 µl Hefezellen
 ad 130 µl ddH₂O

32 µl Lithiumacetat
 240 µl PEG 4000

Der Ansatz wurde vorsichtig durch Pipettieren gemischt und für 30 min bei 30° C inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 45° C. Die Zellen wurden anschließend in einer Tischzentrifuge Sigma 1-15 (Sigma, Deutschland) für 3 min bei 2000 rpm pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 200 µl ddH₂O resuspendiert. Davon wurden 20 µl in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß mit 180 µl ddH₂O überführt. Beide Ansätze, unverdünnt und verdünnt, wurden komplett auf SD-Ura-Festmedium (2.1.5) ausplattiert und anschließend für 2 Tage bei 28° C inkubiert. Bei einer erfolgreichen Transformation erschienen nach zwei Tagen Kolonien auf den SD-Ura-Platten.

2.2.2.13 Protoplasten-Transformation von *Fusarium graminearum*

STC-CO-Puffer pH 8,0	10 mM	Tris-HCl
	50 mM	CaCl ₂
	20 % (w/v)	Saccharose
PEG-CO-Puffer	40 % (w/v)	PEG 4000
	60 % (v/v)	STC-CO-Puffer
TB3-Puffer	20 % (w/v)	Saccharose
	0,3 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,3 % (w/v)	Säure-hydrolysiertes Casein
TB3-Agar	1,5 % (w/v)	Agar
		in TB3-Puffer
Kaliumchloridlösung	1,2 M	KCl
Enzymmix	2,5 % (v/v)	Driselase® von <i>Basidiomycetes</i> sp. (Sigma-Aldrich)
	0,5 % (v/v)	Lytische Enzyme von <i>Trichoderma harzianus</i> (Sigma-Aldrich)
		in Kaliumchloridlösung

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT in der Heraeus Megafuge 11R (Thermo Fisher Scientific, USA).

Zur Vorbereitung der Transformation wurde der gewünschte Vektor (2.2.2.8) mittels Restriktionsendonukleasen (2.2.2.2) linearisiert und 2-20 ng wurden nach einer Fällung (2.2.2.6) in 30 µl ddH₂O aufgenommen.

Zunächst wurden 1×10^6 Konidien (2.2.1.3) des gewünschten Fusarium-Stammes (2.1.1.2) in 50 ml YPG-Medium (2.1.5) üN bei 28° C schüttelnd (150 rpm) inkubiert. Das ausgekeimte Myzel wurde durch ein Wilson-Sieb (40 mesh) vom Medium getrennt, mit ddH₂O gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. Der Enzymmix wurde frisch angesetzt, für 30 min gerührt und anschließend bei 4100 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend durch einen sterilen 0,22 µm Filter filtriert.

Zur Protoplastierung wurden 0,5 g Pilzmyzel mit 10 ml Enzymmix gemischt und in einem 50 ml-Erlenmeyerkolben für 2,5 h bei 30° C schüttelnd (80 rpm) inkubiert. Die Protoplasten wurden durch ein Wilson-Sieb (100 mesh) und danach durch ein Wilson-Sieb (40 mesh) gegeben. Die Siebe wurden mit insgesamt 10 ml Kaliumchloridlösung ausgespült und der Durchfluss wurde bei 2000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten im Pellet vorsichtig mit 10 ml STC-CO-Puffer gewaschen. Anschließend folgte eine weitere Zentrifugation (2000 rpm, 10 min). Die Protoplasten wurden mit einer Konzentration von 1×10^8 Zellen je ml in STC-CO-Puffer resuspendiert.

Von dieser Zellsuspension wurden 200 µl (2×10^7 Protoplasten) in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit den vorbereiteten 30 µl linearer Plasmid-DNA versetzt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEG-CO-Puffer mit dem Ansatz vorsichtig vermischt und für weitere 20 min bei RT inkubiert. Zur Regeneration wurden 5 ml TB3-Puffer zu den Protoplasten gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden 45 ml flüssiger TB3-Agar (50° C) gegeben und auf 5 Petrischalen (Ø 96 mm) verteilt. Die vollständige Regeneration der transformierten Protoplasten vollzog sich üN bei 28° C.

Zur Selektion der Transformanden wurden die Platten mit jeweils 10 ml antibiotikahaltigem H₂O-Festmedium (2.1.5) überschichtet. Die Platten wurden für mindestens 3 Tage bei 28° C inkubiert. Bei einer erfolgreichen Transformation durchbrachen einzelne Kolonien die Überschichtung und wuchsen auf dieser aus.

Diese Transformanden wurden auf antibiotikahaltigem CM-Festmedium (2.1.5) umgesetzt und für 3 Tage bei 28° C inkubiert.

2.2.3 Molekulare Analyse der Transformanden

2.2.3.1 Expression und Extraktion von Proteinen

Die Expression von Proteinen kann durch ganz unterschiedliche Wege induziert werden, abhängig vom Organismus und Vektorsystem.

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Zentrifugationsschritte in der Tischzentrifuge Sigma 1-15 (Sigma, Deutschland) durchgeführt.

Expression in *E. coli*

Stamm-IPTG	200 mM	IPTG
Extraktionspuffer Protein pH 8,0	100 mM	Tris-HCl
	700 mM	NaCl
	50 mM	EDTA
Laemmli-Puffer (2×) pH 6,8	125 mM	Tris-HCl
	2 mM	EDTA
	20 % (v/v)	Glycerin
	4 % (w/v)	SDS
	0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Expression von Proteinen kann in *E. coli* durch die Zugabe von IPTG induziert werden, da bestimmte Vektoren (2.1.3) über einen geeigneten Promotor aus dem T5-Phagen verfügen.

Von einer *E. coli* üN-Kultur wurde 1 ml in einen 100 ml-Erlenmeyerkolben mit 9 ml frischem, antibiotikahaltigem Medium (2.1.5) übertragen. Die Kultur wurde für etwa 1 h bei 37° C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Zur Induktion der Expression wurden 100 µl vom Stamm-IPTG hinzugefügt und die Kultur wurde anschließend bei 37° C für 2 h inkubiert.

Für die Aufbereitung der Proteine wurde 1 ml Kultur in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei RT zentrifugiert (3 min, 5000 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl Extraktionspuffer Protein resuspendiert.

Sollten die Proben über eine SDS-PAGE (2.2.3.2) aufgetrennt werden, wurde das gleiche Volumen an Laemmli-Puffer (2×) dazugegeben und die Proben anschließend für 5 min auf 95° C erhitzt. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis, wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 5 min) und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen.

Expression in *S. cerevisiae*

Extraktionspuffer Hefe 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄
pH 7,4

Die Expression von Proteinen kann in Hefe bei Verwendung des GAL1-Promotors aus *S. cerevisiae* über eine Umstellung der Kohlenstoffquelle von Glukose auf Galaktose induziert werden.

Von einer in SD-Ura-Flüssigmedium (2.1.5) angezogenen üN-Kultur wurde die OD₆₀₀ bestimmt, sodass so viel Kultur in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt werden konnte, um eine OD₆₀₀ von 0,4 in 30 ml einzustellen. Diese Hefesuspension wurde bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert (Heraeus Megafuge 11R, Thermo Fisher Scientific, USA), der Überstand verworfen und das Pellet in 30 ml SD-Ura-Induktionsmedium (2.1.5) aufgenommen. Es folgte eine Inkubation bei 28° C, wobei nach 8 h, 12 h und 24 h jeweils 4 ml Probe entnommen wurden.

Bei jeder Probennahme wurde die OD₆₀₀ bestimmt, die Proben bei 6000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend bei -20° C eingefroren. Die Menge an Extraktionspuffer Hefe, die für eine OD₆₀₀ von 75 von Nöten war, wurde berechnet und in der jeweiligen Menge wurde das Pellet resuspendiert. Die Proben wurden mit ca. 200 mg säuregewaschenen Glasperlen (425-600 µm, Sigma-Aldrich, USA) versetzt und für 10 min bei RT unter starkem Schütteln (2400 rpm; IKA® Vibrax-VXR, Jahnke&Kunkel, Deutschland) inkubiert.

Sollten die Proben über eine SDS-PAGE (2.2.3.2) aufgetrennt werden, wurde das gleiche Volumen an Laemmli-Puffer (2×) dazugegeben und die Proben anschließend für 5 min auf 95° C erhitzt. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis, wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 5 min) und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen.

Expression in *F. graminearum*

Die Expression von Proteinen in *F. graminearum* kann durch Zugabe von L-Threonin bei Verwendung des alcA Promotors aus *Aspergillus nidulans* induziert werden.

Ein Myzelblock wurde in 10 ml CM-Induktions-Flüssigmedium für 3 Tage bei 28° C schüttelnd inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 120 mg L-Threonin (entspricht einer Endkonzentration von 100 mM) und eine anschließende Inkubation der Ansätze für mindestens 4 h bei 28° C unter Schütteln.

Zum Aufarbeiten des Myzels wurde dieses durch Auspressen auf Graupapier vom Medium befreit und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg des Myzelpulvers wurden in 100 µl Extraktionspuffer Protein aufgenommen und gemischt. Sollten die Proben über eine SDS-PAGE (2.2.3.2) aufgetrennt werden, wurde das gleiche Volumen an Laemmli-Puffer (2×) dazugegeben und die Proben anschließend für 5 min auf 95° C erhitzt. Nach sofortigem Abkühlen auf Eis, wurden die Proben zentrifugiert (14000 rpm, 5 min) und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen.

2.2.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngelpuffer (4×) pH 8,8	1,5 M 0,4 % (w/v)	Tris-HCl SDS
Sammelgelpuffer (4×) pH 6,8	500 mM 0,4 % (w/v) 0,01 % (w/v)	Tris-HCl SDS Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer pH 8,3	25 mM 192 mM 0,1 % (w/v)	Tris-HCl Glycin SDS
Coomassie Färbelösung	0,2 % (w/v) 10 % (v/v) 40 % (v/v)	Coomassie Brilliant Blue G-250 Essigsäure Ethanol (technisch)
Entfärbelösung	25 % (v/v) 7,5 % (v/v)	Ethanol (technisch) Essigsäure

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zunächst das Trenngel angemischt. Abhängig von der erwarteten Proteingröße wurden verschiedene Konzentrationen an Acrylamid (Rotiphorese® Acrylamid 37,5:1, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland) eingesetzt:

	10 %	12,5 %
ddH ₂ O	4,6 ml	3,6 ml
Trenngelpuffer (4×)	2,8 ml	2,8 ml
Acrylamid (30 % (w/v))	3,8 ml	4,7 ml
APS (10 % (w/v))	75 µl	75 µl
TEMED	7,5 µl	7,5 µl

Schnellstmöglich wurde diese Mischung zu gleichen Teilen auf zwei Gelkammern (Minigel, Biometra, Deutschland) verteilt, da der Prozess der Polymerisation durch Zugabe von APS und TEMED gestartet wurde. Die Oberfläche wurde mit 1 ml ddH₂O überschichtet und die durchschnittliche Polymerisationsdauer betrug etwa 30 min. Im Anschluss wurde das Sammelgel (4 %) wie folgt angesetzt:

1,75 ml	ddH ₂ O
1,25 ml	Sammelgelpuffer (4×)
500 µl	Acrylamid (30 % (w/v))
50 µl	APS (10 % (w/v))
5 µl	TEMED

Das Sammelgel wurde, nachdem das Überschichtungswasser verworfen wurde, zügig auf das Trenngel pipettiert und ein Kamm zur Taschenbildung eingesetzt. Die Polymerisation dauerte etwa 15 min. Die fertigen Gele wurden in die Laufkammer eingespannt und diese dann mit SDS-Laufpuffer befüllt.

Es wurden 10-20 µl Probe (2.2.3.1) pro Proben tasche aufgetragen, sowie ein Molekulargewichtsstandard (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA). Eine Stromstärke von 20 mA pro Gel wurde für 60 bis 90 min angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erreicht wurde.

Im Anschluss konnten die Proteine zum einen im Gel gefärbt werden. Dazu wurde das Trenngel in bei RT in der Coomassie Färbelösung sanft geschüttelt. Durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung wurde der überschüssige Farbstoff aus dem Gel herausgewaschen. Die verwendete Entfärbelösung wurde durch Aktivkohle vom Farbstoff befreit und wiederverwendet.

Die Proteine konnten aber auch mittels Western Blot auf eine Membran transferiert werden (2.2.3.3).

2.2.3.3 Western Blot

Blottingpuffer pH 8,3	25 mM 192 mM 20 % (v/v)	Tris-HCl Glycin Methanol
PBS (10×) pH 7,4	137 mM 1,5 mM 8,1 mM 2,7 mM	NaCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ KCl
PBS-T pH 7,4	0,05 % (v/v)	in Tween-20 PBS (1×)
Blockierungspuffer pH 7,4	5 % (w/v)	in Magermilchpulver PBS-T
NBT-Lösung	91 mM	in NBT DMF (70 %)
BCIP-Lösung	170 mM	in BCIP DMF (100 %)
NBT/BCIP-Puffer pH 9,0	100 mM 5 mM 100 mM	Tris-HCl MgCl ₂ NaCl

Nach Abschluss der SDS-PAGE (2.2.3.2) wurde das Trenngel in die Vertikal Elektroblobt Apparatur (Hoefler Scientific Instruments, USA) übertragen. Der Aufbau erfolgte wie folgt unter Blottingpuffer: Auf einem Gitter wurde ein Schwamm platziert und darauf ein Filterpapier (Rotilabo®-Blottingpapier, Dicke 0,35 mm, Carl Roth GmbH & Co KG, Deutschland). Nun folgte das Gel, auf welches die Nitrozellulose-Membran (Amersham™ Protran™ 045 µm NC, GE Healthcare Life Sciences, Schweden) gelegt wurde. Es folgten ein weiteres Filterpapier, ein Schwamm und ein Gitter. Dieser Aufbau wurde in die Blottingkammer so eingelegt, dass sich auf der Seite der Membran die Anode und auf der Gelseite die Kathode befand. Die Kammer wurde mit Blotting-Puffer gefüllt und der Transfer der Proteine erfolgte üN bei 4° C bei einer Stromstärke von 40 mA oder alternativ 2 h bei RT bei einer Stromstärke von 100 mA.

Alle folgenden Inkubationen erfolgten unter Schütteln.

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran für 30 min bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Die Membran wurde dann für 2 h bei RT oder üN bei 4° C mit einem spezifischen Antiserum (2.1.4) überschichtet, welches auf die gewünschte Konzentration (2.1.4) mit Blockierungspuffer verdünnt wurde. Ungebundene Antikörper wurden dreimal für je 5 min mit PBS-T von der Membran gewaschen.

Dann wurde diese mit einem Anti-Antikörper, an den eine Alkalische Phosphatase konjugiert ist, und der im Verhältnis 1:10.000 in Blockierungspuffer verdünnt wurde, für 2 h bei RT oder üN bei 4° C inkubiert. Nachdem die Membran zweimal mit PBS-T und einmal mit PBS (1×) für je 5 min gewaschen wurde, erfolgte die Detektion mit NBT/BCIP.

Unmittelbar vor der Färbung wurden 66 µl NBT-Lösung und 33 µl BCIP-Lösung in 10 ml NBT/BCIP-Puffer aufgenommen, vermischt und auf die Membran gegeben. Nach einer Inkubation von 10 min-1 h bei RT oder üN bei 4° C wurden bläulich-graue Banden deutlich sichtbar und die Färbelösung konnte verworfen werden. Die Membran wurde mehrfach mit ddH₂O gewaschen, üN zwischen Graupapier getrocknet und konnte dann dokumentiert werden.

2.2.3.4 Proteasetest

Zur Untersuchung auf Proteaseaktivität in Protein-Rohextrakten (2.2.3.1) wurde das „Protease Assay Kit“ von Calbiochem® (Deutschland) verwendet. Rohextrakte aus *E. coli* und *S. cerevisiae* wurden nach Angaben des Herstellers (Plate Procedure) getestet.

2.2.3.5 RNA-Extraktion aus Myzel

Homogenisierungspuffer pH 5,2	4 M	Guanidinthiocyanat
	200 mM	Natriumacetat
	25 mM	EDTA
	1 M	Kaliumacetat
	2,5 % (w/v)	PVP 40
NLS	10 % (w/v)	N-Laurylsarcosin
Waschpuffer pH 7,5	10 mM	Tris-HCl
	0,5 mM	EDTA
	50 mM	NaCl
	50 % (v/v)	Ethanol
Natriumiodid (6M)	0,15 mM	Na ₂ SO ₃
	6 M	NaI
Silica-Partikel pH 2,0	60 g Silica-Partikel (S5631, Sigma-Aldrich, USA) wurden in 500 ml ddH ₂ O aufschütteln. Nach Absetzen der Partikel ün wurden 470 ml des Überstands abgesaugt und verworfen. Weiter 500 ml ddH ₂ O wurden zugegeben und vermischt. Nach 5 h hatten sich die Partikel erneut abgesetzt und etwa 440 ml Überstand wurden abgesaugt und verworfen. Die restliche Suspension wurde mit HCL auf einen pH-Wert von 2,0 eingestellt und aliquotiert.	

Zur Betrachtung der RNA bei Infektionsversuchen (2.2.1.4) ist eine modifizierte Methode nach Rott und Jelkmann (2001), beruhend auf der Bindung von Nukleinsäure an Silica-Partikel, besonders gut geeignet.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei RT in einer Tischzentrifuge Sigma 1-15 (Sigma, Deutschland).

Dazu wurde Myzel aus einer CM-Flüssigkultur (2.1.5, 2.2.1.2) durch Ausdrücken zwischen Graupapier von Medienresten befreit und unter Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg des Myzelpulvers wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Homogenisierungspuffer und 100 µl NLS versetzt und bei gelegentlichem Schütteln für 10 min bei 70° C inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 5 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (14000 rpm, 10 min). Dann wurden 300 µl des Überstands in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl Natriumiodid, 150 µl absolutem Ethanol und 25 µl Silica-Partikeln versetzt. Der Ansatz wurde 10 min bei RT unter Schütteln inkubiert und anschließend bei 6000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die sedimentierten Partikel wurden zweimal in 500 µl Waschpuffer aufgenommen und zentrifugiert (6000 rpm, 1 min). Das Pellet wurde getrocknet und anschließend in 120 µl sterilem ddH₂O resuspendiert. Nach 4 min Inkubation bei 70° C wurde der Ansatz bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert. Vom Überstand wurden 100 µl in ein neues 1,5 ml-

Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 3 min). Vom Überstand wurden 80 µl in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Wurde RNA größerer Reinheit benötigt, z.B. für eine qPCR (2.2.3.7), wurde das Kit „peqGOLD Trifast™“ von VWR Life Science Competence Center (Deutschland) verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei von 100 mg in Stickstoff gemörsertem Myzel ausgegangen wurde.

Nach beiden Verfahren wurde die RNA mittels Gelelektrophorese (2.2.2.3) kontrolliert und die Konzentration photometrisch (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Schweden) bestimmt.

2.2.3.6 Herstellung und Kontrolle von cDNA

Bevor die Synthese von cDNA begonnen werden kann, muss sichergestellt sein, dass sich keine gDNA in der Probe befindet. Dazu wurde die „DNaseI“ von Thermo Fisher Scientific (USA) wie folgt verwendet:

2 µl 1,5-2,7 µg RNA (2.2.3.5)
1 µl Reaktionspuffer (10×)
1 µl DNaseI (1 U/µl)
ad 10 µl ddH₂O

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37° C inkubiert. Durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) und Erhitzen auf 65° C für 10 min wurde das Enzym deaktiviert.

Für die cDNA-Synthese wurde die „RevertAid Reverse Transkriptase“ und der „RiboLock RNase Inhibitor“ (beide von Thermo Fisher Scientific, USA) verwendet.

Zum DNase verdauten Ansatz wurden 1 µl „Random Hexamer Primer“ (10 mM; Thermo Fisher Scientific, USA), 1 µl spezifische 3'-5' Primer (10 mM; 2.1.2) oder 2 µl PolydT-Primer (10 mM; 2.1.2) gegeben und anschließend für 5 min bei 70° C inkubiert. Der Ansatz wurde sofort auf Eis abgekühlt und mit folgenden Substanzen vermengt:

4 µl Reaktionspuffer (5×)
0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (40 U/µl)
5 µl dNTPs (2 mM)
1 µl RevertAid Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42° C inkubiert und die Reverse Transkriptase für 10 min bei 70° C inaktiviert.

Die cDNA wurde mittels PCR (2.2.2.1) mit im Fusarium-Genom bindenden Primern (2.1.2), die intronüberspannend angelegt wurden, auf DNA-Kontamination überprüft.

Die cDNA konnte nun in PCRs(2.2.2.1) und qPCRs (2.2.3.7) verwendet werden.

2.2.3.7 Quantitative Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Zur Bestimmung der relativen Transkriptionsstärke wurde die quantitative Real-Time PCR angewendet. Zur relativen Berechnung wurde das β -Tubulin (FGSG_06611) Gen in jeder Messung und von jeder Probe als Transkriptionsstandard mitgeführt. Es wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green im PCR-Mastermix „LightCycler® 480 SYBR Green I Master“ der Firma Roche Diagnostics GmbH (Deutschland) verwendet.

Zunächst wurde die als Template verwendete DNA (2.2.3.8) oder cDNA (2.2.3.6) 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Dann wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert:

5 μ l	SYBR Green I Master (2 \times)
1 μ l	5'-3'-Primer (10 μ M)
1 μ l	3'-5'-Primer (10 μ M)
1 μ l	Template
ad 10 μ l	ddH ₂ O

Von jeder Probe wurden drei technische Replikate getestet. Die PCR-Reaktion erfolgte im LightCycler® 480 (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland) mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	5 min, 95° C	
Denaturierung	15 s, 95° C	} $\times 45$
Primer-Hybridisierung	30 s, 58° C	
Elongation	30 s, 72° C	
Schmelzkurve	5 s/° C, 58-95° C	

Mit der LightCycler® 480 Software (Version 1.5) wurden die Cp-Werte (engl. *Crossing point*) und die Schmelzkurve im Analyse-Tool algorithmisch berechnet. Die Schmelzkurve der Amplifikate wird erstellt, um unspezifische PCR-Produkte oder Primerdimere auszuschließen. Zur Berechnung der relativen Expressionsunterschiede zwischen den Proben wurde das Programm REST 2009 (Relative Expression Software Tool, Pfaffl *et al.*, 2002) verwendet.

2.2.3.8 DNA-Extraktion mittels CTAB

CTAB-Lysispuffer	2 % (w/v)	CTAB
pH 8,0	100 mM	Tris-HCl
	20 mM	EDTA
	1,4 M	NaCl

Falls nicht anders erwähnt, wurden alle Zentrifugationsschritte bei RT in der Tischzentrifuge Sigma 1-15 (Sigma, Deutschland) durchgeführt.

In CM-Flüssigmedium (2.1.5) angezogenes Myzel (2.2.1.2) wurde durch Ausdrücken zwischen Graupapier vom Medium befreit und unter Stickstoff gemörst. Etwa 100 mg des Myzelpulvers wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß übertragen und mit 700 µl CTAB-Lysispuffer versetzt. Nach starkem Schütteln wurde der Ansatz für 1 h bei 65° C inkubiert und anschließend zentrifugiert (14000 rpm, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, durch Invertieren mit 700 µl Chloroform vermischt und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol durch Invertieren vermischt und für etwa 30 min bei -20° C eingefroren. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm und 4° C (Heraeus Biofuge fresco, Thermo Fisher Scientific, USA). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Es wurde erneut für 5 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert, das Pellet wurde für kurze Zeit bei RT getrocknet und in 300 µl ddH₂O aufgenommen. Um die Löslichkeit zu erhöhen, wurde der Ansatz für 1 h bei 50° C inkubiert.

Ein Aliquot der isolierten DNA wurde mittels Gelelektrophorese (2.2.2.3) aufgetrennt und die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, Schweden).

2.2.3.9 Southern Blot

Depurationspuffer	250 mM	HCl
Denaturierungspuffer	500 mM 1,5 M	NaOH NaCl
Neutralisierungspuffer pH 7,5	500 mM 1,5 M	Tris-HCl NaCl
SSC-Puffer (20×)	3 M 300 mM	NaCl Natriumcitrat
B1-Puffer (5×)	500 mM	Maleinsäure
Blockierungsreagenz (10 %)	10 % (w/v)	Blocking Reagent (Roche Diagnostics, Deutschland) in B1-Puffer (1×)
Prähybridisierungspuffer	0,1 % (w/v) 0,2 % (w/v) 2 %	N-Laurylsarcosin SDS Blockierungsreagenz in SSC-Puffer (5×)
Hybridisierungspuffer	25 ml	Prähybridisierungspuffer DIG-markierte Sonde

W1-Puffer	0,1 % (w/v)	SDS in SSC-Puffer (2×)
W2-Puffer	0,1 % (w/v)	SDS in SSC-Puffer (0,2×)
WP-Puffer	0,3 % (v/v)	Tween 20 in B1-Puffer (1×)
B2-Puffer	1 % (v/v)	Blockierungsreagenz in B1-Puffer (1×)
Antikörperlösung	Antiserum „ <i>Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments</i> “ (Roche Diagnostics, Deutschland), 1:10000 verdünnt in B2-Buffer	
B3-Puffer	100 mM	Tris-HCl
pH 9,5	100 mM	NaCl
CSPD-Lösung	Chemolumineszenzsubstrat CSPD (Roche Diagnostics, Deutschland), 1:100 verdünnt in B3-Puffer	

Die DIG-markierte Sonde, die spezifisch an das Zielgen bindet, wurde nach Angaben des Herstellers (Digoxigenin-11-dUTP, Roche Diagnostics, Deutschland) synthetisiert.

Genomische DNA (2.2.3.8) wurde \ddot{u} N restringiert (2.2.2.2), gefällt (2.2.2.5) und in 30 μ l ddH₂O aufgenommen. Die so behandelte DNA wurde über ein Agarosegel (2.2.2.3) aufgetrennt und das Gel anschließend nacheinander für je 10 min in Depurations-, Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer inkubiert. Darauf folgte ein Kapillarblot, durch den die DNA \ddot{u} N auf eine Nylonmembran (Amersham Hybond-NX, GE Healthcare Life Sciences, Schweden) übertragen wurde. Dazu wurde das Gel auf einer mit SSC-Puffer (20×) getränkten Whatman-Filterpapierbrücke platziert, deren Enden in einer mit SSC-Puffer (20×) gefüllten Schale hingen. Auf dem Gel wurde die in SSC-Puffer (2×) äquilibrierte Nylonmembran gelegt. Darauf folgten vier in SSC-Puffer (2×) getränkte Whatman-Filterpapiere und ein Stapel Graupapier. Gewichte (etwa 500g) beschwerten den Blot.

Am folgenden Tag wurde die DNA auf der Membran mittels UV-Crosslinker (1200 mJ/cm; UV Stratalinker 2400, Stratagene, USA) fixiert. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt, für 2 min in SSC-Puffer (2×) gewaschen und in 20 ml Prähybridisierungspuffer im Hybridisierungssofen (Hybrid Mini 38, Bachhofer, Deutschland) inkubiert (5 h, 68° C). Währenddessen wurde die DIG-markierte Sonde für 10 min bei 95° C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Der Prähybridisierungspuffer wurde durch 20 ml mit der Sonde versetztem Hybridisierungspuffer ersetzt und \ddot{u} N bei 68° C im Hybridisierungssofen (Hybrid Mini 38, Bachhofer, Deutschland) inkubiert.

Am folgenden Tag wurde der Hybridisierungspuffer mit Sonde entfernt und für weitere Verwendungen bei -20°C gelagert. Die Membran wurde zweimal für 5 min bei RT im Hybridisierungsröhrchen mit 50 ml W1-Puffer rotierend (Stuart™ Roller Mixer SRT1, Bibby Scientific, UK) gewaschen. Anschließend wurde zweimal für 15 min bei 68°C im Hybridisierungssofen (Hybrid Mini 38, Bachhofer, Deutschland) mit 50 ml W2-Puffer gewaschen.

Es folgte die Vorbereitung der Detektion. Dazu wurde die Membran im Hybridisierungsröhrchen mit WP-Puffer gespült und anschließend für 60 min in 15 ml B2-Puffer bei RT rotierend (Stuart™ Roller Mixer SRT1, Bibby Scientific, UK) inkubiert. Der B2-Puffer wurde verworfen und durch 15 ml Antikörperlösung ersetzt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde dieser ebenfalls verworfen und die Membran dreimal für 20 min mit 50 ml WP-Puffer gewaschen. Abschließend wurde die Membran für 5 min in 15 ml B3-Puffer äquilibriert.

Die Membran wurde auf eine Plastikfolie platziert, mit $500\ \mu\text{l}$ CSPD-Lösung überschichtet, eingeschweißt und für 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 15 min bei 37°C . Mittels Dunkelkammer-Kamera-System LAS-3000 (Fuji Photo Film Co., Japan) wurde die Chemolumineszenz detektiert und dokumentiert (2.2.5.2).

2.2.4 Phänotypische Analyse der Transformanden

2.2.4.1 Wachstumstest auf Festmedium

Für alle durchgeführten Wachstumstests wurden Kontrollreihen mit dem *F. graminearum* Wildtypstamm FgPH1 (2.1.1.2) und auf CM-Festmedium und CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) ohne Zusätze angesetzt. Alle Test-Platten (\varnothing 90 mm) wurden mit Myzelblöcken (\varnothing 6 mm) inokuliert und bei 28°C für 3 Tage inkubiert.

Oxidativer Stress durch H_2O_2

Die Überprüfung der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress erfolgte auf CM-Festmedium und CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) mit einem Zusatz von 10 mM, 15 mM und 20 mM H_2O_2 .

Osmotischer Stress durch NaCl

Die Überprüfung der Sensitivität gegenüber osmotischem Stress erfolgte auf CM-Festmedium und CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) mit einem Zusatz von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl.

2.2.4.2 Infektionsstudien auf Weizenähren

Zur Überprüfung der Pathogenität eines Fusarium-Stammes auf Weichweizen (*Triticum aestivum* cv. Nandu; 2.1.1.3) wurden gerade erblühte Ähren mit Konidien (2.2.1.3) des zu untersuchenden Stammes inokuliert.

Dazu wurden 10 µl einer Konidien suspension (50 Konidien/µl bei FgPH1; 20 Konidien/µl bei Fg8/1) zwischen Lemma und Palea pipettiert. Pro Ähre wurden zwei gegenüberliegende Ährchen inokuliert. Für die Negativkontrolle diente ddH₂O als Inokulum. Die ersten 3 Tage nach Inokulation waren die behandelten Ähren mit einer mit ddH₂O befeuchteten Plastiktüte umhüllt.

Nach 10-21 dpi wurden die Ähren geerntet, dokumentiert und die Anzahl der Ährchen mit Infektionssymptomen pro Ähre ausgezählt.

Zur Überprüfung des Verbreitungsgrades des Myzels und damit der Infektion innerhalb der Ähre wurden mit einer Rasierklinge Längsschnitte inokulierter Ährchen (10 dpi) angefertigt, mikroskopiert (AZ100 Multizoom, Nikon GmbH, Deutschland) und dokumentiert.

2.2.4.3 DON-Quantifizierung mittels ELISA

Zur Bestimmung des Gehalts an Deoxynivalenol (DON) in einer Probe wurde das Kit „Ridascreen® Fast DON“ von R-Biofarm (Deutschland) verwendet.

Von infizierten Weizenähren (10 dpi) (2.2.4.2) wurden jeweils die beiden inokulierten Ährchen verwendet. Diese wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und 200 mg des Pulvers wurden in 4 ml ddH₂O (Verdünnung 1:20) aufgenommen. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Um die Proben in Relation zur eingesetzten Pilzmasse zu setzen, wurde aus 100 mg Myzelpulver die DNA extrahiert (2.2.3.8) und mittels qPCR (2.2.3.7) mit den Primern β -Tubulin for und β -Tubulin rev (2.1.2) quantifiziert.

2.2.4.4 Analyse von Infektionskissen auf Weizenspelzen

Färbelösung 0,1 % (w/v) Trypanblau
in Essigsäure (45 %)

Zur Induktion von Infektionsstrukturen wurden von gerade erblühenden Ähren des Weichweizens (*Triticum aestivum* cv. Nandu; 2.1.1.3) die Hüllspelzen (Gluma) und die Vorspelzen (Palea) heraus präpariert und in sterilem ddH₂O gewaschen. Die Präparate wurden auf H₂O-Festmedium (2.1.5) platziert und mit je 5 µl Konidiensuspension (20 Konidien/µl; 2.2.1.3) auf der konkav gewölbten Innenseite (Gluma) bzw. konvex gewölbten Außenseite (Palea) inokuliert. Die Petrischalen wurden versiegelt und für 4-8 Tage in einer Wachstumskammer (Versatile Environmental Test Chamber MLR-351, Sanyo, Japan) bei 22° C und 16 Lichtstunden inkubiert.

Zur mikroskopischen Betrachtung des auf den Spelzen gewachsenen Myzels musste dieses angefärbt werden. Dazu wurde der Farbstoff Trypanblau verwendet, der Pilzgewebe und tote Gewebe anfärbt.

Die Glumen wurden zunächst ün in 96 % Ethanol (technisch) entfärbt. Da die Palea bereits nahezu farblos ist, war ein Entfärben nicht notwendig. Die Spelzen wurden für 5 min bei RT in der Färbelösung inkubiert und kurz in ddH₂O und 45 % Essigsäure (v/v) gespült. Die Betrachtung und Dokumentation erfolgte unter dem Stereomikroskop (Leica MZ FL III, Leica Mikrosysteme GmbH, Deutschland).

2.2.4.5 Auskeimungstest und Vereinzeln von Konidien

Um zu überprüfen, wie viele der angezogenen Konidien (2.2.1.3) keimungsfähig sind, wurden 100 µl (2 Konidien/µl) einer Konidiensuspension auf H₂O-Festmedium (2.1.5) ausplattiert und ün bei 28° C inkubiert. Die ausgekeimten Konidien wurden unter einem Stereomikroskop (Leica MZ6, Leica Mikrosysteme GmbH, Deutschland) ausgezählt.

Um Konidien (2.2.1.3) zu vereinzeln, wurden 100 µl (5 Konidien/µl) auf H₂O-Festmedium (2.1.5) ausplattiert und ün bei 28° C inkubiert. Unter einem Stereomikroskop (Leica MZ6, Leica Mikrosysteme GmbH, Deutschland) wurden die ausgekeimten Konidien identifiziert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und auf antibiotikahaltiges CM-Festmedium (2.1.5) umgesetzt. Anschließend wurden sie bei 28° C für 3 Tag inkubiert.

2.2.4.6 Anzucht von Perithezien auf Weizennodien

Aus Weizenstrohhalmen wurden ca. 3 cm lange Stücke geschnitten, die je ein Nodium enthielten. Diese wurden autoklaviert, 12 h bei inkubiert und anschließend erneut autoklaviert. Die Halme wurden auf H₂O-Festmedium ausgelegt und mit je 10 µl einer Konidiensuspension (2.1.5) von 5 Konidien/µl inokuliert. Die versiegelten Platten wurden in einer Klimakammer (20° C, 16 Lichtstunden) 14-40 Tage inkubiert.

Nach Bildung der Perithezien wurde der Deckel der Petrischale entfernt und durch einen mit H₂O-Festmedium (2.1.5) gefüllten Deckel ersetzt. Nach einer Inkubation von 7 Tagen in der Klimakammer (20° C, 16 Lichtstunden) wuchsen auf dem Wasseragar des Deckels ausgekeimte Ascosporen.

2.2.5 Analyse von möglicher *gene silencing* Suppressor Aktivität

2.2.5.1 Aktivierung und Infiltration transformierter *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm-MES pH 5,7	1 M	MES
Stamm-MgCl₂	2 M	MgCl ₂
Stamm-ACET	100 mM	Acetosyringon in DMSO (50 %)
Aktivierungslösung	500 µl 75 µl	Stamm-MES Stamm-ACET ad 50 ml LB-Flüssigmedium (antibiotikahaltig)
Infiltrationslösung pH 5,8	100 µl 15 µl 20 µl	Stamm-MES Stamm-ACET Stamm-MgCl ₂ ad 10 ml H ₂ O

Um Fremd-DNA in eine Pflanze einzubringen, wurde die Infiltration mit transformierten *Agrobacterium tumefaciens* verwendet. Sowohl die Aktivierungs-, als auch die Infiltrationslösung müssen stets frisch angesetzt werden.

Transformierte Agrobakterien (2.2.2.11) wurden in 2 ml antibiotikahaltigem LB-Flüssigmedium (2.1.5) üN bei 28° C schüttelnd angezogen. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 50 ml Aktivierungslösung überführt und erneut üN bei 28° C schüttelnd inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (20 min, 4° C, 4100 rpm, Centrikon H-401, Rotor A6.14, Kontron Hermle, Deutschland), das Pellet in 10 ml Infiltrationslösung resuspendiert und für 2-3 h bei 28° C geschüttelt.

Zur Infiltration wurde die Bakteriensuspension in eine 1 ml-Spritze aufgezogen, an die Blattunterseite angesetzt und in die Interzellularen des Blattgewebes gedrückt. Die infiltrierten Pflanzen verblieben für 4 dpi im Gewächshaus. Anschließend wurden die infiltrierten Blätter geerntet und im Dunkelkammer-Kamera-System LAS-3000 (Fuji Photo Film Co., Japan) betrachtet und dokumentiert (2.2.5.2).

2.2.5.2 Detektion und Dokumentation von Chemolumineszenz und Fluoreszenz sowie optische Analyse ihrer Intensität

Die Detektion und Dokumentation von GFP und Chemolumineszenz erfolgte mit dem Dunkelkammer-Kamera-System LAS-3000 (Fuji Photo Film Co., Japan) unter Verwendung der folgenden Einstellungen:

	Lichtquelle	Filter	Iris	Interval	Sensitivität
Fluoreszenz (GFP)	Incident light LED (460 nm)	510 nm +/- 10 nm	F0.85	Increment 10 s	Standard
Chemolumineszenz	-	-	F0.85	Increment 10 min 1 h	Ultra High

Zur optischen Analyse der Fluoreszenzintensität wurde das auf Java basierende Programm „ImageJ“ (Wayne Rasband, National Institut of Health, USA) verwendet. Von den Bildern wurden die Pixelwerte ausgewählter Bildbereiche ermittelt und verglichen.

2.2.5.3 Fluoreszenzbestimmung mittels Plate Reader

Die Fluoreszenz von eGFP in auskeimendem Myzel wurde am Mithras² LB943 Multimode Reader (Berthold Technologies, Deutschland) bestimmt. Dazu wurden schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten mit 100 µl Minimal-Festmedium (2.1.5) je Kavität beschichtet. Anschließend wurde jede Kavität mit 10 µl einer Konidiensuspension mit 20 Konidien/µl (2.2.1.3) beimpft. Zur Kontrolle wurden einige Kavitäten mit 10 µl ddH₂O bestückt. Die Platten wurden bei 28° C inkubiert, sodass die Konidien keimen konnten. Alle 24 h wurde die Fluoreszenz (Anregung 460 nm, Emission 520 nm) gemessen.

2.2.5.4 Statistische Auswertung von Datensätzen

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel und dem Excel Add-in Daniel's XL Toolbox (Kraus, 2014).

Bei normalverteilten Varianzen wurde zur Bestimmung der Signifikanz eine einfaktorielle ANOVA (*analysis of variance*) mit angeschlossenem Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm) durchgeführt.

Bei nicht-normalverteilten Varianzen wurde zur Bestimmung der Signifikanz eine Kruskal-Wallis H-Test mit angeschlossenem Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni) durchgeführt.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Zeitpunkt der Synthese, die Prozessierung, die Wirkung und die Funktion der durch die fünf ORFs von FgV-ch9 kodierten Proteine näher untersucht werden. Bisher war bekannt, dass die Gene der viralen Strukturproteine der RNAs 2 und 3 ein größeres berechnetes Molekulargewicht aufweisen, als im Partikel zu finden ist. Deswegen wurde das Prozessierungsmuster der Proteine eines virusinfizierten *F. graminearum* Isolats betrachtet und die Sequenzen der fünf RNAs überprüft (3.1). Die fünf viralen ORFs wurden in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* heterolog exprimiert (2.2.3.1) und die resultierenden Proteinmuster mit denen eines infizierten *F. graminearum* Isolats verglichen (3.3.2). So sollten Rückschlüsse über die Prozessierung gezogen werden.

Um die Wirkung und Funktion der Proteine näher zu betrachten, wurden *F. graminearum* Mutanten, die die einzelnen viralen ORFs exprimieren, in Bezug auf Wachstum, Virulenz, asexuelle sowie sexuelle Vermehrung charakterisiert (3.5) und auf spezifische Funktionen (3.6) getestet.

3.1 Charakterisierung der viralen Segmente und Proteine von FgV-ch9

Bisher war nur bekannt, dass das Molekulargewicht der beiden Strukturproteine P2 und P3 nicht mit dem aus der Sequenz abgeleiteten Molekulargewicht übereinstimmt.

Zunächst wurden die viralen Proteine von FgV-ch9 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation nachgewiesen. Dabei ergaben sich einige Diskrepanzen, die durch Re-Sequenzierung der fünf ORFs größtenteils aufgeklärt werden konnten.

3.1.1 Betrachtung der Prozessierung aller fünf Proteine von FgV-ch9 über einen Zeitraum von 20 Tagen

In isolierten Viruspartikeln ist das Protein P1, die virale RdRP, mit einer Bande von etwa 130 kDa in einer SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung (2.2.3.2) zu erkennen. Dieses entspricht dem aus dem ORF abgeleiteten Molekulargewicht. Da also keine

Prozessierung zu erwarten war, wurde kein Antiserum erstellt (2.1.4) und das Protein in diesem Zusammenhang nicht weiter untersucht.

Zur Klärung der Expression und Prozessierung der von den anderen vier ORFs von FgV-ch9 kodierten Proteine, wurde eine Zeitreihe angelegt. In Flüssigkultur (2.2.1.2) wurde Myzel von *Fusarium graminearum* PH1-GFP virusinfiziert (FgPH1-GFP VI; 2.2.1.4) über 3, 6, 16 und 20 Tage angezogen. Vom 3 Tage alten Myzel wurden das Gesamtprotein (2.2.3.1), die Polysomen (2.2.1.6) und die Partikel (2.2.1.5) isoliert. Als Negativkontrolle diente eine 3 Tage alte Kultur von *Fusarium graminearum* PH1-GFP virusfrei (FgPH1-GFP VF; 2.1.1.2).

Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE (2.2.3.2) aufgetrennt, mittels Western Blot (2.2.3.3) auf eine Membran übertragen und mit spezifischen Peptid-Antisera (2.1.4) detektiert.

Zur Detektion von Protein P2, kodiert auf der dsRNA2, wurde das Antiserum AK-P2N (2.1.4) verwendet. Das Proteinmuster ist in Abbildung 4 dargestellt.

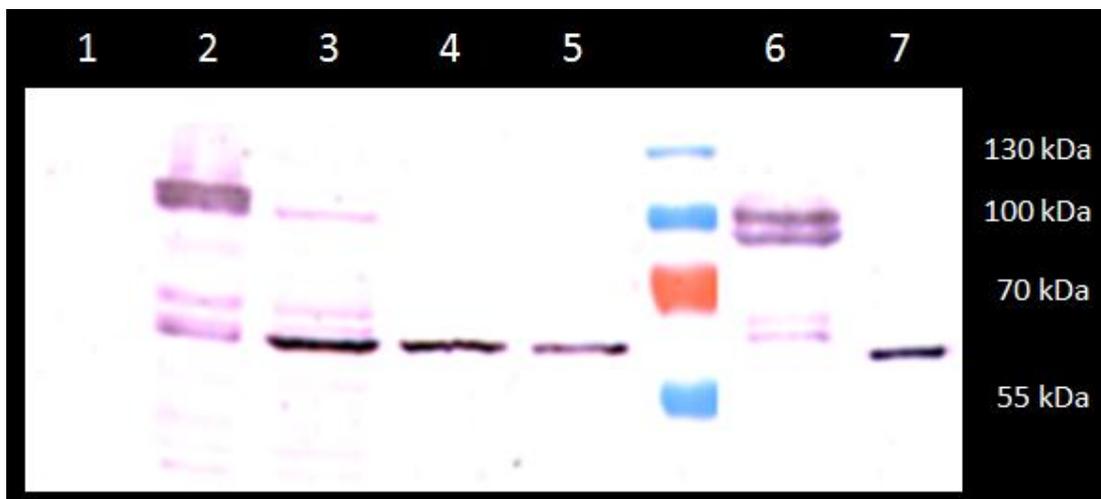


Abbildung 4: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF sowie einer Partikelreinigung und einer Polysomenreinigung in einem 12,5 % (w/v) Polyacrylamidgel, mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und mit dem Antiserum AK-P2N detektiert. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: FgPH1-GFP VF (3 Tage), Bahn 2: FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 3: FgPH1-GFP VI (6 Tage), Bahn 4: FgPH1-GFP VI (16 Tage), Bahn 5: FgPH1-GFP VI (20 Tage), Bahn 6: Polysomenreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 7: Partikelreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage)

Da das Protein P2 in isolierten Viruspartikeln nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4, Bahn 7), handelt es sich um ein Strukturprotein. Es liegt in seinem errechneten Molekulargewicht von 94 kDa sowohl in der Polysomenreinigung (Abbildung 4, Bahn 6)

als auch im Gesamtprotein von jungem Myzel (Abbildung 4, Bahn 2) vor. Über mehrere Zwischenprodukte, die sowohl im Gesamtmyzel als auch in den Polysomen zu erkennen sind (Abbildung 4, Bahn 2, 3 und 6), gelangt das Protein zu einem Molekulargewicht von etwas über 62 kDa, die es auch im Partikel (Abbildung 4, Bahn 7) aufweist. Bereits zwischen 6 und 16 Tagen ist nur das prozessierte Protein vorhanden, welches auch nach 20 Tagen (Abbildung 4, Bahn 5) noch nachweisbar ist.

Zur Detektion von Protein P3, kodiert auf der dsRNA3, wurde das Antiserum *AK-P3N* (2.1.4) verwendet. Das Proteinmuster wird in Abbildung 5 gezeigt.

Bei P3 handelt es sich, da es im isolierten Partikel nachgewiesen werden konnte (Abbildung 5, Bahn 7), ebenfalls um ein Strukturprotein, welches in seinem errechneten Molekulargewicht von 93 kDa im Gesamtprotein und der Polysomenreinigung (Abbildung 5, Bahn 1 und 6) vorliegt. Über mehrere Zwischenprodukte gelangt es zu einem Molekulargewicht von etwas weniger als 70 kDa. Bereits nach 6 Tagen, aber mehr noch nach 16 Tagen (Abbildung 5, Bahn 3 und 4), ist eine deutliche Doppelbande auf dieser Höhe zu erkennen. Auch im Partikel (Abbildung 5, Bahn 7) lässt sich diese Doppelbande finden. Nach 16 Tagen ist außerdem eine weitere Bande bei etwa 60 kDa vorhanden, allerdings nicht im Partikel (Abbildung 5, Bahn 4 und 7). Diese Bande sowie die Doppelbande sind auch nach 20 Tagen noch nachweisbar (Abbildung 5, Bahn 5).

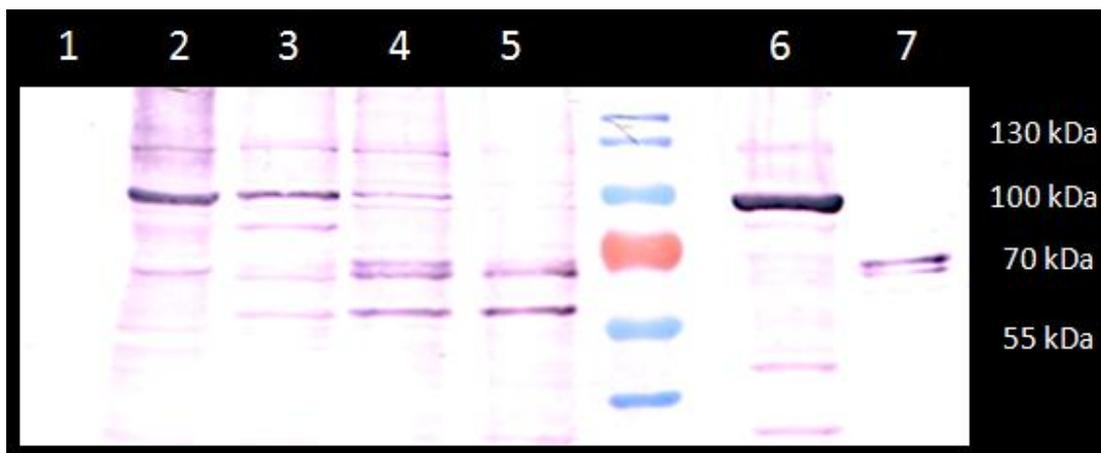


Abbildung 5: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF sowie einer Partikelreinigung und einer Polysomenreinigung in einem 12,5 % (w/v) Polyacrylamidgel, mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und mit dem Antiserum *AK-P3N* detektiert. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: FgPH1-GFP VF (3 Tage), Bahn 2: FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 3: FgPH1-GFP VI (6 Tage), Bahn 4: FgPH1-GFP VI (16 Tage), Bahn 5: FgPH1-GFP VI (20 Tage), Bahn 6: Polysomenreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 7: Partikelreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage)

Zur Detektion von Protein P4, kodiert auf der dsRNA4, wurde das Antiserum *AK-P4N* (2.1.4) verwendet. Das Proteinmuster wird in Abbildung 6 gezeigt.

Das Protein P4 konnte nicht im isolierten Partikel nachgewiesen werden (Abbildung 6, Bahn 7). Somit handelt es sich bei P4 um ein Nichtstrukturprotein. Es ist mit dem errechneten Molekulargewicht von 91 kDa sowohl im Gesamtprotein von jungem Myzel als auch in der Polysomenreinigung nachweisbar. (Abbildung 6, Bahn 2 und 6). Bereits nach 6 Tagen ist deutlich weniger des Proteins zu erkennen, während es nach 16 Tagen gar nicht mehr nachgewiesen werden kann (Abbildung 6, Bahn 3 und 4).

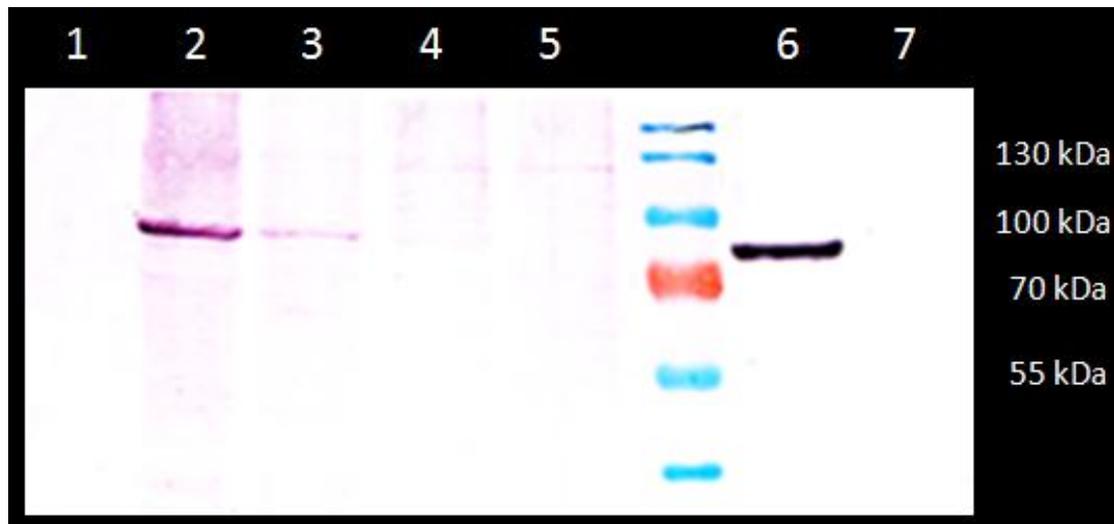


Abbildung 6: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF sowie einer Partikelreinigung und einer Polysomenreinigung in einem 12,5 % (w/v) Polyacrylamidgel, mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und mit dem Antiserum *AK-P4N* detektiert. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: FgPH1-GFP VF (3 Tage), Bahn 2: FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 3: FgPH1-GFP VI (6 Tage), Bahn 4: FgPH1-GFP VI (16 Tage), Bahn 5: FgPH1-GFP VI (20 Tage), Bahn 6: Polysomenreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 7: Partikelreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage)

Zur Detektion von Protein P5, kodiert auf der dsRNA5, wurde das Antiserum *AK-P5N* (2.1.4) verwendet. Das Proteinmuster wird in Abbildung 7 gezeigt.

Das Protein P5 konnte nicht in isolierten Partikeln nachgewiesen werden (Abbildung 7, Bahn 7). Bei P5 handelt es sich wie bei P4 um ein Nichtstrukturprotein. Erwartet wurde ein Protein mit einem aus der Sequenz abgeleiteten Molekulargewicht von 79 kDa. Auf der entsprechenden Höhe ist allerdings weder im Gesamtmyzel, noch in der Polysomenreinigung eine Bande zu erkennen (Abbildung 7, Bahn 2 und 6). Stattdessen ist eine Doppelbande bei etwas weniger als 130 kDa und eine einzelne Bande bei etwa 95 kDa zu erkennen (Abbildung 7, Bahn 2 und 6). Bereits nach 6 Tagen hat die Menge an

Protein stark abgenommen und nach 16 Tagen ist es gar nicht mehr nachweisbar (Abbildung 7, Bahn 3 und 4).

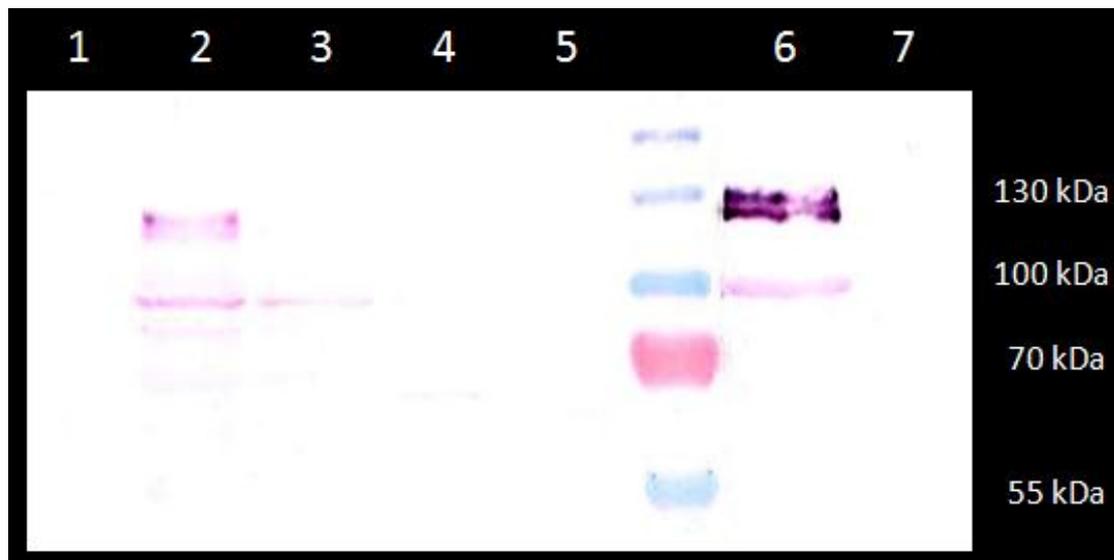


Abbildung 7: Elektrophoretische Auftrennung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI und VF sowie einer Partikelreinigung und einer Polysomenreinigung in einem 12,5 % (w/v) Polyacrylamidgel, mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und mit dem Antiserum *AK-P5N* detektiert. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: FgPH1-GFP VF (3 Tage), Bahn 2: FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 3: FgPH1-GFP VI (6 Tage), Bahn 4: FgPH1-GFP VI (16 Tage), Bahn 5: FgPH1-GFP VI (20 Tage), Bahn 6: Polysomenreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage), Bahn 7: Partikelreinigung FgPH1-GFP VI (3 Tage)

3.1.2 Nachweis von Duplikationen durch Re-Sequenzierung in drei der fünf Segmente von FgV-ch9 und Vergleich mit den Sequenzen der fünf Segmente von FgV2

Die Untersuchung des Proteins P5 in einer Zeitreihe von virusinfiziertem Myzel über 20 Tage ergab, dass keines der detektierten Proteine das berechnete Molekulargewicht von 79 kDa aufwies. Sämtliche Proteine hatten ein höheres Molekulargewicht. Auf Grund dieser Diskrepanz wurden Fragmente der viralen Segmente erneut sequenziert.

Zur Sequenzierung (2.2.2.9) wurden Fragmente der Segmente 2, 3 und 5 mittels RT-PCR (2.2.2.1) mit spezifischen Primern (2.1.2; Tabelle 8) von RNA-Extrakten (2.2.3.5) aus FgCh9 HT und FgPH1-GFP VI amplifiziert. Die Amplifikate wurden blunt end in den mit *EcoRI* geöffneten (2.2.2.2) und dephosphorylierten (2.2.2.4) Vektor pBluescript Sk- (2.1.3) transformiert (2.2.2.10).

Zur Verifizierung der Sequenzierung wurde von den klonierten Fragmenten aus pBluecript Sk- mit spezifischen Primern (2.1.2; Tabelle 8) amplifiziert (2.2.2.1). Und um zu überprüfen, ob verschiedene Sequenzen eines Segments vorliegen (Ausschluss), wurde vom RNA-Extrakt (2.2.3.5) aus FgCh9 HT (2.1.1.2) cDNA synthetisiert (2.2.3.6) und mit dC-Überhängen versehen (2.2.2.4). Von dieser cDNA wurde mit spezifischen Primern (2.1.2; Tabelle 8) amplifiziert (2.2.2.1).

Tabelle 8: Zusammenfassung der Primer, die für die Sequenzierung und Verifizierung der Sequenzen sowie dem Ausschluss von unterschiedlichen Größen eines Segments, verwendet wurden.

Segment	cDNA Sequenzierung	PCR Sequenzierung	Verifizierung	cDNA Ausschluss	PCR Ausschluss
2	RNA2_rev	RNA2_rev RNA2_fw 1	RNA2_3'_rev RNA2_3'_fw/rv	RNA2_fw 1	Poly-G RNA2_fw 2
3	RNA3_rev	RNA3_rev 1 RNA3_coding_fw 1	RNA3_rev RNA3_fw/rev	RNA3_coding_fw 1	Poly-G RNA3-coding_fw 2
5	RNA5_rev	RNA5_rev RNA5_fw	-	-	-

Die Sequenzierung der 5'-Termini aller Segmente sowie die der 3'-Termini von Segment 1 und 4 (HQ228213 und HQ228216) bestätigte die von Darissa *et al.* (2011) publizierten Sequenzen.

Die Sequenzierung des 3'-Terminus von Segment 2 (HQ228214) ergab, dass eine 81 bp Duplikation vorliegt. Die korrekte Segmentgröße beträgt somit 2931 bp (Abbildung 11, RNA 2; Anhang 1A). Die Duplikation befindet sich ausschließlich im nicht-kodierenden Bereich des Segments und hat keine Auswirkungen auf den ORF. Die Verifizierung der Duplikation zeigt eine Bande von 101 bp (Abbildung 8A, Bahn 2) welche nur amplifiziert werden kann, wenn eine Duplikation vorliegt (Abbildung 8C). Die Abwesenheit von Segmenten ohne Duplikation wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Hier zeigt sich eine Bande bei 350 bp (Abbildung 9, Bahn 1).

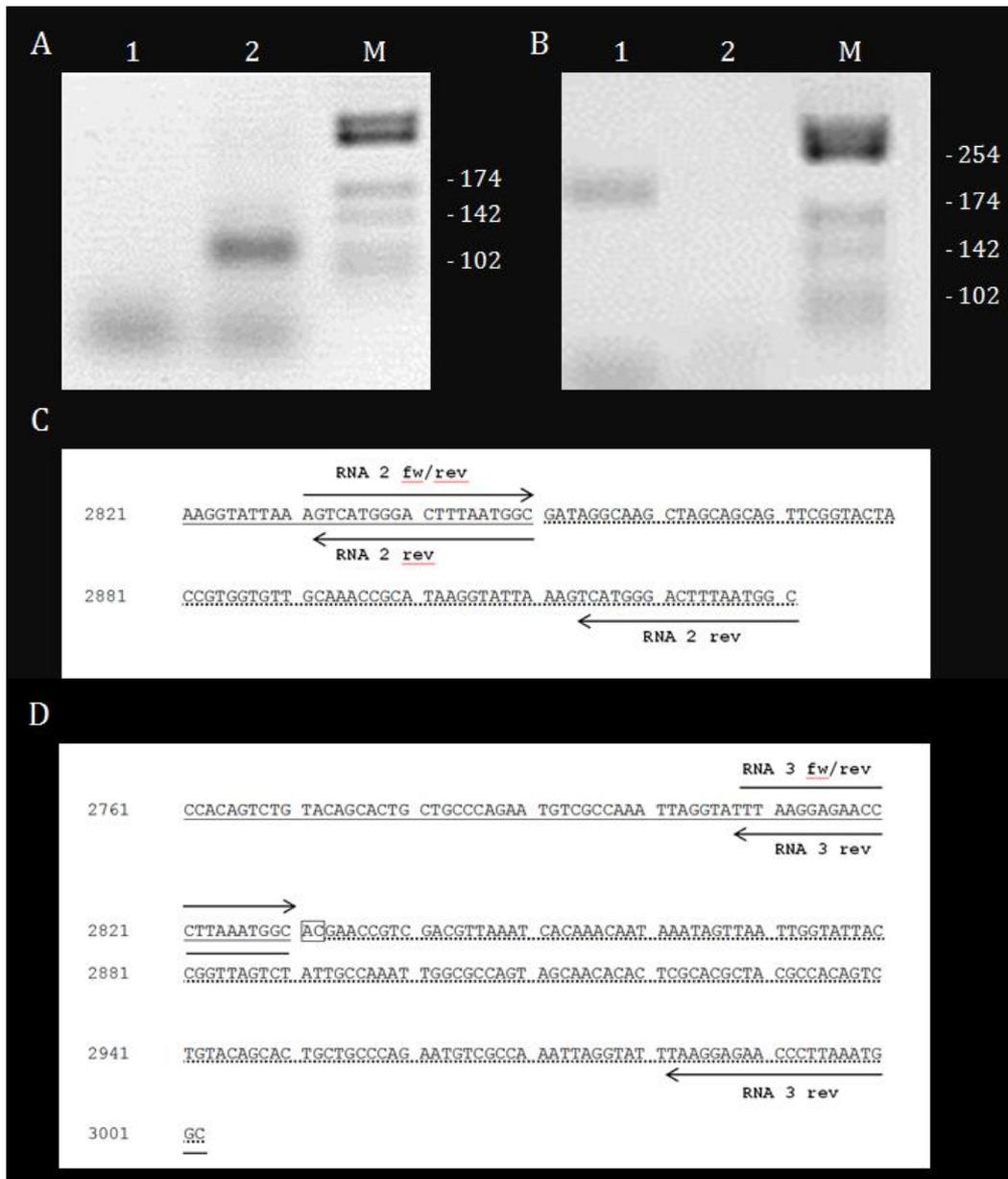


Abbildung 8: RT-PCR zur Verifizierung der Duplikationen an den 3'-Termini der Segmente 2 und 3. Es wurden Primerpaare verwendet, die nur bei Anwesenheit einer Duplikation eine Bande ergeben. Die Amplikons wurden auf einem 1,2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

A: Verifizierung der Duplikation im Segment 2 mit den Primern RNA2_rev und RNA2_fw/rev. 1: FgPH1 VF, 2: FgPH1 VI, M: pUC9, restringiert mit HaeIII

B: Verifizierung der Duplikation im Segment 3 mit den Primern RNA3_rev und RNA3_fw/rev. 1: FgPH1 VI, 2: FgPH1 VF, M: pUC9, restringiert mit HaeIII

C: Darstellung des relevanten Abschnitts der Sequenz von dsRNA2 mit den verwendeten Primern RNA2_3'_rev und RNA2_3'_fw/rev

D: Darstellung des relevanten Abschnitts der Sequenz von dsRNA3 mit den verwendeten Primern RNA3_rev und RNA3_fw/rev

Die Sequenzierung des 3'-Terminus von Segment 3 (HQ228215) ergab, dass eine 171 bp Duplikation vorliegt. Die korrekte Segmentgröße beträgt 3002 bp (Abbildung 11, RNA3; Anhang 1B). Die Duplikation ist durch zwei nicht-homologe Basenpaare separiert und beinhaltet 16 bp des ORFs, der Rest befindet sich ausschließlich im nicht-kodierenden

Bereich des Segments. Die Verifizierung zeigt eine Bande von 194 bp (Abbildung 8B, Bahn 2), welche nur amplifiziert werden kann, wenn eine Duplikation vorliegt. Die Abwesenheit von Segmenten ohne Duplikation wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Hier zeigt sich eine Bande bei 450 bp (Abbildung 9, Bahn 2).

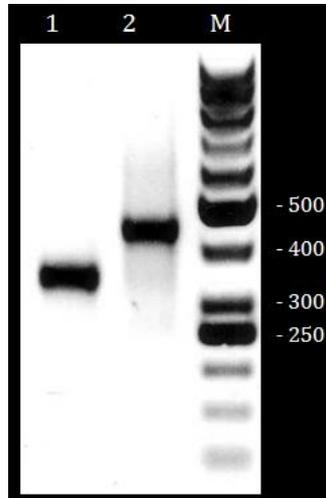


Abbildung 9: Verifizierung der Abwesenheit von Sequenzen ohne Duplikation mittels RT-PCR. Die Amplikons wurden auf einem 1,2 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

1: Verifizierung im Segment 2 mit den Primern RNA2_fw_2 und PolydG von RNA aus FgPH1 VI; 2: Verifizierung im Segment 3 mit den Primern RNA3_coding_fw_1 und PolydG von RNA aus FgPH1 VI; M: GeneRuler 50 bp DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific, USA)

Die Sequenzierung des 3'-Terminus von Segment 5 ergab, dass hier eine Duplikation im ORF des Segments vorliegt, sodass die Segmentgröße von 2423 bp auf 2928 bp steigt (Abbildung 11, RNA5; Anhang 1C). Die duplizierte Sequenz ist von jeweils sieben nicht-homologen Basenpaaren eingerahmt (Abbildung 11, RNA5). Aus der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz lässt sich ein Molekulargewicht des Proteins von 96 kDa berechnet. Dieses unterscheidet sich um 16 kDa vom ursprünglichen Protein mit einer Masse von 79 kDa. Die Duplikation auf Aminosäureebene ist in Abbildung 10 dargestellt. Bei der Betrachtung des Gesamtproteins von FgPH1-GFP VI, detektiert mit einem P5-spezifischen Antiserum, konnte unter anderem eine Bande von etwa 100 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 7).



Abbildung 10: Alignment der Aminosäure-Sequenzen des von P5 mit Duplikation (obere Reihe) und ohne Duplikation (untere Reihe). Die C₂H₂-Zinkfinger Domänen (unterstrichen) sind nummeriert (C₂H₂ 1-C₂H₂ 6). Die Domäne C₂H₂ 4 (in Klammern) ist in der nicht duplizierten Sequenz nicht komplett. Striche: homologe Basen; Punkte: nicht-homologe Basen

Bei der *in silico* Untersuchung der Sequenzen von zwei weiteren Chrysoviren, *Fusarium graminearum* virus 2 (FgV2; Yu *et al.*, 2011) und *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1* (MoCV1-A; Urayama *et al.*, 2012), konnten ebenfalls Duplikationen ermittelt werden.

Der 3'-Terminus von Segment 2 des FgV2 (HQ343296) weist eine Duplikation von 149 bp auf, die neben nicht-kodierenden Bereichen auch 20 bp des ORF und ein nicht homologes Basenpaar enthält (Abbildung 11, RNA2). Der 3'-Terminus von Segment 3 des FgV2 (HQ343297) weist eine Sequenz von 151 bp auf, die mit Ausnahme von zwei Basenpaaren identisch zum Terminus von Segment 2 des Virus ist (Abbildung 11, RNA3). Die Sequenz von Segment 5 des FgV2 (HQ434299) weist keine Duplikationen auf (Abbildung 11, RNA5).

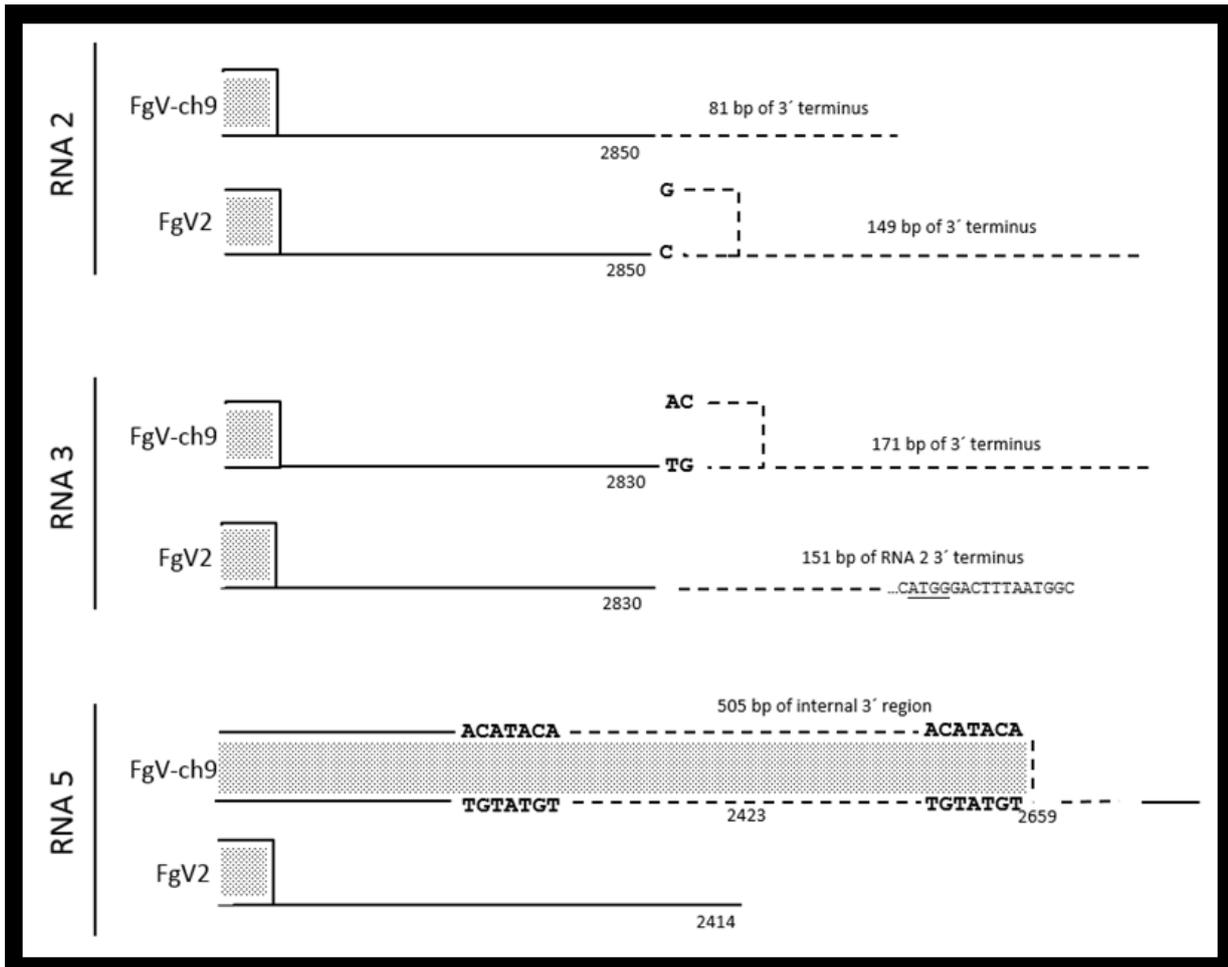


Abbildung 11: Darstellung und Vergleich der Duplikationen an den 3'-Termini von Segment 2, 3 und 5 von FgV-ch9 und FgV2. Schwarze Linie: *non-translated region*; gestrichelte Linie und Kasten: Duplikationen; gepunkteter Kasten: *open reading frame*; fettgedruckte Buchstaben: verbindende, nicht homologe Nukleotide; unterstrichene Buchstaben: nicht-homologe Nukleotide

Auch der 3'-Terminus des Segments 3 von MoCV1-A (AB560763.1) zeigt eine Duplikation von 69 bp, die zu 90 % mit der ursprünglichen Sequenz identisch ist (Abbildung 12).

```

2761   TGTGACATAA GATAAACAA AACAAAATAA TAAATAAATA AGATAAGATA AGATAAATAA
2821   GATAAATAAA TAAGTAAAT GAAGTAAAT AATAATAAAA ATATTAAAT AAAAATATTA
2881   AAATAAATA AAATAACACT GCCGTAGGGT TTGCCCAACA CTACGGCGGC GCGTTTGTG
2941   TTAGAACTGG GACTCTAACA AGTGACGAAC TACGGATGAA GTAAATGAAT CAAGGTAGAG
3001   TGAACACTGC CGTAGGGTTT ACCCAACACT GCGGCGGTGC GCTTCTTGT AGAACTGGG
3061   TTCTAACAAAG TACC

```

Abbildung 12: Duplizierte Sequenz (rot und grün) in Segment 3 von *Magnaporthe oryzae* virus 1 (MoCV1-A; AB560763.1)

3.2 Klonierungs- und Transformationsstrategien

Für die Expression von viralen Proteinen in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* sowie für Funktionstests sollten Vektoren zur Transformation dieser Organismen erstellt werden. Deren Klonierungs- sowie Transformationsstrategien sind in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

3.2.1 Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Expression in *Escherichia coli*

3.2.1.1 Integration von ORF P1 in *E. coli*-Expressionsvektoren

Das Plasmid *pET[His+S+P1_ATG+His]* (2.1.3) stammt von S. Götsch (Masterarbeit, 2015). Es verfügt über einen His-Tag am 3'-Ende des ORFs P1 von Segment 1. Zur Expression wurde es in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10).

Für die Integration des ORF P1 in weitere Vektoren wurde die gesamte Expressionskassette aus *pET[His+S+P1_ATG+His]* mit den Primern *pET_hin* und *pET_rück* (2.1.2) amplifiziert (2.2.2.1). Das 3643 bp große Fragment wurde gereinigt (2.2.2.5) und *pET_hin-P1-pET_rück* genannt.

3.2.1.2 Integration von ORF P2 in *E. coli*-Expressionsvektoren

Mittels Amplifikation (2.2.2.1) aus *21FullRe1* (2.1.3) mit den spezifischen Primern CB5 und CB6 (2.1.2) wurden dem ORF P2 von Segment 2 im Bereich des Start- und Stoppcodons die Erkennungsstellen *Bam*HI und *Hind*III hinzugefügt. Nach der Reinigung (2.2.2.5) des 2652 bp großen Amplifikats wurde dieses in den Vektor *pBluescript Sk-T* (2.1.3) ligiert (2.2.2.7) und anschließend in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Die Kolonien wurden mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern T7 und T3 (2.1.2) getestet. Positive Kolonien wiesen ein Amplifikat von 2820 bp auf und wurden üN bei 37° C in LB-Amp-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid *Sk-[P2]* (Anhang 2A) isoliert (2.2.2.8).

Das Plasmid *Sk-[P2]* wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III restringiert (2.2.2.2). Das Fragment *Bam*HI-P2-*Hind*III mit einer Größe von 2646 bp wurde über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5).

Der Vektor pET-30a (2.1.3) wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III restringiert (2.2.2.2), dephosphoryliert (2.2.2.4), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5). Der so vorbereitete Vektor wurde mit dem Fragment *Bam*HI-P2-*Hind*III ligiert und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Mittels Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und 24upR (2.1.2) wurden die Kolonien getestet. Positive Kolonien zeigten ein Amplifikat mit einer Größe von 215 bp und wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET*-[P2] (Anhang 2C) isoliert (2.2.2.8).

Zur Expression wurde das Plasmid *pET*-[P2] in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Bei Expression wird der ORF P2 aus *pET*-[P2] N-terminal von einem His-Tag und einem S-Tag sowie C-terminal von einem His-Tag flankiert.

Für die Integration von P2 in weitere Vektoren wurde die gesamte Expressionskassette aus *pET*-[P2] umgesetzt. Dazu wurden in einer PCR (2.2.2.1) im 5'- und 3'-Bereich der Kassette *Sca*I-Schnittstellen mit den Primern pET_hin und pET_rück (2.1.2) eingefügt. Das resultierende 2872 bp große Fragment wurde gereinigt (2.2.2.5) und *pET_hin*-P2-*pET_rück* genannt.

Das Fragment *pET_hin*-P2-*pET_rück* wurde in den Vektor pET-30a (2.1.3) zwischenkloniert. Dazu wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym *Xba*I linearisiert (2.2.2.2), die Überhänge aufgefüllt (2.2.2.4) und das Fragment gereinigt (2.2.2.5). Nach der Ligation (2.2.2.7) mit dem Fragment *pET_hin*-P2-*pET_rück*, folgte eine Transformation (2.2.2.10) in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1). Die Kolonien wurden mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und 24upR (2.1.2) auf Einbau in 5'-3' Richtung überprüft. Aufgrund der doppelten Bindungsstelle für den Primer pET hin wiesen positive Kolonien zwei Amplifikate von 209 bp und 429 bp auf. Diese wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET*-*pET*-[P2] (Anhang 2D) isoliert (2.2.2.8).

Zur Kontrolle der korrekten Sequenz wurde das Konstrukt *pET*-*pET*-[P2] in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10) und exprimiert (2.2.3.1). Die resultierenden Proteine wurden mittels Western Blot (2.2.3.3) auf eine Membran übertragen und mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* (2.1.4) detektiert (2.2.3.3). Alle Klone zeigten eine Bande bei 102 kDa.

Für weitere Klonierungen wurde aus dem Konstrukt *pET-pET-[P2]* mit dem Restriktionsenzym *ScaI* das Fragment *ScaI-pET-P2-ScaI* mit einer Größe von 2680 bp restringiert (2.2.2.2), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5).

3.2.1.3 Integration von ORF P3 in *E. coli*-Expressionsvektoren

Mit den Primern P3_BamHI und P3_HindIII (2.1.2) wurde mittels PCR (2.2.2.1) der ORF P3 aus dem Segment 3 vom Konstrukt *P16 3116Full* (Darissa, 2011; 2.1.3) amplifiziert. Das 2590 bp große Amplifikat wurde gereinigt (2.2.2.5), mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *Sall* restringiert (2.2.2.2), erneut gereinigt (2.2.2.5) und *BamHI-P3-Sall* benannt. Die Schnittstelle *Sall* befindet sich im ORF von P3 unmittelbar vor dem Stopp-Kodon, sodass durch ihre Verwendung dieses entfernt werden konnte.

Der Vektor pQE-32 (2.1.3) wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *Sall* restringiert (2.2.2.2), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5). In diesen wurde das Fragment *BamHI-P3-Sall* ligiert (2.2.2.7) und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Die Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern pQE_hin und P3_NTR_5'_R (2.1.2) getestet. Positive Kolonien mit einem Amplikon von 649 bp wurden üN bei 37° C in LB-Amp-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pQE-[P3]* (Anhang 2B) isoliert (2.2.2.8).

Aus dem Plasmid *pQE-[P3]* wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* (aus dem pQE-Vektor) das 2580 bp große Fragment *BamHI-P3-HindIII* ausgeschnitten (2.2.2.2) und gereinigt (2.2.2.5).

Der Vektor pET-30a (2.1.3) wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *HindIII* geöffnet (2.2.2.2), dephosphoryliert (2.2.2.4), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5). Das Fragment *BamHI-P3-HindIII* wurde in den so vorbereiteten Vektor ligiert (2.2.2.7) und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Für die Kolonie-PCR (2.2.2.1) wurden die Primer pET_hin und P3_NTR_5'_R (2.1.2) verwendet. Positive Kolonien mit einem Amplikon von 581 bp wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-[P3]* (Anhang 2C) isoliert (2.2.2.8).

Zur Expression wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Nach Expression verfügt das resultierende Protein P3 über einen His-Tag und einen S-Tag am N-Terminus sowie einen His-Tag am C-Terminus.

Für die Integration von P3 in weitere Vektoren wurden der Expressionskassette aus *pET-[P3]* in einer PCR (2.2.2.1) mit den Primern *pET_hin* und *pET_rück* (2.1.2) im 5'- und 3'-Bereich *ScaI*-Schnittstellen eingefügt. Das Fragment wurde gereinigt (2.2.2.5) und *pET_hin-P3-pET_rück* genannt.

Das Fragment *pET_hin-P3-pET_rück* wurde in den Vektor *pET-30a* (2.1.3) zwischenkloniert. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *XhoI* restringiert (2.2.2.2) die Überhänge aufgefüllt (2.2.2.4) und der Vektor gereinigt (2.2.2.5). Die Ligation (2.2.2.7) des so vorbereiteten Vektors mit dem Fragment *pET_hin-P3-pET_rück* wurde in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Die Kolonien wurden mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern *pET_hin* und *P3_NTR_5'_R* (2.1.2) überprüft. Aufgrund der doppelten Bindungsstelle für den Primer *pET_hin* wiesen positive Kolonien zwei Amplifikate von 578 bp und 747 bp auf und wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-pET-[P3]* (Anhang 2D) isoliert (2.2.2.8).

Zur Kontrolle der korrekten Sequenz wurde das Konstrukt *pET-pET-[P3]* in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10) und in diesem exprimiert (2.2.3.1). Die Proteine wurden mittels Western Blot (2.2.3.3) auf eine Membran übertragen und mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* (2.1.4) detektiert (2.2.3.3). Alle Klone zeigten eine Bande mit einer erwarteten Größe von etwa 101 kDa.

Für die weiteren Klonierungen wurde aus dem Konstrukt *pET-pET-[P3]* mit dem Restriktionsenzym *ScaI* das Fragment *ScaI-pET-P3-ScaI* mit einer Größe von 2794 bp restringiert (2.2.2.2), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5).

3.2.1.4 Integration von ORF P4 in *E. coli*-Expressionsvektoren

Mit den Primern *P4_XhoI* und *P4_NcoI* (2.1.2) wurde der ORF P4 von Segment 4 aus dem Konstrukt *Fcontig* (Darissa, 2011; 2.1.3) mittels PCR (2.2.2.1) amplifiziert. Das 2518 bp große Amplifikat wurde gereinigt (2.2.2.5) und mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und

NcoI restringiert (2.2.2.2). Das Fragment wurde gereinigt (2.2.2.5) und *NcoI-P4-XhoI* genannt.

Das Plasmid pET-30a (2.1.3) wurde mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XhoI* restringiert (2.2.2.2), dephosphoryliert (2.2.2.4), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5). Der so vorbereitete Vektor wurde mit dem Fragment *NcoI-P4-XhoI* ligiert (2.2.2.7) und anschließend in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und siRNA_P4_rev (2.1.2) bestimmt und wiesen ein Amplifikat mit einer Größe von 558 bp auf. Positive Kolonien wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-[P4]* (Anhang 2C) isoliert (2.2.2.8).

Zur Expression wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Nach Expression verfügt das resultierende Protein P4 über einen His-Tag und einen S-Tag am N-Terminus sowie einen His-Tag am C-Terminus.

Für die Integration von P4 in weitere Vektoren wurde die gesamte Expressionskassette aus *pET-[P4]* umgesetzt. Dazu wurden in einer PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und pET_rück (2.1.2) im 5'- und 3'-Bereich der Kassette *ScaI*-Schnittstellen eingefügt. Das 2698 bp große Fragment wurde gereinigt (2.2.2.5) und *pET_hin-P4-pET_rück* genannt.

Das Fragment *pET_hin-P4-pET_rück* wurde in den Vektor pET-30a (2.1.3) zwischenkloniert. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *XhoI* restringiert (2.2.2.2) und gereinigt (2.2.2.5). Nach der Ligation (2.2.2.7) mit dem Fragment *pET_hin-P4-pET_rück* wurde in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Die Kolonien wurden mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und siRNA_P4_rev (2.1.2) überprüft. Aufgrund der doppelten Bindungsstelle von pET_hin wiesen positive Kolonien zwei Amplifikate von 558 bp und 724 bp auf. Diese wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-pET-[P4]* (Anhang 2D) isoliert (2.2.2.8).

Zur Kontrolle der korrekten Sequenz wurde das Konstrukt *pET-pET-[P4]* in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10) und in diesem exprimiert (2.2.3.1). Die Proteine wurden mittels Western Blot (2.2.3.3) auf eine Membran übertragen und

mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* (2.1.4) detektiert (2.2.3.3). Alle Klone zeigten eine Bande mit einer erwarteten Größe von etwa 97 kDa.

Für weitere Klonierungen wurde aus dem Konstrukt *pET-pET-[P4]* mit dem Restriktionsenzym *ScaI* das Fragment *ScaI-pET-P4-ScaI* mit einer Größe von 2686 bp restringiert (2.2.2.2), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5).

3.2.1.5 Integration von ORF P5 in *E. coli*-Expressionsvektoren

Aus infiziertem Myzel wurde RNA isoliert (2.2.3.5) und mit dem Primer 1010R (2.1.2) cDNA synthetisiert (2.2.3.6). Von dieser cDNA wurde mit den Primern 1010R und P5_SmaI (2.1.2) mittels PCR (2.2.2.1) amplifiziert. Das 2826 bp große Amplifikat wurde gereinigt (2.2.2.5) und in den Vektor pBluescript Sk-T ligiert (2.2.2.7). Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern T7 und T3 (2.1.2) bestimmt und wiesen ein Amplifikat mit einer Größe von 2909 bp auf. Sie wurden üN bei 37° C in LB-Amp-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *Sk-[P5]* (Anhang 2A) isoliert (2.2.2.8).

Mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *HindIII* wurde der ORF P5 aus *Sk-[P5]* restringiert (2.2.2.2) und gereinigt. Das Fragment war 2767 bp groß und wurde *SmaI-P5-HindIII* genannt.

Der Vektor pET-30a (2.1.3) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *HindIII* restringiert (2.2.2.2), dephosphoryliert (2.2.2.4) und gereinigt (2.2.2.5). Anschließend wurde dieser mit dem Fragment *SmaI-P5-HindIII* ligiert (2.2.2.7) und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und pET_rück (2.1.2) bestimmt und wiesen ein Amplifikat mit einer Größe von 2989 bp auf. Sie wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-[P5]* (Anhang 2C) isoliert (2.2.2.8).

Zur Expression wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Nach Expression verfügt das resultierende Protein P5 über einen His-Tag und einen S-Tag am N-Terminus.

Für die Integration von P5 in weitere Vektoren wurde die gesamte Expressionskassette aus *pET-[P5]* mit den Primern pET_hin und pET_rück (2.1.2) amplifiziert (2.2.2.1). Das 2989 bp große Fragment wurde gereinigt (2.2.2.5) und *pET_hin-P5-pET_rück* genannt.

3.2.1.6 Integration von eGFP in *pET-[P3]* und *pET-[P4]*

Für die Erstellung eines P3eGFP-Fusionskonstrukts wurde der ORF von eGFP nach dem ORF von *pET-[P3]* (3.2.1.3) integriert. Dazu wurde aus dem Konstrukt *pBluescript Sk-T+eGFP* (Götsch, 2015; 2.1.3) mittels PCR (2.2.2.1) der ORF von eGFP mit den Primern eGFP_XhoI_for und eGFP_XhoI_rev (2.1.2) amplifiziert und mit dem Restriktionsenzym *XhoI* restringiert (2.2.2.2). Das gereinigte (2.2.2.5) Amplifikat wurde in den mit *XhoI* geöffneten (2.2.2.2) *pET-[P3]* ligiert (2.2.2.7) und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern si_eGFP_for und pET_hin (2.1.2) bestimmt und wiesen ein Amplifikat mit einer Größe von 190 bp auf. Sie wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-[P3eGFP-C]* (Anhang 2I) isoliert (2.2.2.8). Zur Expression wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Nach Expression verfügt das resultierende Protein P3eGFP-C über einen His-Tag und einen S-Tag am N-Terminus sowie einen His-Tag am C-Terminus.

Für die Integration von P3eGFP-C in weitere Vektoren wurde die gesamte Expressionskassette aus *pET-[P3eGFP-C]* umgesetzt. Mit einer PCR (2.2.2.1) mit den Primern pET_hin und pET_rück (2.1.2) wurde das Fragment *pET_hin-P3eGFP-C-pET_rück* mit einer Größe von 3526 bp amplifiziert und gereinigt (2.2.2.5)

Für die Erstellung eines P4eGFP-Fusionskonstrukts wurde der ORF von eGFP vor dem ORF von *pET-[P4]* (3.2.1.4) integriert. Dazu wurde aus dem Konstrukt *pBluescript Sk-T+eGFP* (Götsch, 2015; 2.1.3) mittels PCR (2.2.2.1) der ORF von eGFP mit den Primern eGFP_BstBI und eGFP_BglII (2.1.2) amplifiziert gereinigt (2.2.2.5) und in den *pBluescript Sk-T* (2.1.3) ligiert (2.2.2.7). Das Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern T3 und T7 (2.1.2) bestimmt und wiesen ein Amplifikat mit einer Größe von 894 bp auf. Sie wurden üN bei 37° C in LB-Amp-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd

vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pBluescript Sk-[BstBI-eGFP-BglIII]* isoliert (2.2.2.8).

Das Konstrukt *pBluescript Sk-[BstBI-eGFP-BglIII]* wurde mit den Restriktionsenzymen *BstBI* und *BglIII* restringiert (2.2.2.2), über ein Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5). Das Fragment hatte eine Größe von 720 bp und wurde *BstBI-eGFP-BglIII* genannt.

Das Konstrukt *pET-[P4]* (3.2.1.4) wurde mit den Restriktionsenzymen *BstBI* und *BglIII* restringiert (2.2.2.2), dephosphoryliert (2.2.2.4) und gereinigt (2.2.2.5). Anschließend wurde dieses mit dem Fragment *BstBI-eGFP-BglIII* ligiert (2.2.2.7) und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Positive Kolonien wurden durch eine Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern *pET_rück* und *si_eGFP_rev* (2.1.2) bestimmt und wiesen ein Amplifikat mit einer Größe von 673 bp auf. Sie wurden üN bei 37° C in LB-Kana-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt und aus den Bakterien wurde das Plasmid *pET-[P4eGFP-N]* (Anhang 2) isoliert (2.2.2.8).

Zur Expression wurde das Konstrukt in den *E. coli*-Stamm BL21 Gold (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Nach Expression verfügt das resultierende Protein P4eGFP-N über einen His-Tag und einen S-Tag am N-Terminus sowie einen His-Tag am C-Terminus.

Für die Integration von P4eGFP-N in weitere Vektoren wurde die gesamte Expressionskassette aus *pET-[P4eGFP-N]* umgesetzt. Das Fragment *pET_hin-P4eGFP-N-pET_rück* mit einer Größe von 1233 bp wurde mit den Primern *pET_hin* und *pET_rück* (2.1.2) amplifiziert (2.2.2.1) und gereinigt (2.2.2.5).

3.2.2 Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Um Fragmente in den Expressionsvektor *pYES-A* (2.1.3) zu integrieren wurde dieser mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* restringiert (2.2.2.2) und die Überhänge aufgefüllt (2.2.2.4) und dephosphoryliert (2.2.2.4). Die 6105 bp große Bande wurde über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5).

In diesen so vorbereiteten Vektor wurden diverse Fragmente (Tabelle 9) ligiert (2.2.2.7). Es folgte eine Transformation (2.2.2.10) in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1). Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.2.1) überprüft. Positive Kolonien wurden üN

bei 37° C in LB-Amp-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid isoliert (2.2.2.8) und zur Expression in den *S. cerevisiae*-Stamm INV SC1 (2.1.1.2) transformiert (2.2.2.12). Die Bezeichnungen der Inserts (3.2.1), die in der Kolonie-PCR verwendeten Primer (2.1.2) und die daraus resultierenden Amplifikatsgrößen sowie die Bezeichnung der resultierenden Konstrukte (Anhang 2G) sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Zusammenfassung der zur Erstellung von *S. cerevisiae*-Expressionsklonen verwendeten Inserts (3.2.1.1-3.2.1.5), die für die Kolonie-PCR benötigten Primer (2.1.2) und die Größen der resultierenden Amplifikate sowie die Benennung der Expressionskonstrukte (Anhang 2G)

Insert	Primer	berechnete Amplifikatsgröße	resultierendes Konstrukt
<i>pET_hin-P1-pET_rück</i>	T7/ 600rev	1176 bp	<i>pYES-[P1]</i>
<i>Scal-pET-P2-Scal</i>	T7/rt21R	1404 bp	<i>pYES-[P2]</i>
<i>Scal-pET-P3-Scal</i>	T7/3116_upR	233 bp	<i>pYES-[P3]</i>
<i>Scal-pET-P3-Scal</i>	T7/3116_RR	1119 bp	<i>pYES-[P3eGFP-C]</i>
<i>pET_hin-P3eGFPC-pET_rück</i>	T7/siRNA_P4_rev	589 bp	<i>pYES-[P4]</i>
<i>Scal-pET-P4-Scal</i>	T7/si_eGFP_rev	704 bp	<i>pYES-[P4eGFP-N]</i>
<i>pET_hin-P4eGFPN-pET_rück</i>	T7/zinkR2	920 bp	<i>pYES-[P5]</i>

Neben den oben beschriebenen Konstrukten wurde pYES-A ohne Insert (2.1.3) in den *S. cerevisiae*-Stamm INV SC1 (2.1.1.2) transformiert (2.2.2.12).

3.2.3 Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Expression in *Fusarium graminearum*

Um Fragmente in den Expressionsvektoren pSilent-AlcA bzw. pSilent-ΔGluA (2.1.3) zu integrieren, wurden diese mit Restriktionsenzymen restringiert (2.2.2.2), anschließend dephosphoryliert (2.2.2.4), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5). Für den Vektor pSilent-AlcA wurden die Enzyme *Sna*BI und *Stu*I verwendet, während pSilent-ΔGluA mit *Sma*I linearisiert wurde. Das restringierte pSilent-AlcA wies eine Größe von 5742 bp auf, das linearisierte pSilent-ΔGluA eine Größe von 7887 bp.

In diese so vorbereiteten Vektoren wurden diverse Fragmente (Tabelle 10) ligiert (2.2.2.7) und in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.10). Die

Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.2.1) überprüft. Positive Kolonien wurden in LB bei 37° C in LB-Amp-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid isoliert (2.2.2.8), linearisiert (2.2.2.2), gefällt (2.2.2.6) und zur Expression in den *F. graminearum*-Stamm FgPH1 (2.1.1.2), transformiert (2.2.2.13). Nur *pSilent-ΔGluA-P3* wurde in dem Stamm Fg8.1 (2.1.1.2) transformiert. Die Insert-Fragmente (3.2.1), die in der Kolonie-PCR verwendeten Primer (2.1.2) und die daraus resultierenden Amplifikatsgrößen sowie die Bezeichnung der resultierenden Konstrukte (Anhang 2 E und F) und das zur Linearisierung verwendete Restriktionsenzym wurden in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der zur Erstellung von *F. graminearum*-Expressionsklonen benötigten Inserts (3.2.1.1-3.2.1.6), die für die Kolonie-PCR benötigten Primer (2.1.2) und die Größen der resultierenden Amplifikate sowie die Benennung der Expressionskonstrukte (Anhang 2 E und F) und die zur Linearisierung (2.2.2.2) verwendeten Restriktionsenzyme

Insert	Primer	berechnete Amplifikatsgröße	resultierendes Konstrukt	Enzym
<i>pET_hin-P1-pET_rück</i>	AlcA-SpeI/600rev	1407 bp	<i>pSilent-AlcA-[P1]</i>	<i>SpeI</i>
<i>Scal-pET-P2-Scal</i>	21DR/21DI AlcA-SpeI/ rt21R	531 bp 1632 bp	<i>pSilent-AlcA-[P2]</i>	<i>SpeI</i>
<i>Scal-pET-P3-Scal</i>	AlcA-SpeI/3116_upR	464 bp	<i>pSilent-AlcA-[P3]</i>	<i>SpeI</i>
<i>Scal-pET-P3-Scal</i>	GluA_Mfe/3116_upR	621 bp	<i>pSilent-ΔGluA-[P3]</i>	<i>AhdI</i>
<i>pET_hin-P3eGFP-C-pET_rück</i>	AlcA-SpeI/3116_RR	1350 bp	<i>pSilent-AlcA-[P3eGFP-C]</i>	<i>SpeI</i>
<i>Scal-pET-P4-Scal</i>	AlcA-SpeI/siRNA_P4_rev	817 bp	<i>pSilent-AlcA-[P4]</i>	<i>SpeI</i>
<i>pET_hin-P4eGFP-N-pET_rück</i>	AlcA-SpeI/si_eGFP_rev	935 bp	<i>pSilent-AlcA-[P4eGFP-N]</i>	<i>SpeI</i>
<i>pET_hin-P5-pET_hin</i>	GluA_Mfe /zinkR2	1308 bp	<i>pSilent-AlcA-[P5]</i>	<i>AhdI</i>

3.2.4 Erstellung und Transformation von Konstrukten für die Analyse des *gene silencing* Suppressors P5 aus FgV-ch9

3.2.4.1 Erstellung und Transformation von Konstrukten in *Agrobacterium tumefaciens* zur Anwendung in einem *Transient Expression Assay*

Um Fragmente in den Infiltrationsvektor p7 35S (2.1.3) zu integrieren, wurde dieser mit dem Restriktionsenzym *SmaI* linearisiert (2.2.2.2) und ein dTTP wurde angehängt

(2.2.2.4). Anschließend wurde der Vektor dephosphoryliert (2.2.2.4), über ein präparatives Agarosegel (2.2.2.3) isoliert und gereinigt (2.2.2.5).

In diesen so vorbereiteten Vektor wurden diverse Fragmente (Tabelle 11) ligiert (2.2.2.7), welchen zuvor ein dATP angehängt (2.2.2.4) wurde. Es folgte eine Transformation (2.2.2.10) in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1). Die Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.2.1) überprüft. Positive Kolonien wurden üN bei 37° C in LB-Rif/Gen-Flüssigmedium (2.1.5) schüttelnd vermehrt. Aus den Bakterien wurde das Plasmid isoliert (2.2.2.8) und zur Expression in den *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.11). Die Insert-Fragmente (3.2.1), die in der Kolonie-PCR verwendeten Primer (2.1.2) und die daraus resultierenden Amplifikatsgrößen (zwei Banden aufgrund der doppelten Bindungsstellen von pET rück) sowie die Bezeichnung der resultierenden Konstrukte (Anhang 2H) wurden in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der zur Erstellung von *A. tumefaciens*-Infiltrationsklonen benötigten Inserts (3.2.1.1-3.2.1.5), die für die Kolonie-PCR benötigten Primer (2.1.2) und die Größen der resultierenden Amplifikate sowie die Benennung der Expressionskonstrukte (Anhang 2H)

Insert	Primer	Amplifikat	Konstrukt
<i>pET_hin-P1-pET_rück</i>	35S_for/600rev	1582 bp 2843 bp	<i>p7 35S-[P1]</i>
<i>Scal-pET-P2-Scal</i>	35S_for/rt21R	1806 bp 3067 bp	<i>p7 35S-[P2]</i>
<i>Scal-pET-P3-Scal</i>	35S_for/14MF	1989 bp 3254 bp	<i>p7 35S-[P3]</i>
<i>Scal-pET-P4-Scal</i>	35S_for/siRNA_P4_rev	1122 bp 2253 bp	<i>p7 35S-[P4]</i>
<i>pET_hin-P5-pET_rück</i>	35S_for/rtzinkR	1234 bp 2495 bp	<i>p7 35S-[P5]</i>

Neben den oben beschriebenen Konstrukten wurde p7 35S ohne Insert, pBIN-[eGFP] und pBIN-[P19] (2.1.3) in den *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 (2.1.1.1) transformiert (2.2.2.12).

3.2.4.2 Erstellung und Transformation von Konstrukten in *Fusarium graminearum* zur Anwendung in einem Fluoreszenz-Assay

Zur Verminderung der Expression des konstitutiv exprimierten GFPs wurde das silencing-Konstrukt *pSilent Dual2-[eGFP]* (2.1.3), linearisiert mit dem Restriktionsenzym *ApaI* (2.2.2.2) und mittels Fällung gereinigt (2.2.2.6), in den Stamm in FgPH1-eGFP

(2.1.1.2) transformiert (2.2.2.13). Drei positive Transformanden wurden auf CM-Gen (2.1.5) selektiert und FgPH1-SilentGFP genannt. In diesen ist die Expression von eGFP durch *gene silencing* vermindert. Es wurden Konidien angezogen (2.2.1.3) und vereinzelt (2.2.4.5). Die Mutante mit der geringsten GFP-Fluoreszenz wurde weiter verwendet.

Als Negativkontrolle wurde das Konstrukt *pFg-[bPAC]* (2.1.3) mit dem Restriktionsenzym *AhdI* (2.2.2.2) linearisiert, gefällt (2.2.2.6) und in den Stamm FgPH1-SilentGFP transformiert (2.2.2.13). Das Protein bPAC hat keine *gene silencing* Funktion und ist daher als Negativkontrolle geeignet. Der resultierende Stamm wurde auf CM-NAT (2.1.5) selektiert und FgPH1-SilentGFP-bPAC genannt.

Zur Überprüfung des ORFs von dsRNA 5 auf *gene silencing* Suppressor Aktivität wurde in das Konstrukt *pSilent-ΔGluA-[P5]* (3.2.3) zunächst eine Nourseothricinrestistenz (NAT) eingebaut. Dazu wurde die NAT-Kassette mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *EcoRI* aus dem Konstrukt *pNR1* (2.1.3) ausgeschnitten (2.2.2.2), gereinigt (2.2.2.5) und in den ebenfalls mit *XbaI* und *EcoRI* geöffneten (2.2.2.2), dephosphorylierten (2.2.2.4) und gereinigten (2.2.2.5) Vektor pCR2.1 (2.1.3) ligiert (2.2.2.7). Es folgte eine Transformation (2.2.2.10) in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1). Positive Transformanden wurden über Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern NAT_for und NAT_rev (2.1.2) identifiziert und wiesen eine Amplifikatsgröße von 441 bp auf. Das Konstrukt wurde *pCR2.1-NAT* genannt.

Mit den Primern M13_rev und T7 (2.1.2) wurde die NAT-Kassette aus dem Konstrukt *pCR2.1-NAT* amplifiziert (2.2.2.1) und gereinigt (2.2.2.5). Das Amplifikat hatte eine Größe von 1539 bp. Das Konstrukt *pSilent-ΔGluA-[P5]* (3.2.3) wurde mit *ApaI* linearisiert (2.2.2.2) und die Überhänge wurden entfernt (2.2.2.4). Danach wurde das Fragment dephosphoryliert (2.2.2.4) und gereinigt (2.2.2.5). Eine Ligation (2.2.2.7) und anschließende Transformation (2.2.2.10) in den *E. coli*-Stamm NM522 (2.1.1.1) folgte. Positive Transformanden wurden mittels Kolonie-PCR (2.2.2.1) mit den Primern NAT_for und P5_Stopp (2.1.2) ermittelt und wiesen eine Amplifikatsgröße von 1149 bp auf. Das Konstrukt wurde *pSilent-ΔGluA-[P5]-NAT* genannt (Anhang 2K).

Das Konstrukt *pSilent-ΔGluA-[P5]-NAT* wurde mit dem Restriktionsenzym *AhdI* linearisiert (2.2.2.2), gefällt (2.2.2.6) und in den Stamm FgPH1-SilentGFP transformiert

(2.2.2.13). Die resultierenden fünf Transformanden wurde FgPH1-SilentGFP-P5 genannt.

3.3 Analyse der Integration, Transkription und Translation der ORFs von FgV-ch9 in den Transformanden von *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Fusarium graminearum*

Nach der Transformation (3.2.3) der ORFs von FgV-ch9 in den Fusarium-Stamm FgPH1 bzw. Fg8.1 wurde die Integration der Konstrukte mittels PCR (2.2.2.1) überprüft und die Anzahl der Integrationen mittels Southern Blot (2.2.3.9) bestimmt. Die Transkription wurde mittels RT-PCR (2.2.2.1) nachgewiesen und die Expression der Proteine in einem Western Blot (2.2.3.3) analysiert.

3.3.1 Nachweis der Integration und Transkription der OFRs aus FgV-ch9 in *Fusarium graminearum*

Zum Nachweis der Integration der ORFs von FgV-ch9 in dem Fusarium-Stamm FgPH1 bzw. Fg8.1 (2.1.1.2) wurde zunächst aus jeweils 10 Transformanden gDNA isoliert (2.2.3.8) und eine PCR (2.2.2.1) mit spezifischen Primern (2.1.2) durchgeführt. Mit einem Southern Blot (2.2.3.9) mit spezifischen Sonden wurde die Anzahl der Integrationen ermittelt.

Die Transkription wurde durch eine RT-PCR nachgewiesen. Dazu wurde aus je vier Transformanden, in denen die Integration nachgewiesen wurde, RNA extrahiert (2.2.3.5), auf eine einheitliche Menge eingestellt und mit einem Poly-dT-Primer (2.1.2) cDNA synthetisiert (2.2.3.6). Es folgte eine PCR (2.2.2.1) mit spezifischen Primern (2.1.2).

Die Abwesenheit von DNA wurde mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern GScreen_fw und GScreen_rev (2.1.2) überprüft. Diese binden auf der Sequenz der kleinen ribosomalen Untereinheit von *F. graminearum* (FGSG_00845) und sind Intron-überspannend entworfen worden, sodass bei einem gDNA-Template eine Bande bei 772 bp und bei einem cDNA-Template eine Bande bei 495 bp erwartet wird. Es konnte für jede Mutante eine Bande mit dieser Größe nachgewiesen werden (Abbildung 15A-E, K).

Für den Integrationsnachweis des ORF P1 in FgPH1 wurde mit einer PCR (2.2.2.1) mit den Primern 4for4 und rtRDRP_R (2.1.2) für alle getesteten Transformanden eine Bande bei 856 bp nachgewiesen (Abbildung 13A, Bande 1-5).

Für den Southern Blot (2.2.3.9) wurde die gDNA von zwei Transformanden mit dem Restriktionsenzym *NheI* restringiert (2.2.2.2). Eine DIG-markierte Sonde mit einer Größe von 600 bp wurde mit den Primern 4for_new und 4rev_new (2.1.2) amplifiziert (2.2.3.9). Bei der Transformande FgPH1-AlcA-P1.10 wurden drei Banden, also drei Integrationen, nachgewiesen (Abbildung 14A, Bahn 1), während bei der Transformande FgPH1-AlcA-P1.6 eine Bande, also eine Integration, zu erkennen war (Abbildung 14A, Bahn 2).

Die Transkription wurde mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern 4for4 und rtRDRP_R (2.1.2) von der mit dem Primer Poly-dT synthetisierten cDNA nachgewiesen. Für jede der untersuchten Transformanden konnte eine Bande bei 856 bp nachgewiesen werden (Abbildung 15A, P1, Bahn 1-4).

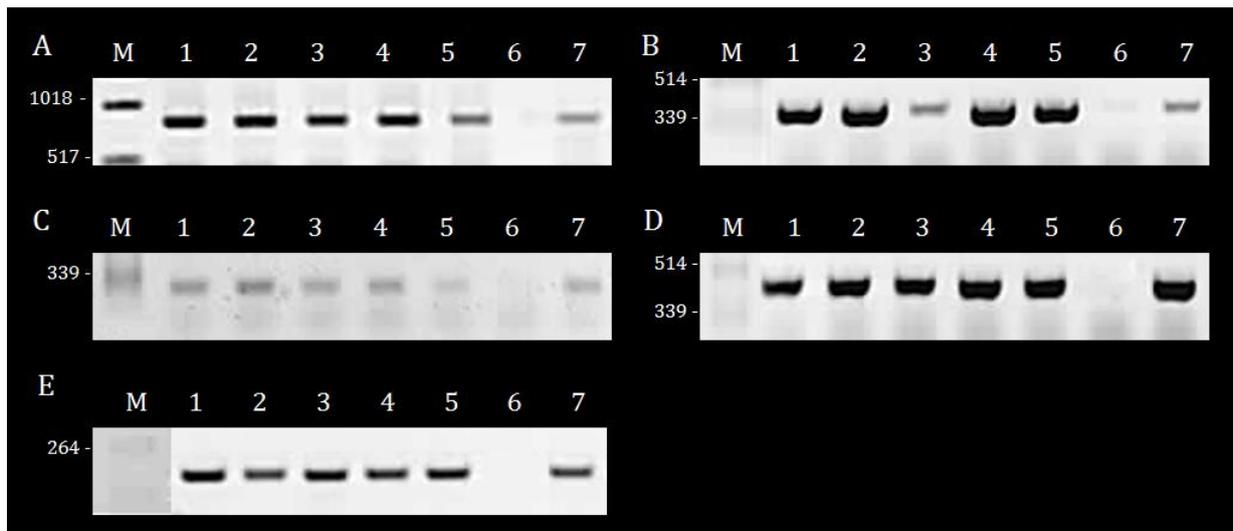


Abbildung 13: PCR zum Nachweis des Konstrukts der ORFs von FgV-ch9 in *F. graminearum*. Verwendet wurden spezifische Primer. Die Amplikons wurden auf einem 1,5 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt.

A: Nachweis von P1 mRNA in FgPH1-Transformanden. M: 1kb DNA Ladder (NEB, USA), Bahn 1: FgPH1-AlcA-P1.5, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P1.6, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P1.8, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P1.10, Bahn 5: FgPH1-AlcA-P1.13 Bahn 6: H₂O, Bahn 7: pET[His+S+P1_ATG+His]

B: Nachweis von P2 mRNA in FgPH1-Transformanden. M: λ DNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-P2.5, Bahn 2: FgPH1-AlcA-2.8, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P2.9, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P2.10, Bahn 5: FgPH1-AlcA-P2.12, Bahn 6: H₂O, Bahn 7: Sk-[P2]

C: Nachweis von P3 mRNA in FgPH1-Transformanden. M: λ DNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-P3.7, Bahn2: FgPH1-AlcA-3.11, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P3.16, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P3.27, Bahn 5: FgPH1-AlcA-P3.30, Bahn 6: H₂O, Bahn 7: pET-[P3]

D: Nachweis von P4 mRNA in FgPH1-Transformanden. M: λ DNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-4.2, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P4.4, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P4.9, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P4.15, Bahn 5: FgPH1-AlcA-P4.18, Bahn 6: H₂O, Bahn 7: pET-[P4]

E: Nachweis von P5 mRNA in FgPH1-Transformanden. M: λ DNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1- Δ GluA-P5.2, Bahn 2: FgPH1- Δ GluA -P5.6, Bahn 3: FgPH1- Δ GluA -P5.8, Bahn 4: FgPH1- Δ GluA -P5.11, Bahn 5: FgPH1- Δ GluA -P5.16, Bahn 6: H₂O, Bahn 7: Sk-[P5]

Die Integration von P2 in FgPH1 wurde mit den Primern 21_for und rt21_F (2.1.2) mittels PCR (2.2.2.1) überprüft und bei allen getesteten Transformanden konnte eine Bande bei 386 bp nachgewiesen werden (Abbildung 13B, Bahn 1-5).

Für die Analyse von zwei Transformanden mittels Southern Blot (2.2.3.9) wurde die gDNA mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II restringiert (2.2.2.2). Eine DIG-markierte Sonde mit einer Größe von 530 bp wurde mit den Primern 21DF und 21DR (2.1.2) mittels PCR (2.2.2.1) amplifiziert (2.2.3.9). Sowohl die Transformande FgPH1-AlcA-P2.9 als auch die Transformande FgPH1-AlcA-P2.8 weisen jeweils eine Bande, also eine Integration, auf (Abbildung 14B). Da diese nicht die gleiche Größe haben, handelt es sich nicht um den gleichen Integrationsort.

Die Transkription wurde mit den Primern Poly-dT und CB8 (P2) (2.1.2) von der mit dem Primer Poly-dT synthetisierten cDNA nachgewiesen. Für jede der untersuchten Transformanden konnte eine Bande bei 261 bp nachgewiesen werden (Abbildung 15B, P2).

Dass P3 in FgPH1 integriert wurde, wurde mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern CB7 (P3) und pET_rück (2.1.2) nachgewiesen. Bei allen getesteten Transformanden wurde eine Bande bei 316 bp amplifiziert (Abbildung 13C, Bahn 1-5).

Die Anzahl der Integrationen wurde im Southern Blot (2.2.3.9) mit durch das Restriktionsenzym *Mfe*I restringierter (2.2.2.2) gDNA von drei Transformanden überprüft. Dazu wurde eine mit den Primern 3116_F und 3116_RR (2.1.2) amplifizierten DIG-markierte Sonde (2.2.3.9) der Größe 636 bp verwendet. Die Transformanden FgPH1-AlcA-P3.11, FgPH1-AlcA-P3.27 und Fg8.1-ΔGluA-P3.5 wiesen jeweils eine Bande, also eine Integration auf (Abbildung 14C, Bahn 1-3). Da diese nicht die gleiche Größe haben, handelt es sich nicht um den gleichen Integrationsort.

Mit den Primern Poly-dT und CB8 (P3) (2.1.2) wurde in einer PCR (2.2.2.1) von der mit dem Primer Poly-dT synthetisierten cDNA die Anwesenheit von mRNA nachgewiesen. Für jede der untersuchten Transformanden konnte eine Bande bei 346 bp gezeigt werden (Abbildung 15C, P3, Bahn 1-4).

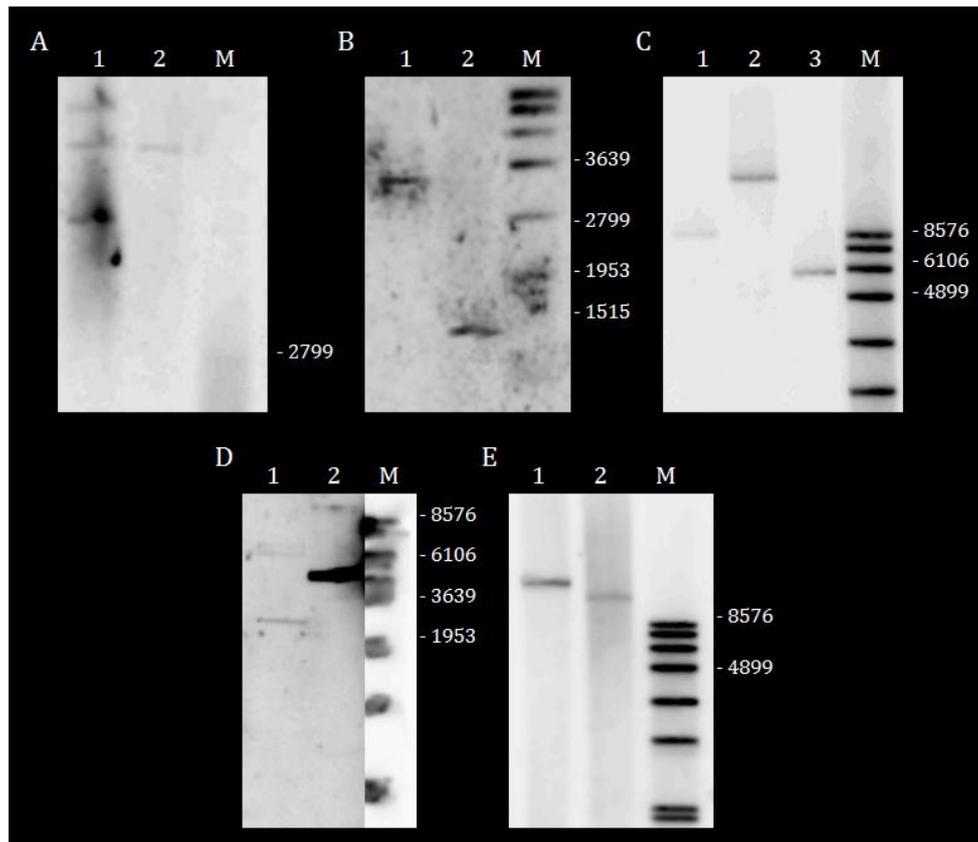


Abbildung 14: Southern Blot zum Nachweis der Integration der Expressionskonstrukte für die ORFs von FgV-ch9 in den Fusarium-Stamm FgPH1 bzw. 8/1. Verwendet wurden für den jeweiligen ORF spezifische Sonden. M: DNA Molecular Weight Marker VII (Roche, Deutschland).

A: Nachweis der Integration von P1 in FgPH1. Bahn 1: FgPH1-AlcA-P1.10, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P1.6

B: Nachweis der Integration von P2 in FgPH1. Bahn 1: FgPH1-AlcA-P2.9, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P2.8

C: Nachweis der Integration von P3 in FgPH1 und 8/1. Bahn 1: FgPH1-AlcA-P3.27, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P3.11, Bahn 3: 8/1-ΔGluA-P3.5

D: Nachweis der Integration von P4 in FgPH1. Bahn 1: FgPH1-AlcA-P4.2, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P4.9

E: Nachweis der Integration von P5 in FgPH1. Bahn 1: FgPH1-ΔGluA-P5.6, Bahn 2: FgPH1-ΔGluA-P5.8

Die Integration von P4 in FgPH1 wurde mit den Primern 3346up_F und _F (2.1.2) mittels PCR (2.2.2.1) bei allen getesteten Transformanten mit einer Bande bei 458 bp nachgewiesen (Abbildung 13D, Bahn 1-4).

Für die Analyse von zwei Transformanten mittels Southern Blot (2.2.3.9) wurde die gDNA mit dem Restriktionsenzym *Hind*III restringiert (2.2.2.2). Eine DIG-markierte Sonde mit einer Größe von 714 bp wurde mit den Primern rt_FR und 3346up_F (2.1.2) amplifiziert (2.2.3.9). Die Transformante FgPH1-AlcA-P4.8 zeigte drei Banden (Abbildung 14D, Bahn 1), also drei Integrationen, während die Transformante FgPH1-AlcA-P4.9 zwei Banden (Abbildung 14D, Bahn 2) und somit zwei Integrationen aufwies. Da keine dieser Banden die gleiche Größe hat, handelt es sich nicht um den gleichen Integrationsort.

Die Transkription wurde mit den Primern Poly-dT und rtFF (2.1.2) von der mit dem Primer Poly-dT synthetisierten cDNA nachgewiesen. Für jede der untersuchten Transformanden konnte eine Bande bei 465 bp detektiert werden (Abbildung 15D, P4).

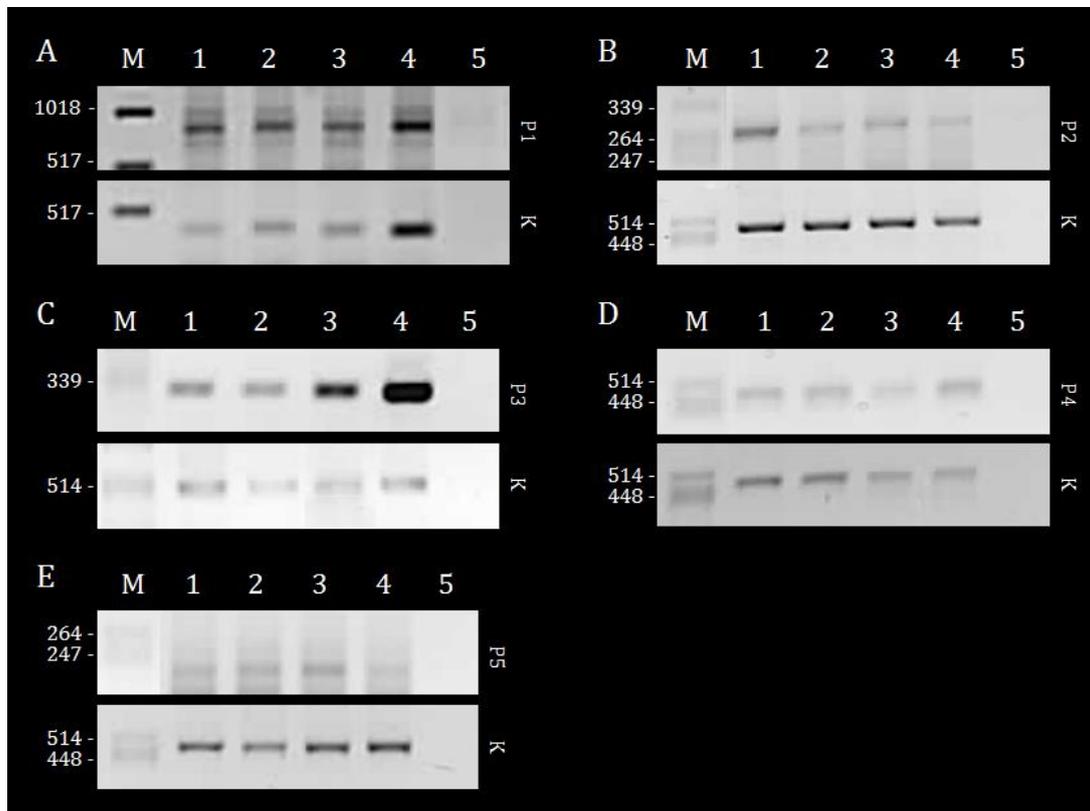


Abbildung 15: PCR zum Nachweis der Transkription der ORFs von FgV-ch9 in die *Fusarium*-Transformanden. Verwendet wurden spezifische Primer und mit dem Primer Poly-dT synthetisierte cDNA. Zur Kontrolle wurde die mRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit von *Fusarium graminearum* amplifiziert. Die Amplikons wurden auf einem 1,5 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. ORF-spezifische Fragmente sind jeweils im oberen Gel, die dazu gehörenden Kontrollen auf dem unteren Gel der Abbildung A-E gezeigt.

A: Nachweis von P1 in FgPH1. M: 1kb DNA Ladder (NEB, USA), Bahn 1: FgPH1-AlcA-P1.5, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P1.6, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P1.8, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P1.10, Bahn 5: H₂O

B: Nachweis von P2 in FgPH1. M: λDNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-2.8, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P2.9, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P2.10, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P2.12, Bahn 5: H₂O

C: Nachweis von P3 in FgPH1. M: λDNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-P3.7, Bahn 2: FgPH1-AlcA-3.11, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P3.27, Bahn 4: Fg8/1-ΔGluA-P3.5, Bahn 5: H₂O

D: Nachweis von P4 in FgPH1. M: λDNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-4.2, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P4.9, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P4.15, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P4.18, Bahn 5: H₂O

E: Nachweis von P5 in FgPH1. M: λDNA mit PstI verdaut, Bahn 1: FgPH1-AlcA-P5.2, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P5.6, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P5.8, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P5.11, Bahn 5: H₂O

Die Integration des ORF P5 in FgPH1 wurde in einer PCR (2.2.2.1) mit den Primern rtzinkF und rtzinkR (2.1.2) für alle getesteten Transformanden mit einer Bande bei 187 bp nachgewiesen (Abbildung 13E, Bahn 1-5).

Für den Southern Blot (2.2.3.9) wurde die gDNA von zwei Transformanden mit dem Restriktionsenzym *SpeI* restringiert (2.2.2.2). Eine DIG-markierte Sonde mit einer Größe von 700 bp wurde mit den Primern rtzinkR und pQE_hin (2.1.2) amplifiziert (2.2.3.9). Sowohl die Transformande FgPH1-ΔGluA-P5.8 als auch die Transformande FgPH1-

Δ GluA-P5.6 wiesen jeweils eine Bande, also eine Integration, auf (Abbildung 14E, 1 und 2). Da diese nicht die gleiche Größe haben, handelt es sich nicht um den gleichen Integrationsort.

Die Transkription wurde mittels PCR (2.2.2.1) mit den Primern Poly-dT und CB10 (P5) (2.1.2) von der mit dem Primer Poly-dT synthetisierten cDNA nachgewiesen. Für jede der untersuchten Transformanden konnte eine Bande bei 191 bp detektiert werden (Abbildung 15E, P5, Bahn 1-4).

3.3.2 Analyse der Expression der Proteine P1 bis P5 von FgV-ch9 in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Fusarium graminearum*

Zur Betrachtung der Prozessierung wurden die fünf ORFs von FgV-ch9 exprimiert. Hierzu wurden der prokaryotische Modellorganismus *Escherichia coli*, der eukaryotische Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* und der natürliche Wirt des Virus *Fusarium graminearum* ausgewählt. Um auch Prozessierungen nahe am N- oder C-Terminus sichtbar zu machen, wurden die Proteine P3 und P4 mit eGFP fusioniert.

In *E. coli* wurde die Produktion von Proteinen für 2 h mit IPTG induziert, in *S. cerevisiae* für 8 h bzw. 24 h mit Galactose und in *F. graminearum* für 4 h mit L-Threonin (2.2.3.1).

Alle Proteine wurden auf einem 10 % (w/v) Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.2.3.2) und mittels Western Blotings (2.2.3.3) auf eine Membran übertragen. Die Bindung des spezifischen Antikörpers wurde mit einem mit Alkalischer Phosphatase konjugiertem sekundären Antiserum (2.1.4) und NBT/BCIP (2.2.3.3) nachgewiesen.

Im Folgenden werden Banden, die sowohl in der Probe als auch in der Negativkontrolle vorhanden sind, als unspezifisch bezeichnet. Banden, die in den Proben zu finden sind, aber keine Entsprechung in der Negativkontrolle aufweisen, werden als spezifisch bezeichnet. Als Negativkontrolle dient bei *E. coli* und *S. cerevisiae* das Gesamtextrakt eines Stammes mit Leervektor und bei *F. graminearum* ein virusfreies Isolat von FgPH1 oder Fg8/1.

Eine Zusammenfassung der berechneten sowie beobachteten Molekulargewichte der viralen Proteine P1 bis P5 befindet sich im Anhang 3.

3.3.2.1 Expression von Protein P1 in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Das heterolog exprimierte Protein P1 ist am N- und C-Terminus mit je einem His-Tag fusioniert, sodass es mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* (2.1.4) und dem sekundären Antiserum *Anti-Mouse IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4) detektiert werden konnte.

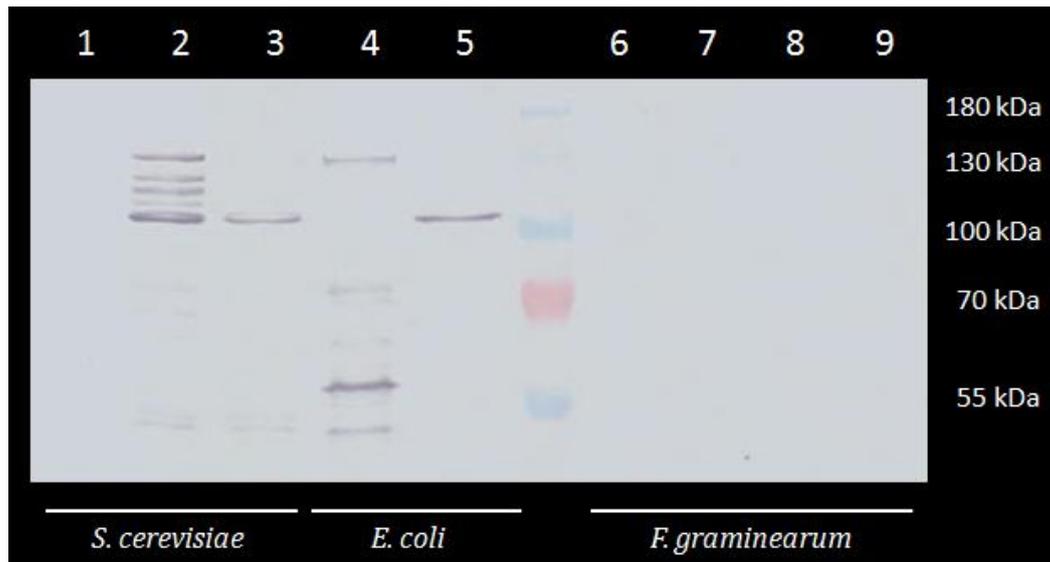


Abbildung 16: Expression von P1 in *S. cerevisiae* und *E. coli* sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel und detektiert mit dem primären Antiserum *Anti-polyHistidin* und dem sekundären Antiserum *Anti-Mouse IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P1] (8 h exprimiert), Bahn 3: pYES-[P1] (24 h exprimiert), Bahn 4: pET-[P1], Bahn 5: pET, Bahn 6: Viruspartikel FgPH1 VI, Bahn 7: Polysomen FgPH1 VI, Bahn 8: Gesamt-Protein FgPH1 VF, Bahn 9: Gesamt-Protein FgPH1 VI

Das Protein P1 ohne His-Tag hat ein berechnetes Molekulargewicht von 127 kDa. Nach einer Expression von 8 h in *S. cerevisiae* ist deutlich eine spezifische Bande bei etwa 130 kDa zu erkennen, die somit mit dem berechneten Molekulargewicht für das Protein mit Tag von 129 kDa übereinstimmt (Abbildung 16, Bahn 2). Daneben gibt es vier weitere spezifische Banden zwischen 120 kDa und 100 kDa sowie eine Bande bei etwa 50 kDa. Nach 24 h ist die Bande bei etwa 130 kDa nicht zu erkennen, jedoch wurde die Bande bei etwa 100 kDa sowie die kleinere Bande bei 50 kDa ebenfalls detektiert (Abbildung 16, Bahn 3).

Die Expression in *E. coli* nach 2 h zeigt ebenfalls eine spezifische Bande bei 129 kDa (Abbildung 16, Bahn 4). Bei dieser Probe ist jedoch auch eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa, wie bei den P1-exprimierenden Proben aus *S. cerevisiae*, zu detektieren.

Weder in virusfreiem noch virusinfiziertem *F. graminearum* FgPH1 oder den daraus extrahierten Viruspartikeln (2.2.1.5) und Polysomen (2.2.1.6) konnte erwartungsgemäß eine Bande mit dem spezifischen Antiserum *Anti-polyHistidin* detektiert werden (Abbildung 16, Bahn 6-9).

Da sich eine Detektion mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* in *F. graminearum* in keinem Fall als möglich herausgestellt hat, konnte kein Nachweis des Proteins P1 in den *F. graminearum*-Mutanten erbracht werden.

3.3.2.2 Expression von Protein P2 in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Fusarium graminearum*

Das heterolog exprimierte Protein P2 ist am N- und am C-Terminus mit je einem His-Tag fusioniert. Detektiert wurde das Protein mit dem Antiserum *AK-P2N* und dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4).

Das Protein P2 hat ein berechnetes Molekulargewicht von 94 kDa und wird zum Einbau in den Partikel auf ein Molekulargewicht von etwa 62 kDa prozessiert, nachweisbar in viralen Partikel-Extraktionen (Abbildung 18, Bahn 3). Das heterolog exprimierte Protein hat auf Grund der His-Tags und des N-terminalen S-Tags ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 102 kDa.

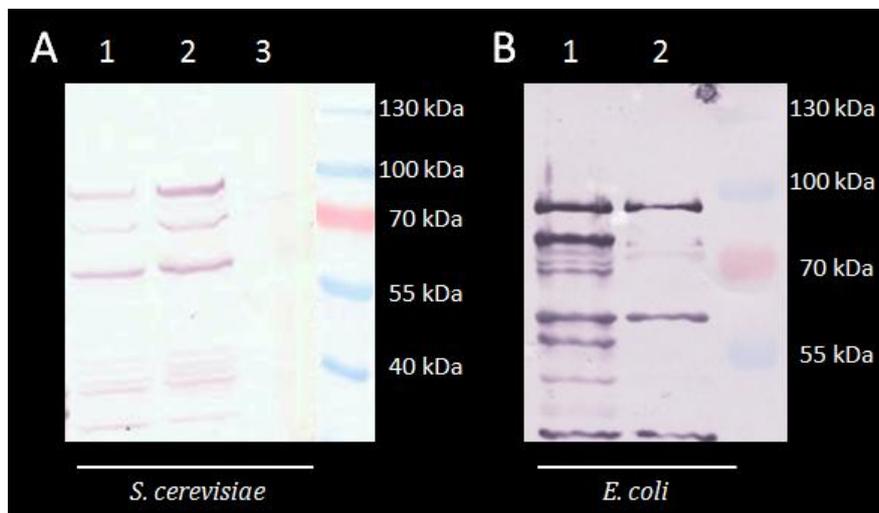


Abbildung 17: Expression von P2 in *S. cerevisiae* (A) und *E. coli* (B), aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel, detektiert mit dem primären Antiserum *AK-P2N* und dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

A: Bahn 1: pYES-[P2] (8 h exprimiert), Bahn 2: pYES-[P2] (24 h exprimiert); Bahn 3: pYES

B: Bahn 1: pET-[P2], Bahn 2: pET

Nach einer Expression von 8 h nach Induktion in *S. cerevisiae* sind deutlich vier spezifische Banden zu erkennen, wobei die mit der größten Masse bei etwa 85 kDa liegt

(Abbildung 17A, Bahn 1). Banden mit identischem Molekulargewicht sind 24 h nach Induktion ebenfalls vorhanden (Abbildung 17A, Bahn 2).

Die Expression in *E. coli* 2 h nach Induktion zeigt mehrere spezifische Banden, wobei die mit der größten Masse etwa 85 kDa aufweist (Abbildung 17B, Bahn 1). Auch fünf unspezifische Banden sind zu erkennen.

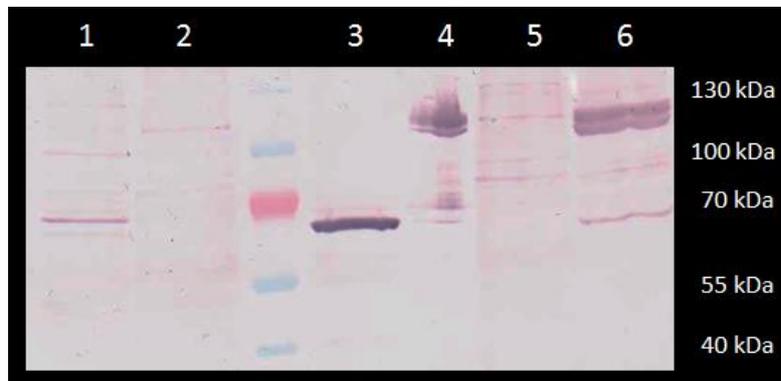


Abbildung 18: Expression von P2 in *F. graminearum* sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel und detektiert mit dem primären Antiserum *AK-P2N* und dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: FgPH1-AlcA-P2.8, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P2.9, Bahn 3: Virusreinigung FgPH1 VI, Bahn 4: Polysomen FgPH1 VI, Bahn 5: Gesamt-Protein FgPH1 VF, Bahn 6: Gesamt-Protein FgPH1 VI

Die Expression von P2 in der Pilz-Transformante FgPH1-AlcA-P2.8 (Abbildung 18, Bahn 1) zeigen sich zwei spezifische Banden. Die größere der beiden Banden hat ein Molekulargewicht von etwa 100 kDa während die kleinere etwa 65 kDa aufweist (Abbildung 18, Bahn 1). Im Extrakt der Transformante FgPH1-AlcA-P2.9 konnten nur Banden detektiert werden, die auch in der Negativkontrolle vorkommen (Abbildung 18, Bahn 2).

Die 65 kDa Bande des Partikels (Abbildung 18, Bahn 3) ist auch im infizierten Gesamtextrakt (Abbildung 18, Bahn 6), jedoch nicht im nicht infizierten Myzel (Abbildung 18, Bahn 5) zu finden. Im infizierten Myzel zeigt sich zusätzlich eine starke Doppelbande zwischen 100 und 130 kDa, die auch in der Polysomenreinigung (Abbildung 18, Bahn 4) vorhanden ist.

3.3.2.3 Expression von Protein P3 in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Fusarium graminearum*

Das heterolog exprimierte Protein P3 ist am N- und am C-Terminus mit je einem His-Tag fusioniert und hat eine berechnete Größe von 101 kDa. Detektiert wurde mit dem Peptidantiserum *AK-P3N* und dem polyklonalen Antiserum *AS0115*, das gegen Partikel

gerichtet ist und nur P3 erkennt, sowie dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4).

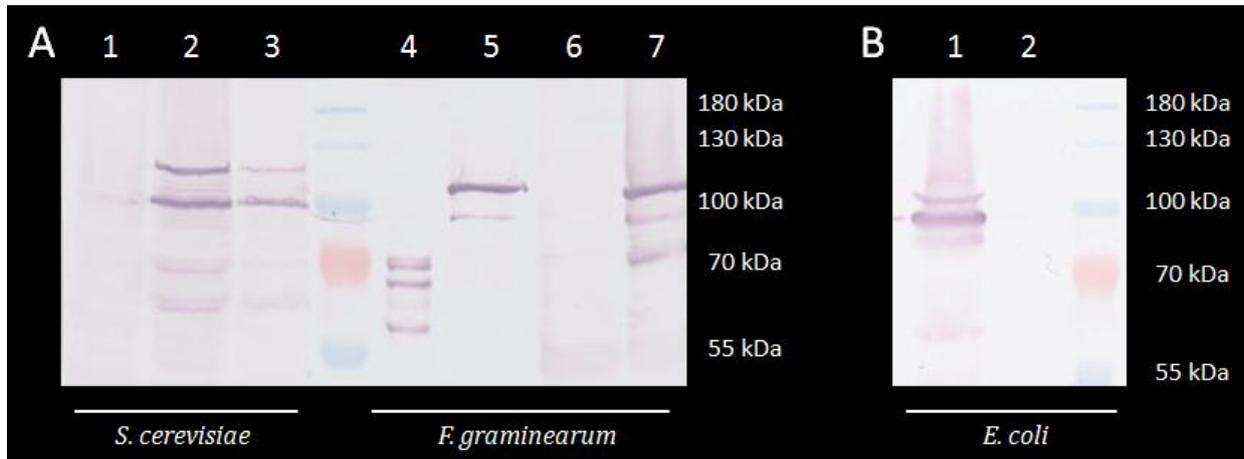


Abbildung 19: Expression von P3 in *S. cerevisiae* und *E. coli* sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel und detektiert mit dem primären Antiserum *AK-P3N* und dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

A: Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P3] (8 h exprimiert), Bahn 3: pYES-[P3] (24 h exprimiert), Bahn 4: Virusreinigung FgPH1 VI, Bahn 5: Polysomen FgPH1 VI, Bahn 6: Gesamt-Protein FgPH1 VF, Bahn 7: Gesamt-Protein FgPH1 VI

B: Bahn 1: pET-[P3], Bahn 2: pET

Das Protein P3 ohne Tags hat ein errechnetes Molekulargewicht von 93 kDa. Zwei spezifische Banden bei etwa 110 kDa und 95 kDa wurden in Polysomen (Abbildung 19A, Bahn 5) und Gesamtextrakt von FgPH1 VI (Abbildung 19A, Bahn 7), jedoch nicht im nicht infizierten Myzel (Abbildung 19A, Bahn 6) mit dem Antiserum *AK-P3N* detektiert. Im Partikel sind drei Banden zu erkennen. Zwei Banden sind bei etwa 70 kDa und 68 kDa, eine weitere Bande bei etwa 60 kDa, die allerdings nicht immer detektiert werden konnte, nachweisbar (Abbildung 19A, Bahn 4).

Nach einer Expression von 8 h in *S. cerevisiae* ist deutlich eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 120 kDa und eine unspezifische Bande von 100 kDa zu erkennen (Abbildung 19A, Bahn 2). Nach 24 h ist die Bande von etwa 120 kDa schwächer, aber immer noch deutlich erkennbar (Abbildung 19A, Bahn 3).

Die Expression in *E. coli* nach 2 h zeigt eine spezifische Bande bei etwa 110 kDa (Abbildung 19B, Bahn 1). Auch eine kleinere, scheinbar unspezifische Bande bei etwa 100 kDa ist zu erkennen. Obwohl in diesem Falle keine entsprechende Bande in der Negativkontrolle (Abbildung 19B, Bahn 2) zu erkennen ist, wurde diese bei weiteren Blots mit *E. coli*-Extrakten bereits beobachtet (nicht gezeigt).

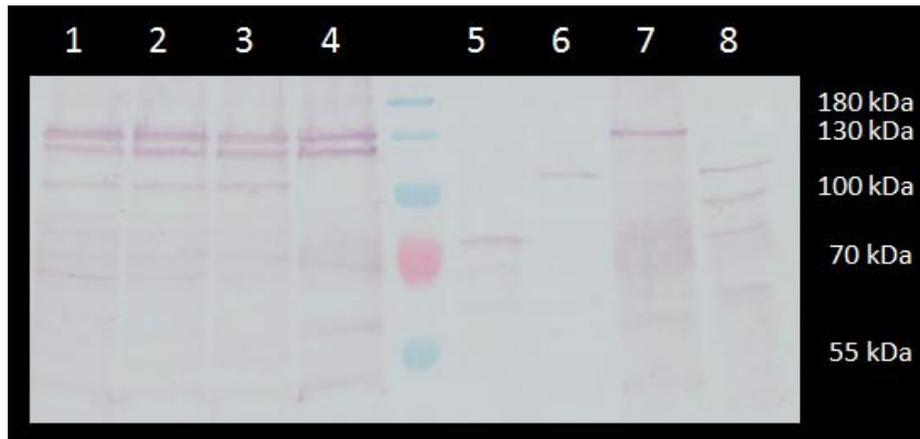


Abbildung 20: Expression von P3 in *F. graminearum* sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel und detektiert mit dem primären Antiserum *AS0115* und dem sekundären *Antiserum Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: FgPH1-AlcA-P3.7, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P3.11, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P3.27, Bahn 4: Fg8/1-ΔGluA-P3.5, Bahn 5: Virusreinigung FgPH1 VI, Bahn 6: Polysomen FgPH1 VI, Bahn 7: Gesamt-Protein FgPH1 VF, Bahn 8: Gesamt-Protein FgPH1 VI

Die Expression von P3 in den Transformanden FgPH1-AlcA-P3.7, FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 zeigt bei Detektion mit dem polyklonalen Antiserum *AS0115* deutlich eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa (Abbildung 20A, Bahn 1-3). Alle weiteren Banden sind unspezifisch. Im Extrakt der Transformande Fg8.1-ΔGluA-P3.5 konnte keine spezifische Bande detektiert werden (Abbildung 20A, Bahn 4).

Zur Untersuchung ob es am C-Terminus von P3 zu Prozessierungen kommt, wurde das P3-Gen mit eGFP fusioniert und in *S. cerevisiae*, *E. coli* und *F. graminearum* exprimiert. Neben dem C-terminalen eGFP weist das Fusionsprotein jeweils einen His-Tag am C- und am N-Terminus auf. Detektiert wurde mit den polyklonalen Antiseren *Anti-GFP*, *Anti-poly-Histidin* und dem Peptidantiserum *AK-P3N* sowie den sekundären Antiseren *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat und *Anti-Mouse IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4). Erwartet wurde ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 128 kDa.

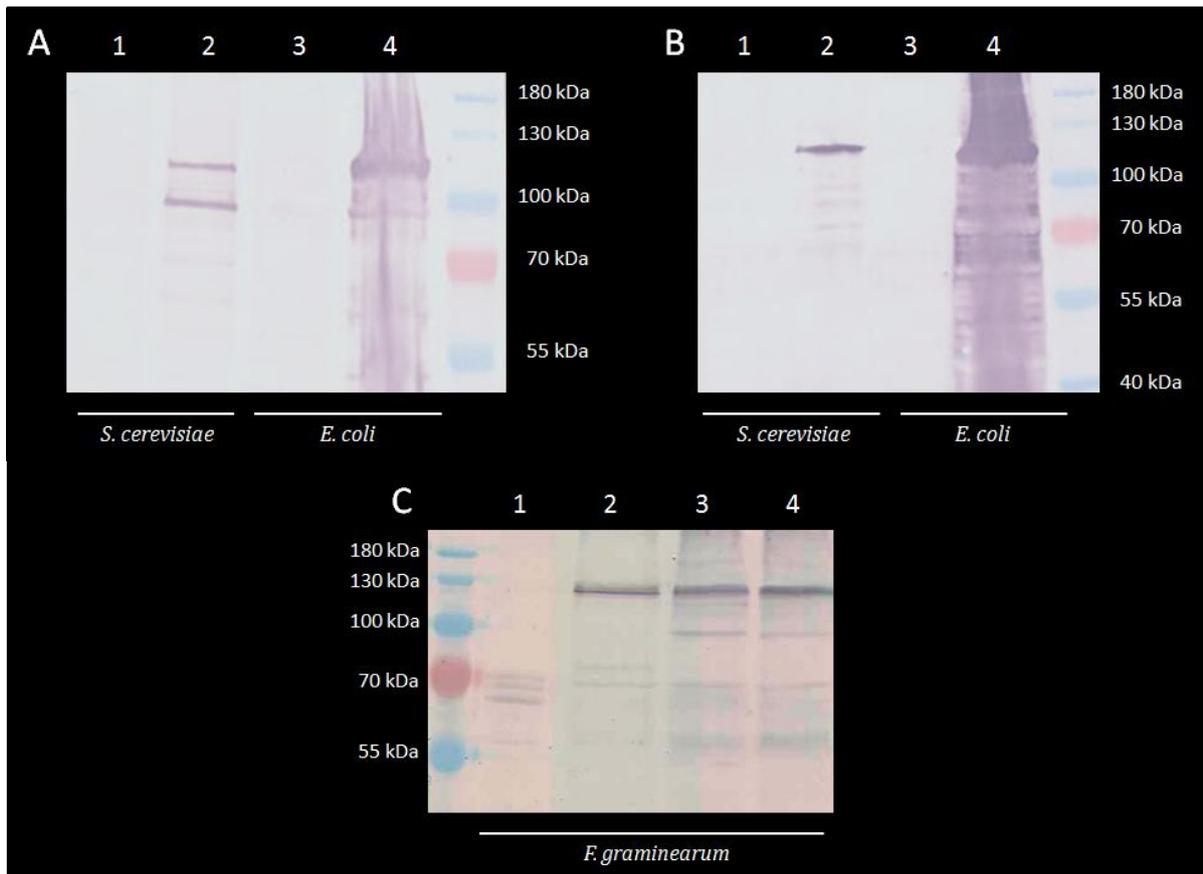


Abbildung 21: Expression von P3eGFP-C in *S. cerevisiae*, *E. coli* und *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

A: Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P3eCFP-C], Bahn 3: pET, Bahn 4: pET-[P3eGFP-C]; primäres Antiserum: *Anti-polyHistidin*, sekundäres Antiserum: *Anti-Mouse IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat

B: Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P3eCFP-C], Bahn 3: pET, Bahn 4: pET-[P3eGFP-C]; primäres Antiserum: *Anti-GFP*, sekundäres Antiserum: *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat

C: Bahn 1: Viruspartikel FgPH1 VI, Bahn 2: Gesamt-Protein FgPH1 VF, Bahn 3: FgPH1-AlcA-P3eGFP-C.1, Bahn 4: FgPH1-AlcA-P3eGFP-C.2; primäres Antiserum: *AS0115*, sekundäres Antiserum: *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat

Bei der Expression in *S. cerevisiae* und *E. coli* konnten durch die Detektion mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* jeweils zwei spezifische Banden detektiert werden. Die größere der beiden Banden hat ein Molekulargewicht von etwa 120 kDa und die kleinere ist etwa 90 kDa schwer (Abbildung 21A, Bahn 2 und 4). Bei einer Detektion mit dem Antiserum *Anti-GFP* wurde jeweils eine Bande mit einer Größe von etwa 120 kDa gezeigt (Abbildung 21B, Bahn 2 und 4). Es konnte keine Bande der Größe 90 kDa nachgewiesen werden.

Bei der Analyse der Expression von P3eGFP-C in *F. graminearum* konnte in den Transformanden FgPH1-AlcA-P3eGFP-C.1 und FgPH1-AlcA-P3eGFP-C.2 mit dem Antiserum *AS0115* jeweils eine spezifische Bande mit einer Größe von knapp unter 100 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 21C, Bahn 2-4).

3.3.2.4 Expression von Protein P4 in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Fusarium graminearum*

Das heterolog exprimierte Protein P4 ist am N- und am C-Terminus mit je einem His-Tag fusioniert. Detektiert wurde mit dem Peptidantiserum *AK-P4N* und dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4).

Das Protein P4 hat ein errechnetes Molekulargewicht von 91 kDa, welches in Polysomen und Gesamtextrakt von FgPH1 VI nachweisbar ist (Abbildung 22, Bahn 7 und 9). Im Viruspartikel ist P4 nicht nachweisbar. Es ist somit ein Nichtstrukturprotein (Abbildung 22, Bahn 6). Das hier exprimierte Protein hat auf Grund der His-Tags und des S-Tags ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 97 kDa.

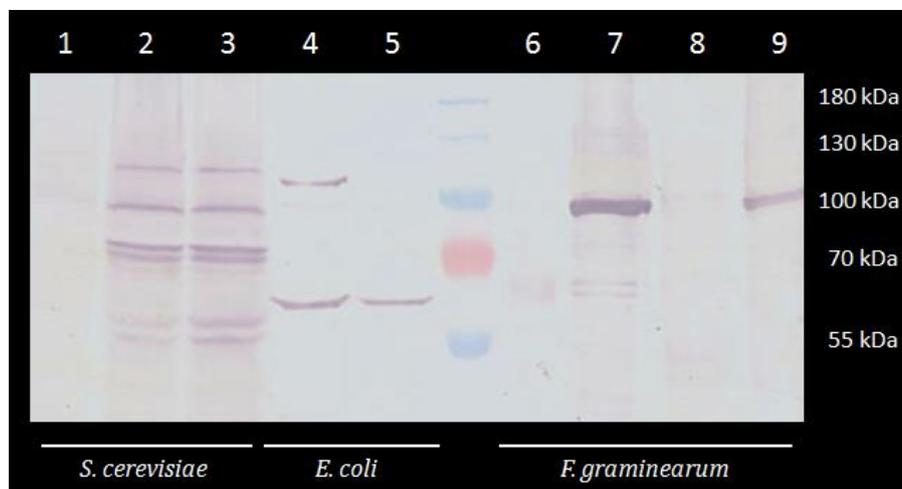


Abbildung 22: Expression von P4 in *S. cerevisiae* und *E. coli* sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel und detektiert mit dem primären Antiserum *AK-P4N* und dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P4] (8 h exprimiert), Bahn 3: pYES-[P4] (24 h exprimiert), Bahn 4: pET-[P4], Bahn 5: pET, Bahn 6: Virusreinigung FgPH1 VI, Bahn 7: Polysomen FgPH1 VI, Bahn 8: Gesamt-Protein FgPH1 VF, Bahn 9: Gesamt-Protein FgPH1 VI

Nach einer Expression von 8 h in *S. cerevisiae* sind deutlich mehrere spezifische Banden zu erkennen, wobei die größte ein Molekulargewicht von etwa 115 kDa hat (Abbildung 22, Bahn 2) hat. Nach 24 h sind diese Banden in gleicher Stärke erkennbar (Abbildung 22, Bahn 3).

Die Expression in *E. coli* nach 2 h zeigt eine spezifische Bande bei etwa 110 kDa sowie eine unspezifische Bande bei etwa 65 kDa (Abbildung 22, Bahn 4).

Zur Untersuchung ob es bei P4 zu Prozessierungen kommt, wurde das P4-Gen mit eGFP N-terminal fusioniert und in *S. cerevisiae*, *E. coli* und *F. graminearum* exprimiert. Darüber

hinaus hat das eGFP-P4 Fusionsprotein einen His-Tag am C-Terminus und einen His-Tag sowie einen S-Tag am N-Terminus. Detektiert wurde mit dem polyklonalen Antiserum *Anti-GFP*, dem monoklonalen Antiserum *S-Tag* und dem Peptidantiserum *AK-P4N* sowie dem sekundären Antiserum *Anti-Rabbit IgG* Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4). Erwartet wurde ein Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 123 kDa.

Bei der Expression in *S. cerevisiae* konnte mit dem Peptidantiserum *AK-P4N* bei P4eGFP-N eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa (Abbildung 23A, Bahn 2) detektiert werden. Eine spezifische Bande mit etwa 110 kDa lässt sich auch bei Detektion mit den spezifischen Antisera *Anti-GFP* (Abbildung 23D, Bahn 2) und *S-Tag* (Abbildung 23E, Bahn 2) finden.

Bei der Expression von P4eGFP-N in *E. coli* konnte ebenfalls stets eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa nachgewiesen werden, gleichgültig welches Antiserum verwendet wurde (Abbildung 23A, C-D, jeweils Bahn 4).

Die Expression von P4eGFP-N in *F. graminearum* zeigt eine Vielzahl spezifischer Banden bei der Detektion mit dem Peptidantiserum *AK-P4N*; eine Doppelbande bei etwa 170 kDa, eine Bande bei etwa 130 kDa und eine bei etwa 120 kDa (Abbildung 23B, Bahn 2) wurden detektiert. Bei der Detektion mit dem polyklonalen Antiserum *Anti-GFP* zeigte sich eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa (Abbildung 23C, Bahn 6) und bei einer Detektion mit dem Antiserum *S-Tag* zeigte sich keine Bande (Abbildung 23E, Bahn 6).

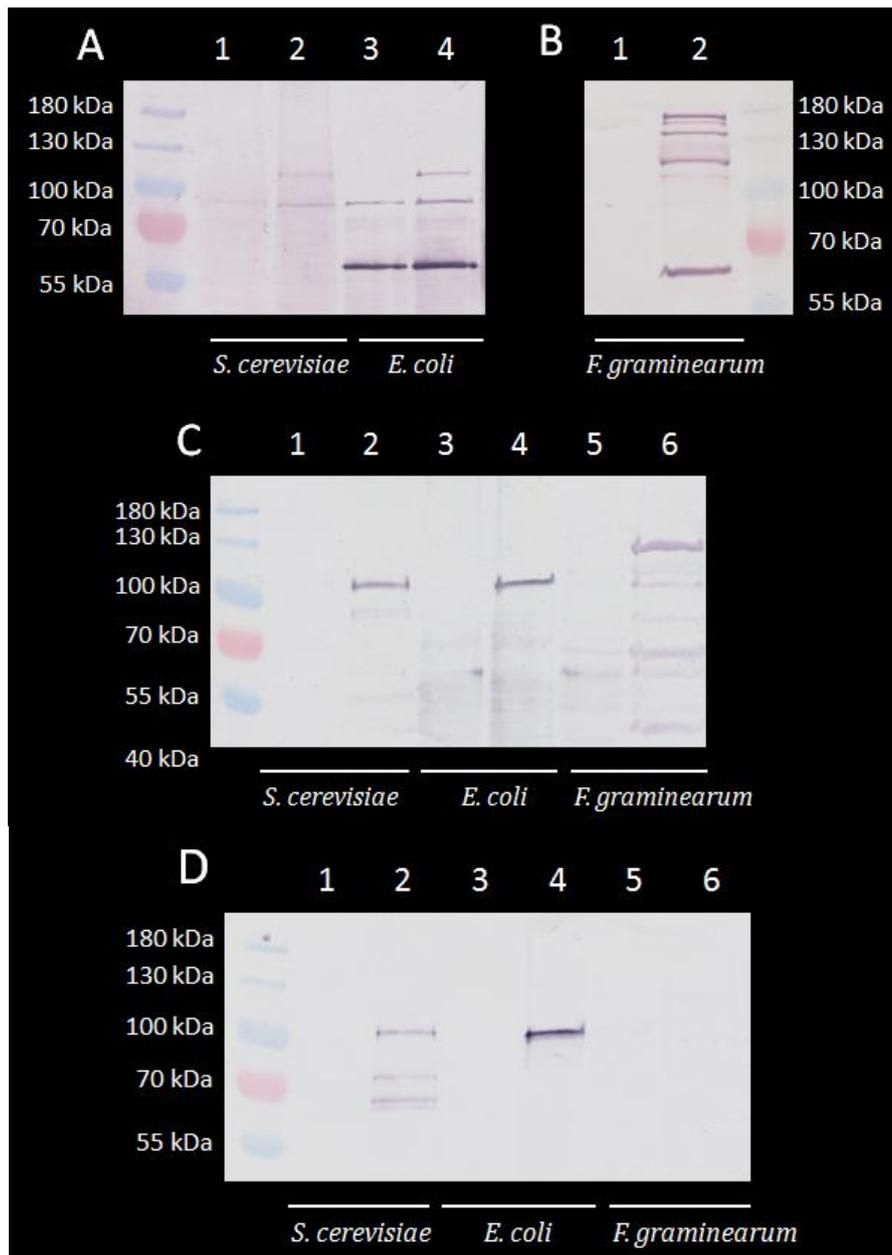


Abbildung 23: Expression von P4eGFP-N in *S. cerevisiae*, *E. coli* und *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA). Das sekundäre Antiserum ist stets mit einer Alkalischen Phosphatase gekoppelt.

A: Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P4eGFP-N], Bahn 3: pET, Bahn 4: pET-[P4eGFP-N]; primäres Antiserum: AK-P4N, sekundäres Antiserum: Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase Konjugat

B: Bahn 1: FgPH1 VF, Bahn 2: FgPH1-AlcA-P4eGFP-N; primäres Antiserum: AK-P4N, sekundäres Antiserum: Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase Konjugat

C: Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P4eGFP-N], Bahn 3: pET, Bahn 4: pET-[P4eGFP-N], Bahn 5: FgPH1 VF, Bahn 6: FgPH1-AlcA-P4eGFP-N; primäres Antiserum: Anti-GFP, sekundäres Antiserum: Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase Konjugat

D: Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P4eGFP-N], Bahn 3: pET, Bahn 4: pET-[P4eGFP-N], Bahn 5: FgPH1 VF, Bahn 6: FgPH1-AlcA-P4eGFP-N; primäres Antiserum: S-Tag, sekundäres Antiserum: Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase Konjugat

3.3.2.5 Expression von Protein P5 in *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*

Das heterolog exprimierte Protein P5 wurde mit dem Peptidantiserum AK-P5N und dem sekundären Antiserum Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase Konjugat (2.1.4) detektiert.

Das Protein P5 hat ein errechnetes Molekulargewicht von 96 kDa. Im Polysomen (Abbildung 24, Bahn 7) und Gesamtextrakt (Abbildung 24, Bahn 9) von FgPH1 VI ist eine Bande bei etwa 110 kDa nachweisbar. Darüber hinaus können im Gesamtextrakt von FgPH1 VI mehrere Banden im Bereich von etwa 130 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 24, Bahn 9). Im Viruspartikel ist P5 nicht nachweisbar. Es ist damit ein Nichtstrukturprotein (Abbildung 24, Bahn 6). Das heterolog exprimierte Protein hat auf Grund des His- und S-Tags am N-Terminus ein berechnetes Molekulargewicht von etwa 102 kDa.

Nach einer Induktion von 8 h in *S. cerevisiae* ist deutlich eine spezifische Doppelbande bei etwa 130 kDa zu erkennen (Abbildung 24, Bahn 2), die nach einer Induktion von 24 h noch sehr schwach sichtbar ist (Abbildung 24, Bahn 3).

Die Expression in *E. coli* nach 2 h Induktion zeigt zwei spezifische Banden, die größere Bande ist etwas kleiner als 130 kDa während die kleinere Bande ein Molekulargewicht von etwa 115 kDa hat (Abbildung 24, Bahn 4).

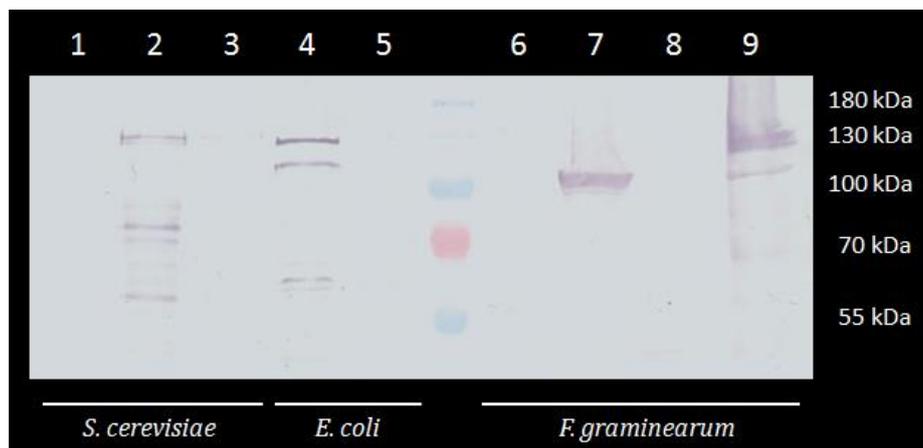


Abbildung 24: Expression von P5 in *S. cerevisiae* und *E. coli* sowie Gesamtextrakt, Polysomen und Viruspartikel aus virusinfiziertem *F. graminearum*, aufgetrennt über ein 10 % (w/v) Polyacrylamidgel und detektiert mit dem primären Antiserum AK-P5N und dem sekundären Antiserum Anti-Rabbit IgG Alkalische Phosphatase Konjugat. Zur Färbung wurde das Substrat NBT/BCIP verwendet. Molekulargewichtsstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA).

Bahn 1: pYES, Bahn 2: pYES-[P5] (8 h exprimiert), Bahn 3: pYES-[P5] (24 h exprimiert), Bahn 4: pET-[P5], Bahn 5: pET, Bahn 6: Virusreinigung FgPH1 VI, Bahn 7: Polysomen FgPH1 VI, Bahn 8: Gesamt-Protein FgPH1 VI, Bahn 9: Gesamt-Protein FgPH1 VI

3.4 Untersuchung der viralen Proteine P1 bis P5, exprimiert in *E. coli* und *S. cerevisiae*, auf Protease-Aktivität

Viele Viren kodieren eine Protease, sodass die viralen Proteine autoproteolytisch oder wechselseitig prozessiert werden können. Zur Überprüfung, ob auch FgV-ch9 eine Protease kodiert, wurde das Protease-Assay-Kit der Firma Calbiochem (USA) verwendet (2.2.3.4). Es ist spezifisch darauf ausgelegt ein breites Spektrum an Proteasen zu detektieren. Sind Proteasen in der Probe vorhanden, verursachen diese einen Farbumschlag, der direkt proportional zur Proteaseaktivität ist.

Die nativ extrahierten Gesamtextrakte (2.2.3.1) der *E. coli*- sowie *S. cerevisiae*-Expressionsmutanten wurden in diesem Kit eingesetzt. Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm).

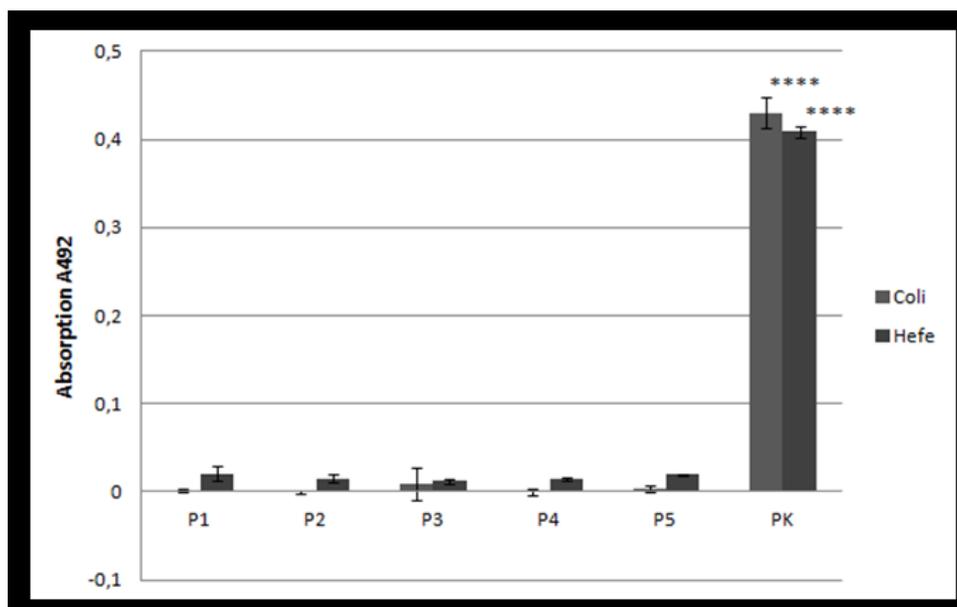


Abbildung 25: Proteaseaktivität in Gesamtextrakten der *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Mutanten, die eines der Proteine von FgV-ch9 (P1-P5) exprimieren. Die Positivkontrolle PK wurde vom Hersteller bereitgestellt. Die statistische Signifikanz, bezogen auf die Pufferkontrolle, wurde unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm) geprüft: **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=3$

Der Protease-Assay zeigte, dass unter den Testbedingungen des Kits keines der Extrakte, weder aus *E. coli*, noch aus *S. cerevisiae*, einen Farbumschlag, und damit Protease-Aktivität, aufwies. Einzig bei der Positivkontrolle konnte eine deutliche Zunahme der Farbintensität detektiert werden (Abbildung 25).

3.5 Charakterisierung der Transformanten zur Expression der fünf ORFs von FgV-ch9 in *Fusarium graminearum*

Bei der Charakterisierung von *Fusarium*-Transformanten wurden verschiedene Aspekte der Virulenz genauer beleuchtet. So wurde die Infektiosität auf Ähren der Wirtspflanze *Triticum aestivum* (2.1.1.3) sowie die Bildung von Infektionsstrukturen (3.5.3.2) betrachtet. Darüber hinaus wurde die sexuelle (3.5.5) und asexuelle (3.5.4) Fortpflanzung sowie die Resistenz gegen ausgewählte abiotische Stressfaktoren (3.5.1) analysiert.

3.5.1 Wachstumstests auf CM-Medium unter Normal- und unter Stressbedingungen

Das Wachstum unterschiedlicher *F. graminearum*-Mutanten und -Stämme wurde unter Normalbedingungen (CM-Festmedium; 2.1.5) sowie unter osmotischem (0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; 2.2.4.1) und oxidativem (10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; 2.2.4.1) Stress untersucht. Für die Analyse von Mutanten, die unter der Kontrolle des AlcA-Promotors exprimieren, wurde zur Induktion L-Threonin beigelegt (CM-Induktions-Festmedium; 2.1.5). In die Mitte der jeweiligen Platte wurde ein Myzelblock gesetzt und nach 3 Tagen Inkubation bei 28° C wurde der Wachstumsphänotyp dokumentiert und vermessen (2.2.4.1).

Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellem ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm).

3.5.1.1 Vergleich des Wachstums der virusinfizierten *Fusarium graminearum*-Stämme FgCh9 und FgPH1 unter Normal- und Stressbedingungen

Das Wachstum des *F. graminearum*-Stammes FgCh9 (2.1.1.2), infiziert mit einem hohen (HT) und einem niedrigen (LT) Virustiter von FgV-ch9, wurde mit dem des Laborstammes FgPH1-GFP (2.1.1.2), virusfrei (VF) und infiziert mit hohem Virustiter (VI) von FgV-ch9, verglichen. Dabei wurde das Wachstum unter Normalbedingungen (2.2.1.1) sowie unter osmotischem und oxidativem Stress (2.2.4.1) betrachtet.

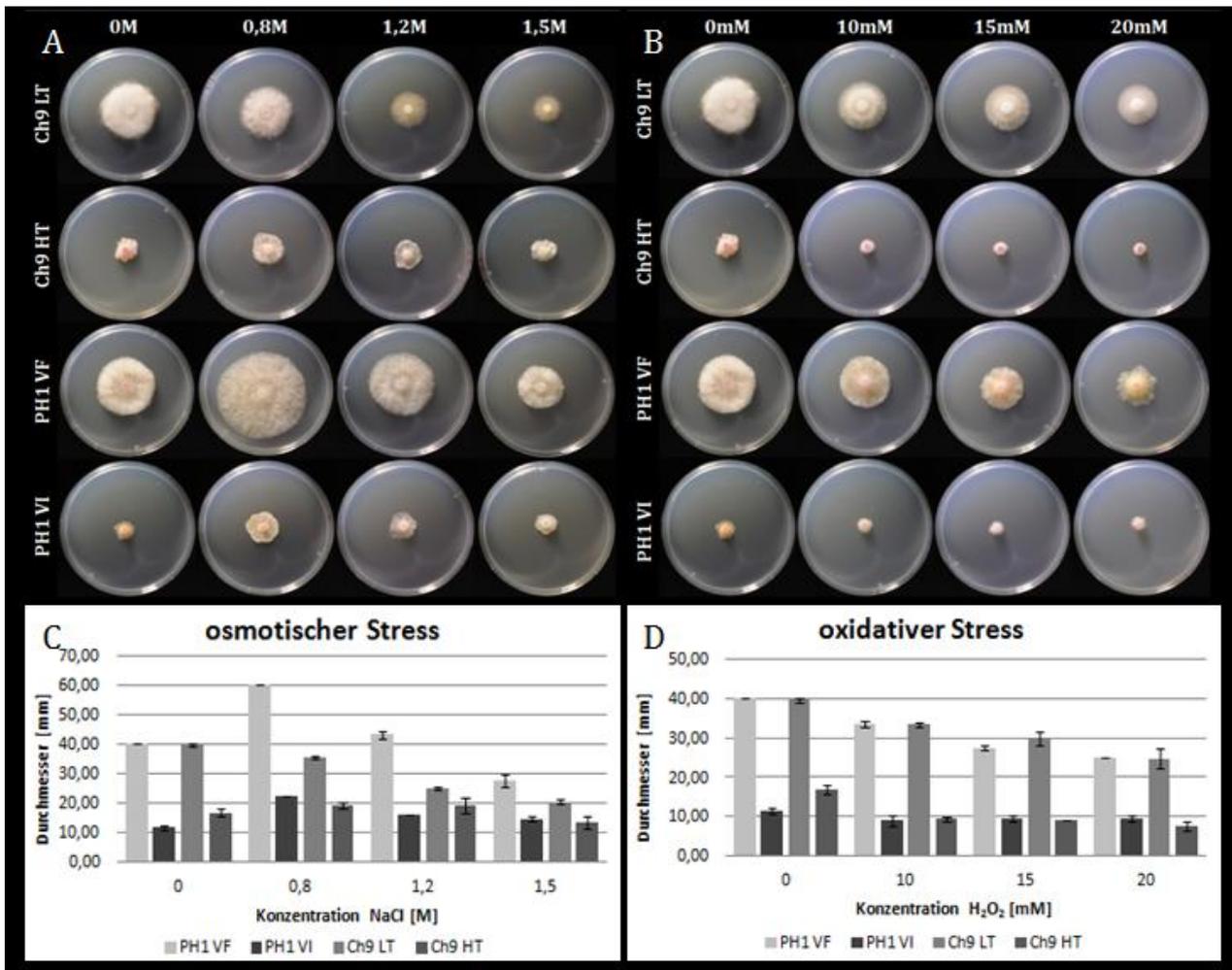


Abbildung 26: Wachstumstest der *F. graminearum*-Stämme Ch9 (HT und LT) und FgPH1-GFP (VI und VF) unter Stressbedingungen. Vergleich des typischen Phänotyps und Darstellung des mittleren Durchmessers der Kolonien. CM-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

In Abbildung 26A ist eine durchschnittliche Auswahl der Kolonien unter osmotischem Stress abgebildet. Deutlich zu erkennen ist die signifikante Wachstumsreduktion zwischen virusfreiem, bzw. gering infiziertem Myzel und stark infiziertem Myzel. Auch die Messung des Durchmessers der Kolonien (Abbildung 26C) bestätigt diese Beobachtung. Eine 3 Tage alte Kolonie von FgPH1-GFP VF hat einen durchschnittlichen Durchmesser von 40 mm, während eine Kolonie von FgPH1-GFP VI durchschnittlich 11,5 mm aufweist, eine Reduktion von etwa 70 %. Eine durchschnittliche Kolonie von FgCh9 LT hat ebenfalls einen Durchmesser von 40 mm, während die Kolonien von FgCh9 HT durchschnittlich 16,5 mm zeigen, also eine Reduktion von etwa 60 %.

Bei einer Zugabe von 0,8 M NaCl lässt sich bei allen Stämmen, außer FgCh9 LT, ein signifikanter Anstieg des Durchmessers erkennen. FgCh9 LT hingegen zeigt eine signifikante Abnahme von 11 %. Steigt die Konzentration an NaCl weiter, so weisen alle Stämme eine signifikante Wachstumsabnahme auf.

Eine durchschnittliche Auswahl von Kolonien unter oxidativem Stress ist in Abbildung 26B dargestellt. Die Stämme FgCh9 LT und FgPH1-GFP VF weisen beide eine signifikante Abnahme des Wachstums bei Zugabe von H₂O₂ auf. Der Vergleich des mittleren Durchmessers der Kolonien unterstreicht diese Aussage (Abbildung 26D). Bei der maximalen H₂O₂-Konzentration von 20 mM zeigen beide Stämme eine Wachstumsreduktion von etwa 38 %. Im Vergleich miteinander zeigen beide Stämme ohne oder mit geringem Virustiter keinen signifikanten Unterschied in ihrem Wachstum. Werden diese beiden Stämme mit den stark virusinfizierten Stämmen FgCh9 HT und FgPH1-GFP VI verglichen, fällt auf, dass beide Stämme bereits bei Zugabe von 10 mM H₂O₂ nahezu kein Wachstum mehr zeigen (Abbildung 26).

3.5.1.2 Wachstumstest der P1-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ)

Das Wachstum der *F. graminearum*-Transformanden FgPH1-AlcA-P1.6 und FgPH1-AlcA-P1.10 wurde unter Normalbedingungen (2.2.1.1) sowie unter osmotischem und oxidativem Stress (2.2.4.1) untersucht. Dafür wurde CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) verwendet.

Die beiden Transformanden FgPH1-AlcA-P1.6 und FgPH1-AlcA-P1.10 unterscheiden sich weder unter Normal- noch unter Stressbedingungen signifikant vom Kontrollstamm FgPH1-GFP VF, wie in der Zusammenstellung des Plattentests (Abbildung 27A und B) und der Darstellung der mittleren Durchmesser der Kolonien (Abbildung 27C und D) deutlich wird.

Allerdings lässt sich die Wachstumszunahme bei Kolonien, die auf CM-Festmedium mit 0,8 M NaCl gewachsen sind (Abbildung 26), auf CM-Induktions-Festmedium nicht wiederfinden (Abbildung 27). Generell war das Wachstum auf L-Threonin-haltigen Platten gesteigert. Der Durchmesser von FgPH1-GFP VF, gewachsen auf CM-Induktions-Festmedium, ist um etwa 78 % gegenüber den auf CM-Festmedium gewachsenen Kolonien gesteigert. Bei FgPH1-GFP VI sind es etwa 48 %.

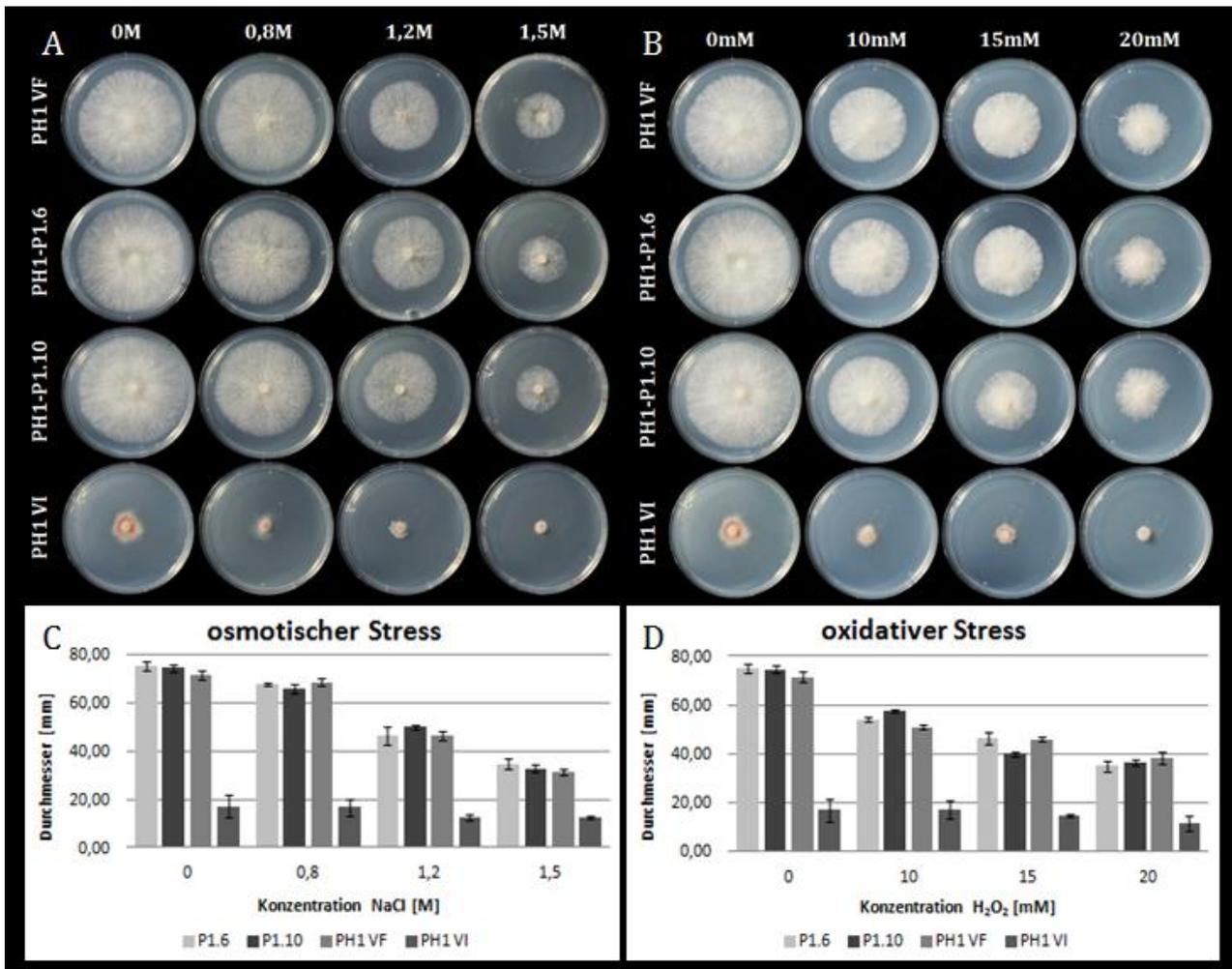


Abbildung 27: Wachstumstest der *F. graminearum*-Transformanten FgPH1-AlcA-P1.6 und FgPH1-AlcA-P1.10 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen. CM-Induktions-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

3.5.1.3 Wachstumstest der P2-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ)

Das Wachstum der *F. graminearum*-Transformanten FgPH1-AlcA-P2.8 und FgPH1-AlcA-P2.9 sollte unter Normalbedingungen (2.2.1.1) sowie unter osmotischem und oxidativem Stress (2.2.4.1) untersucht werden. Dabei wurde CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) verwendet.

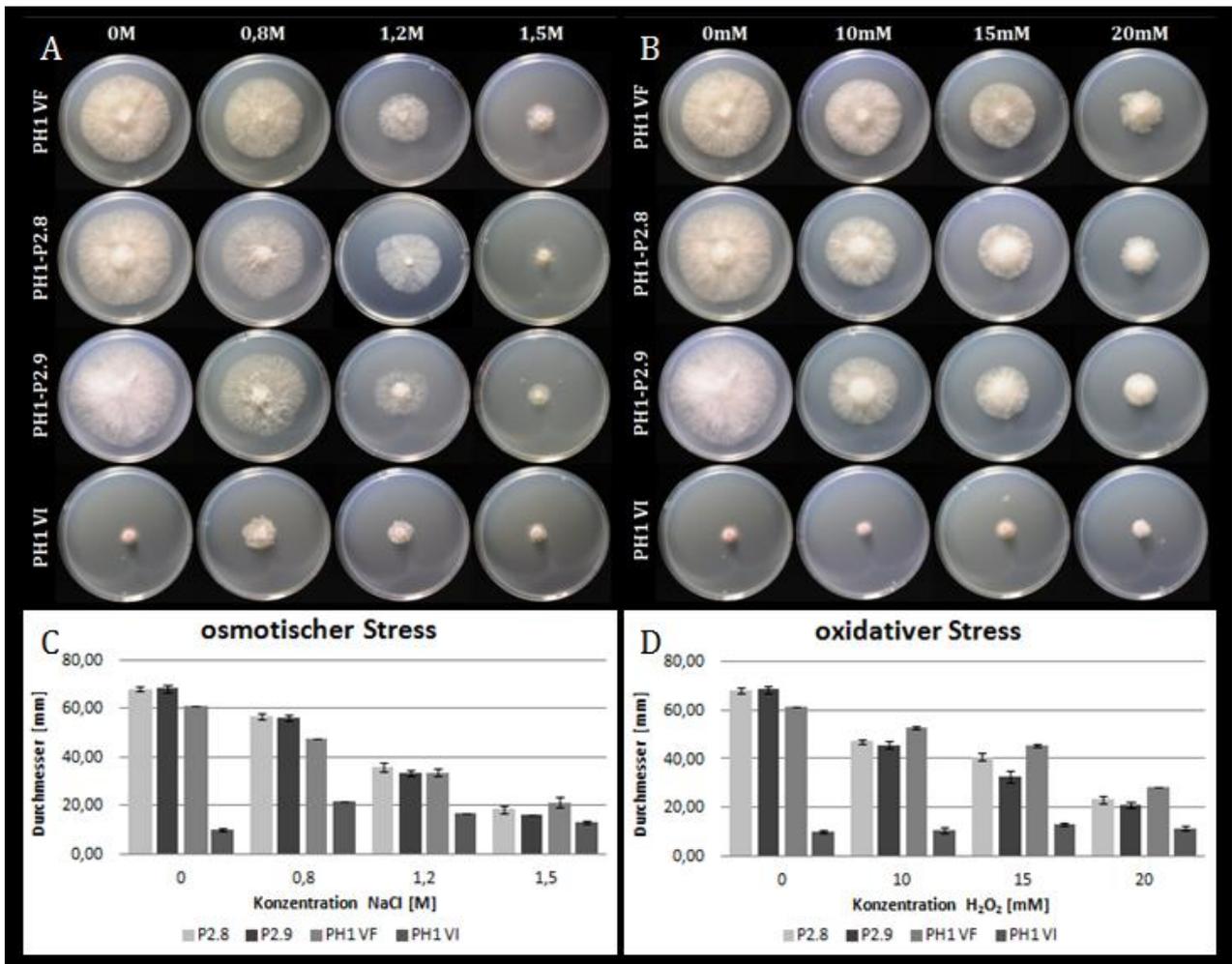


Abbildung 28: Wachstumstest der *F. graminearum*-Transformanten FgPH1-AlcA-P2.8 und FgPH1-AlcA-P2.9 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen. CM-induktions-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

P2.8 und FgPH1-AlcA-P2.9 im Wachstumstest (Abbildung 28) fällt auf, dass diese im Vergleich zum Kontrollstamm FgPH1-GFP VF ein signifikant verstärktes Wachstum zeigen (etwa 10 %). Unter osmotischem Stress zeigt sich diese Verstärkung noch durch eine geringere Reduktion des Wachstums bis 0,8 M NaCl, bei höheren Konzentrationen reduziert sich das Wachstum im gleichen Maße wie beim Kontrollstamm (Abbildung 28A und C).

Werden die Transformanten FgPH1-AlcA-P2.8 und FgPH1-AlcA-P2.9 oxidativem Stress durch steigende H₂O₂-Konzentrationen ausgesetzt, so zeigt sich, dass deren Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm FgPH1-GFP VF signifikant stärker reduziert wird

(Abbildung 28B). So reduziert sich das Wachstum bei 10 mM H₂O₂ um etwa 11 %, bei 15 mM um 24 % und bei 20 mM um etwa 10 % (Abbildung 28D).

3.5.1.4 Wachstumstest der P3-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ)

Das Wachstum der *F. graminearum*-Transformanden FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 sowie der Transformande Fg8.1-ΔGluA-P3.5, die sich in dem Hintergrund des Laborstammes Fg8.1 befindet, sollte unter Normalbedingungen (2.2.1.1) sowie unter osmotischem und oxidativem Stress (2.2.4.1) untersucht werden. Dabei wurde CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) für die Transformanden im FgPH1-Hintergrund verwendet und CM-Festmedium (2.1.5) für die im Fg8.1-Hintergrund.

Die *F. graminearum*-Transformanden FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 weisen unter Normalbedingungen (CM-Festmedium (2.1.5)) eine hoch signifikante Reduktion des Wachstums um etwa 20 % im Vergleich zum Kontrollstamm FgPH1-GFP VF auf. Dies wird in der Zusammenstellung typischer Kolonien der Transformanden (Abbildung 29A und B) sowie durch die Darstellung der mittleren Durchmesser der Kolonien (Abbildung 29C und D) deutlich. Auffällig ist außerdem, dass im mittleren Bereich der Kolonien, wo sich das ältere Myzel befindet, verstärkte Luftmyzelbildung beobachtet werden kann (siehe z.B. FgPH1-AlcA-P3.11, 0 M NaCl; Abbildung 29A).

Unter osmotischem Stress ist die Reduktion des Wachstums der Transformanden signifikant stärker als beim Kontrollstamm (Abbildung 29A). Bei einer Zugabe von 0,8 M NaCl ist das Wachstum um etwa 35 % reduziert und bei 1,2 M NaCl um 44 %. Bei einer Zugabe von 1,5 M NaCl sind es 33 %, sodass der Phänotyp der Mutante eher dem des virusinfizierten Kontrollstammes FgPH1-GFP VI entspricht als dem des virusfreien Stammes (Abbildung 29C).

Unter oxidativem Stress ist die Reduktion der Transformanden ebenfalls signifikant stärker als beim Kontrollstamm (Abbildung 29B). Bei einer Zugabe von 10 mM H₂O₂ ist die Reduktion um etwa 13 % stärker, bei 15 mM H₂O₂ sind es etwa 35 % und bei 20 mM H₂O₂ etwa 55 % (Abbildung 29D).

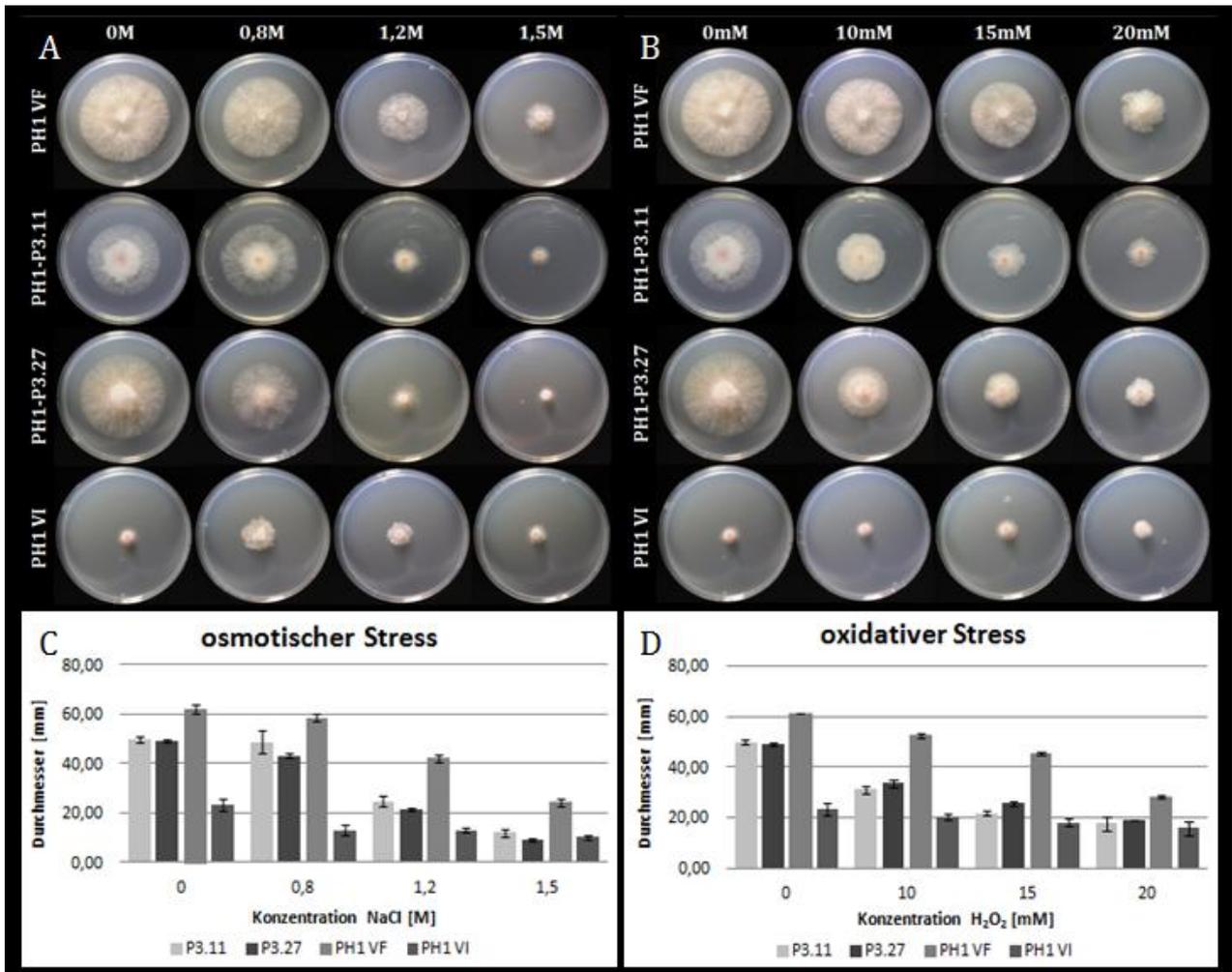


Abbildung 29: Wachstumstest der *F. graminearum*-Transformanten FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen. CM-Induktions-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

Die *F. graminearum*-Transformante Fg8.1-ΔGluA-P3.5 weist unter Normalbedingungen eine signifikante Reduktion des Wachstums um 28 % im Vergleich zum Kontrollstamm Fg8.1 VF auf (Abbildung 30). Auch die signifikante Erhöhung des Wachstums bei Zugabe von 0,8 M NaCl in CM-Festmedium im Vergleich zur Anzucht unter Normalbedingungen, wie es bereits beim Vergleich von FgCh9 und FgPH1 (3.5.1.1) beobachtet wurde, konnte hier festgestellt werden.

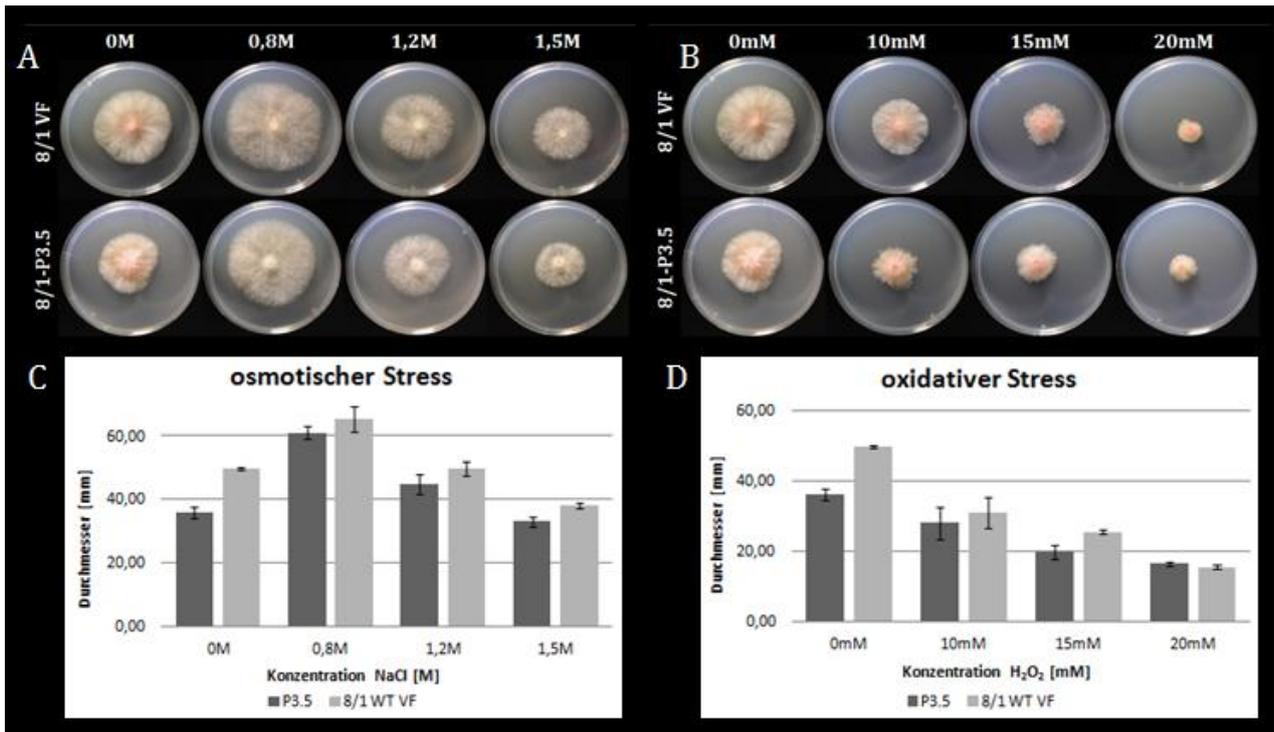


Abbildung 30: Wachstumstest der *F. graminearum*-Transformante Fg8/1-ΔGluA-P3.5 im Vergleich zum Kontrollstamm Fg8/1 VFI unter Stressbedingungen. CM-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

Unter osmotischem Stress ist eine Tendenz zu erkennen, dass die Transformante Fg8.1-ΔGluA-P3.5 ein leicht reduziertes Wachstum im Vergleich zum Kontrollstamm aufweist (Abbildung 30A). Dabei ist bei einer Zugabe von 1,5 M NaCl die signifikante Reduktion im Vergleich zum Kontrollstamm mit etwa 13 % am ausgeprägtesten (Abbildung 30C).

Unter oxidativem Stress ist ebenfalls eine Tendenz zu erkennen, dass das Wachstum der Transformante Fg8.1-ΔGluA-P3.5 im Vergleich zum Kontrollstamm weiter reduziert ist (Abbildung 30B). Dabei ist bei einer Zugabe von 15 mM H₂O₂ die signifikante Reduktion im Vergleich zum Kontrollstamm mit etwa 22 % am ausgeprägtesten (Abbildung 30D). Bei einer Zugabe von 20 mM H₂O₂ entspricht die Reduktion wiederum der des Kontrollstammes.

3.5.1.5 Wachstumstest der P4-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ)

Das Wachstum der *F. graminearum*-Transformanden FgPH1-AlcA-P4.2 und FgPH1-AlcA-P4.9 sollte unter Normalbedingungen (2.2.1.1) sowie unter osmotischem und

oxidativem Stress (2.2.4.1) untersucht werden. Dabei wurde CM-Induktions-Festmedium (2.1.5) verwendet.

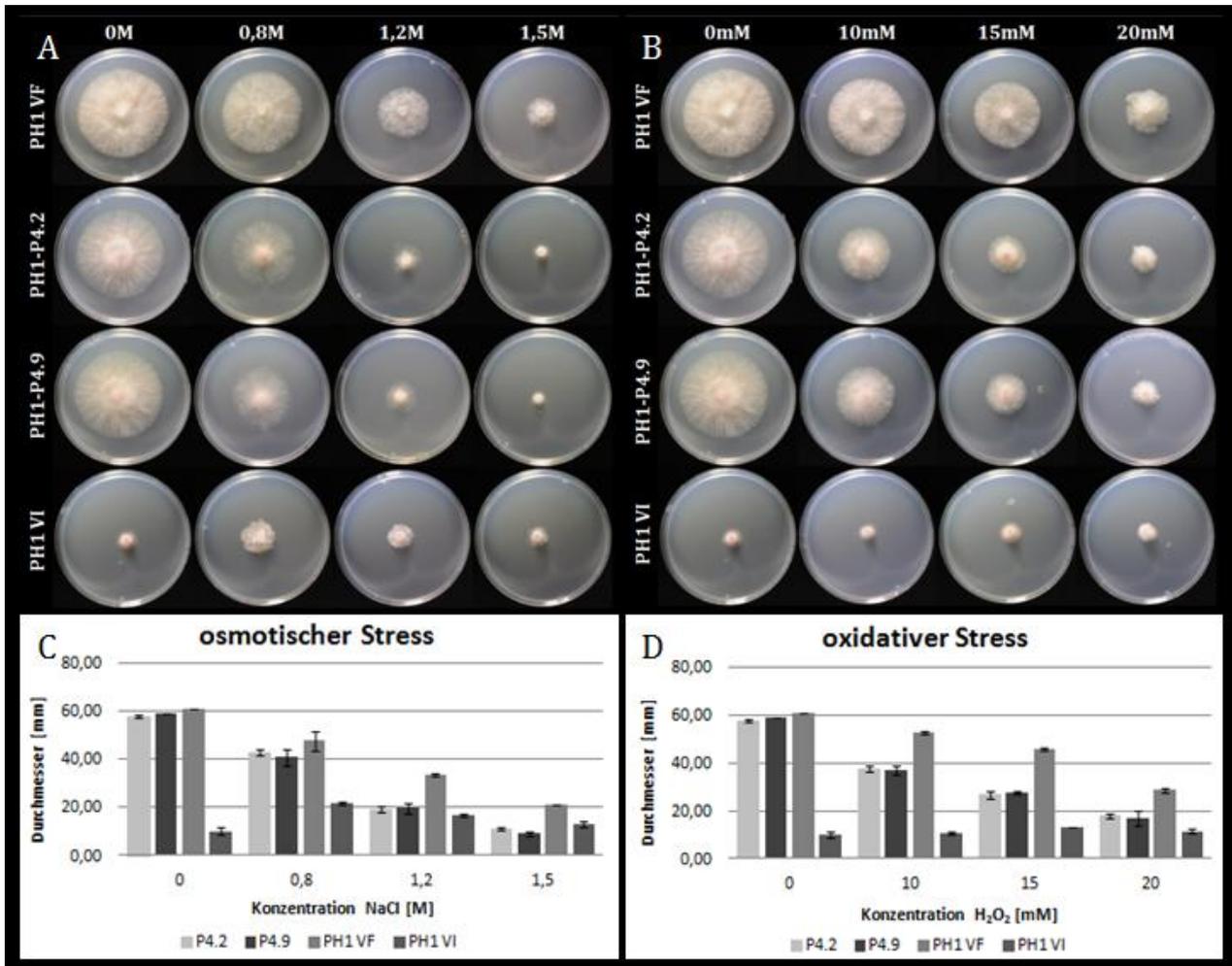


Abbildung 31: Wachstumstest der *F. graminearum*-Transformanten FgPH1-AlcA-P4.2 und FgPH1-AlcA-P4.9 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen. CM-Induktions-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

Die *F. graminearum*-Transformanten FgPH1-AlcA-P4.2 und FgPH1-AlcA-P4.9 zeigen unter Normalbedingungen den gleichen Phänotyp wie der Kontrollstamm FgPH1-GFP VF (Abbildung 31).

Unter osmotischem Stress ist eine stark signifikante Reduktion des Wachstums der Transformanten im Vergleich zum Kontrollstamm zu erkennen (Abbildung 31A). Dabei ist die Reduktion des Wachstums bei einer Zugabe von 0,8 M NaCl um etwa 16 % verstärkt, während bei 1,2 M NaCl das Wachstum um weitere 41 % reduziert ist. Bei

1,5 M NaCl sind es etwa 50 %, sodass die Kolonien mehr denen des virusinfizierten Kontrollstammes FgPH1-GFP VI ähneln (Abbildung 31C).

Unter oxidativem Stress zeigen die Transformanden ebenfalls eine stark signifikante Reduktion des Wachstums im Vergleich zum Kontrollstamm (Abbildung 31B). Das Wachstum der Transformanden bei einer Zugabe von 10 mM H₂O₂ ist um etwa 29 % vermindert. Bei einer Zugabe von 15 mM H₂O₂ liegt eine Verringerung des Wachstums um etwa 40 % vor, während es bei 20 mM H₂O₂ etwa 38 % sind (Abbildung 31D).

3.5.1.6 Wachstumstest der P5-Expressionsmutanten unter Normal- und Stressbedingungen (osmotisch und oxidativ)

Das Wachstum der *F. graminearum*-Transformanden FgPH1-ΔGluA-P5.2 und FgPH1-ΔGluA-P5.6 sollte unter Normalbedingungen (2.2.1.1) sowie unter osmotischem und oxidativem Stress (2.2.4.1) untersucht werden. Dabei wurde CM-Festmedium (2.1.5) verwendet.

Die *F. graminearum*-Transformanden FgPH1-ΔGluA-P5.2 und FgPH1-ΔGluA-P5.6 zeigen unter Normalbedingungen eine signifikante Reduktion von etwa 10 % im Vergleich zum Kontrollstamm FgPH1-GFP VF (Abbildung 32). Darüber hinaus ist die Form der Kolonien nicht völlig radial, sie wirken asymmetrisch.

Unter osmotischem Stress ist zunächst ein tendenzieller Anstieg des Wachstums im Vergleich zum Kontrollstamm zu erkennen, der über den bereits erwähnten Anstieg bei Zugabe von 0,8 M NaCl hinausgeht (Abbildung 32A). Bei einer Zugabe von 1,2 M NaCl ist ein signifikanter Anstieg des Wachstums von etwa 10 % zu erkennen, bei einer Zugabe von 1,5 M NaCl beträgt die Steigerung etwa 20 % (Abbildung 32C).

Unter oxidativem Stress zeigen die Transformanden zunächst eine Tendenz zur Reduktion des Wachstums in Vergleich zum Kontrollstamm (Abbildung 32B). Das Wachstum der Transformanden bei einer Zugabe von 15 mM H₂O₂ ist um etwa 15 % vermindert, während eine Zugabe von 20 mM H₂O₂ zu einer Verringerung des Wachstums um etwa 22 % führt (Abbildung 32D).

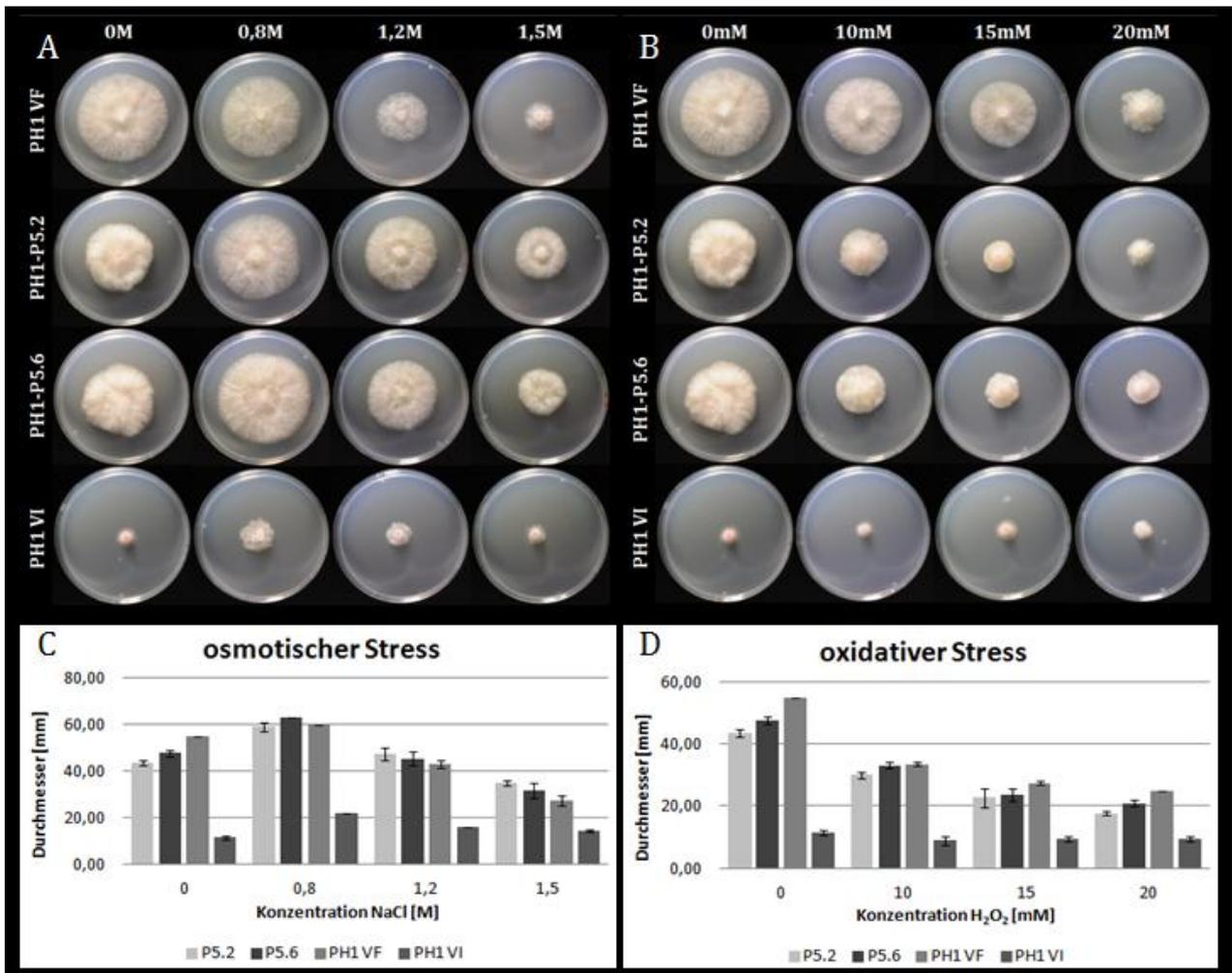


Abbildung 32: Wachstumstest der *F. graminearum*-Transformanten FgPH1- Δ GluA-P5.2 und FgPH1- Δ GluA-P5.6 im Vergleich zu den Kontrollstämmen FgPH1-GFP VF und FgPH1-GFP VI unter Stressbedingungen. CM-Festmedium; 3 dpi

A: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl

B: Vergleich des Phänotyps der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂

C: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter osmotischem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,8 M, 1,2 M und 1,5 M NaCl; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

D: Mittlerer Durchmesser der Kolonien unter oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 10 mM, 15 mM und 20 mM H₂O₂; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=6

3.5.2 Einfluss der viralen Proteine von FgV-ch9 in *Fusarium graminearum* auf die Infektiosität auf Weizen

Es wurde überprüft, in welchem Ausmaß die Expression der ORFs des Virus FgV-ch9 in *F. graminearum* die Infektion ihres natürlichen Wirtes, *Triticum aestivum*, beeinflusst. Dazu wurde für Mutanten des Stammes FgPH1 mit 500 Konidien und für Mutanten des Stammes Fg8.1 mit 200 Konidien ein frisch erblühtes Ährchen punktinokuliert und für 21 Tage inkubiert (2.2.4.2). Es wurde das Verhältnis von infizierten zu nicht-infizierten Ährchen je Ähre betrachtet und als Infektionsstärke bezeichnet.

Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm).

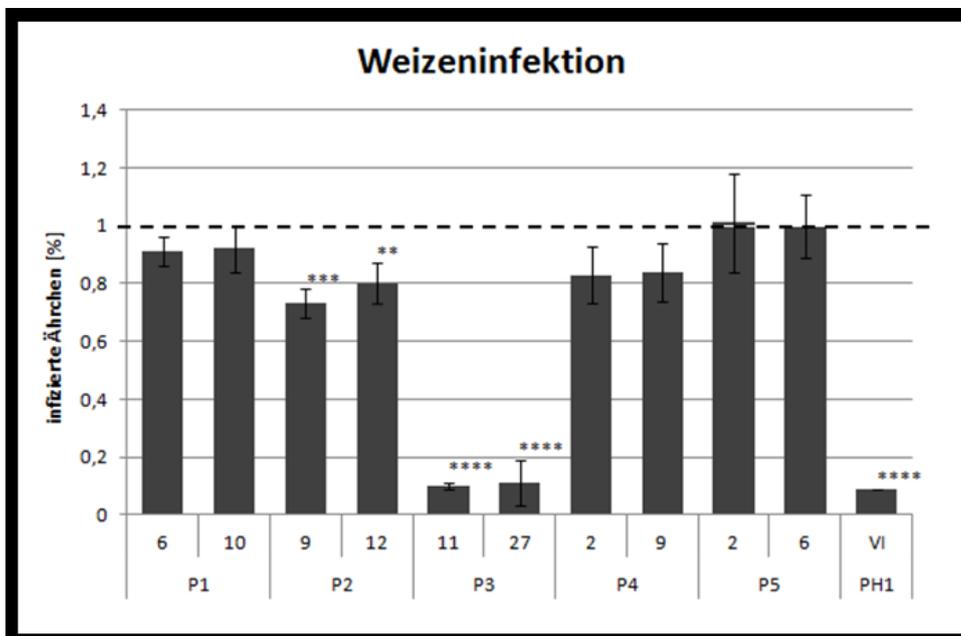


Abbildung 33: Statistische Analyse der Infektionsstärke von Fusarium-Mutanten, die die ORFs 1-5 von FgV-ch9 exprimieren. Die Werte berechnen sich aus dem Verhältnis von infizierten zu nicht infizierten Ährchen innerhalb einer Ähre und wurden zum Wildtyp FgPH1 VF in Relation gesetzt (FgPH1 VF = 1; gestrichelte Linie).

Die statistische Signifikanz, bezogen auf den Wildtyp FgPH1 VF, wurde unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm) geprüft: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=15$

Die Schadbilder der Infektionen von P1-, P4- und P5-exprimierenden Mutanten auf Weizen unterscheidet sich nicht signifikant von dem des Wildtyps FgPH1 VF; durchschnittlich ergibt sich für P1 eine Infektionsstärke von etwa 90 % und für P4 eine von etwa 85 %. Die Infektionsstärke für P5 entspricht der des Wildtyps (Abbildung 33). Das Schadbild der Infektion von P2-exprimierenden Mutanten auf Weizen ist nicht so stark ausgeprägt wie beim Wildtyp. Die Infektionsstärke beträgt bei den P2-exprimierenden Mutanten etwa 75-80 % und unterscheidet sich damit signifikant vom Wildtyp (Abbildung 33).



Abbildung 34: Schadbilder von Weizenähren nach Infektion mit P3-exprimierenden *F. graminearum*-Mutanten, 21 dpi. Als Positivkontrolle diente FgPH1 VF bzw. Fg8/1 (Infektionsstärke = 1) und als Negativkontrolle wurde mit Wasser inokuliert (keine Symptome einer Infektion). Desweiteren wurde zum Vergleich der virusinfizierte Stamm FgPH1 VI verwendet. Der rote Punkt markiert die inokulierten Ährchen.

A: Inokulation mit den P3-Mutanten im FgPH1-Hintergrund: FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27

B: Inokulation mit einer P3-Mutante im Fg8.1-Hintergrund: Fg8.1-ΔGluA-P3.5

Beim Vergleich der Schadbilder von P3-Expressionsmutanten mit den entsprechenden Wildtypen FgPH1 VF und Fg8.1 VF werden deutliche Unterschiede sichtbar. Sowohl bei einer Expression im Stamm FgPH1 (Abbildung 34A) als auch in Fg8.1 (Abbildung 34B) zeigen nur die beiden inokulierten Ährchen (markiert mit einem roten Punkt) Symptome. Bei einer Infektion mit dem mit FgV-ch9 infizierten Stamm FgPH1 VI zeigen ebenfalls nur die beiden inokulierten Ährchen Symptome (Abbildung 34A). Diese Stämme haben eine Infektionsrate von etwa 10 % und sind in ihrer Infektionsstärke somit hoch signifikant reduziert.

3.5.3 Untersuchung der reduzierten Infektiosität bei P3-exprimierenden Mutanten und dem virusinfizierten Wildtyp FgPH1 VI

Da die Infektion der P3-exprimierenden Mutanten FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 sowie des mit FgV-ch9 infizierten Wildtyps FgPH1 VI auf das inokulierte Ährchen beschränkt war (3.5.2), wurde die Ausbreitung des Myzels innerhalb des Ährchens und der angrenzenden Bereiche (3.5.3.1) sowie die Fähigkeit der Bildung von Infektionsstrukturen untersucht (3.5.3.2). Darüber hinaus wurden zwei bekannte Virulenzfaktoren, das Mykotoxin Deoxynivalenol (DON) (3.5.3.3) und die Lipase FGL1 (FGSG_05906; 3.5.3.4), näher betrachtet. Wenn einer dieser Faktoren nicht vorhanden ist, verbleibt die Infektion ebenfalls im inokulierten Ährchen.

3.5.3.1 Untersuchung der Ausbreitung des Myzels innerhalb von Weizenähren

Es wurde untersucht, ob das Myzel von den P3-exprimierenden Mutanten FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 sowie des virusinfizierten Wildtyps FgPH1 VI das erste inokulierte Ährchen über den Rachisknoten verlassen kann. Getestet wurde dies, indem Längsschnitte der inokulierten Ährchen, 10 dpi, unter einem Stereomikroskop betrachtet wurden (2.2.4.2).

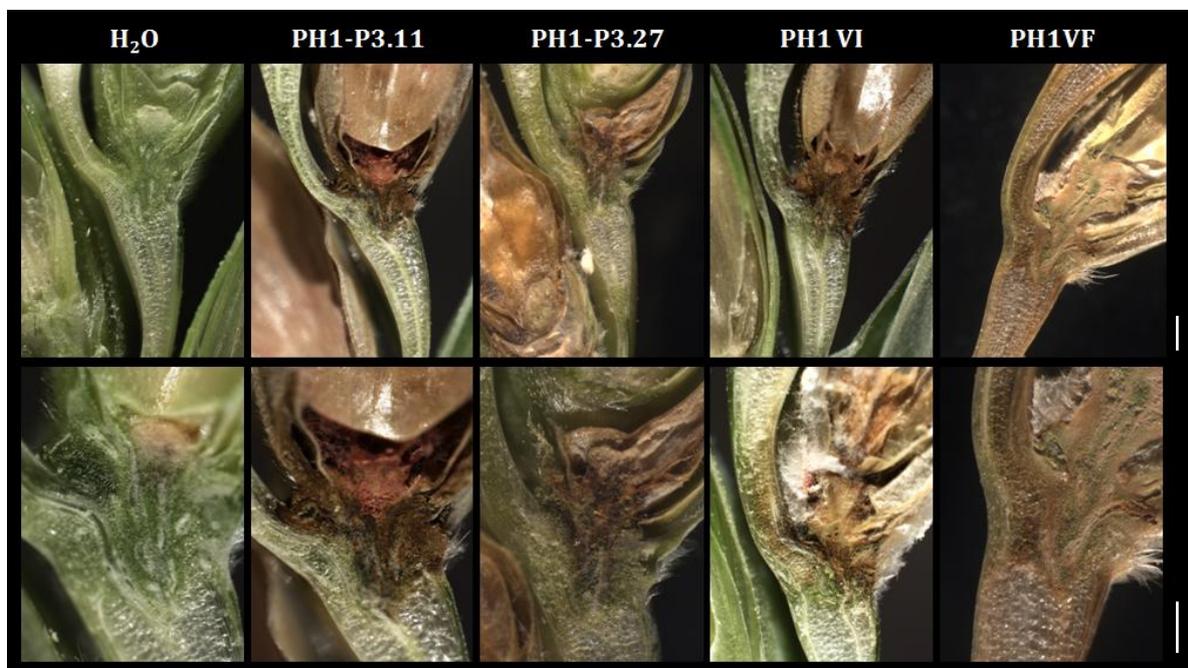


Abbildung 35: Längsschnitte von mit P3-Expressionsstämmen von *F. graminearum* und Vergleichsstämmen inokulierten Ährchen nach 10 dpi. Als Positivkontrolle diente FgPH1 VF (vollständig infiziert) und als Negativkontrolle wurde mit Wasser inokuliert (keine Symptome einer Infektion). Der Maßstab (weißer Strich) in der oberen sowie in der unteren Reihe entspricht 1 mm.

Bei einer Inokulation mit Wasser ist kein nekrotisches Gewebe zu erkennen (Abbildung 35, H₂O), während das Myzel bei der Infektion mit dem Wildtypstamm FgPH1 VF das erste Ährchen bereits verlassen hat und das Gewebe vollständig nekrotisiert ist (FgPH1 VF). Bei den P3-exprimierenden Stämmen FgPH1-AlcA-P3.11, FgPH1-AlcA-P3.27 und dem virusinfizierten Stamm FgPH1 VI ist deutlich zu erkennen, dass das Gewebe oberhalb der Rachis sowie der Rachisknoten stark nekrotisch ist (Abbildung 35). Auffällig ist, dass das Gewebe unterhalb des Rachisknoten keine Nekrosen zeigt, sondern dem der Wasserinokulation entspricht.

3.5.3.2 Einfluss der Expression von viralen Proteinen in FgPH1 auf die Bildung von Infektionskissen

Die Anzucht der Infektionskissen erfolgte auf zwei unterschiedlichen Geweben, den Hüllspelzen (Glumae) und den Vorspelzen (Paleae) mit je 100 Konidien (2.2.4.4). Die Färbung des Myzels erfolgte nach 4 bis 8 Tagen dpi, mit dem Farbstoff 0,1 % (w/v) Trypanblau (2.2.4.4), der pilzliches oder totes Gewebe anfärbt. Infektionskissen der verschiedenen Mutanten, die Proteine von FgV-ch9 exprimieren, sowie vom Wildtyp FgPH1 VF und dem virusinfizierten FgPH1 VI sind in Abbildung 36 gezeigt.

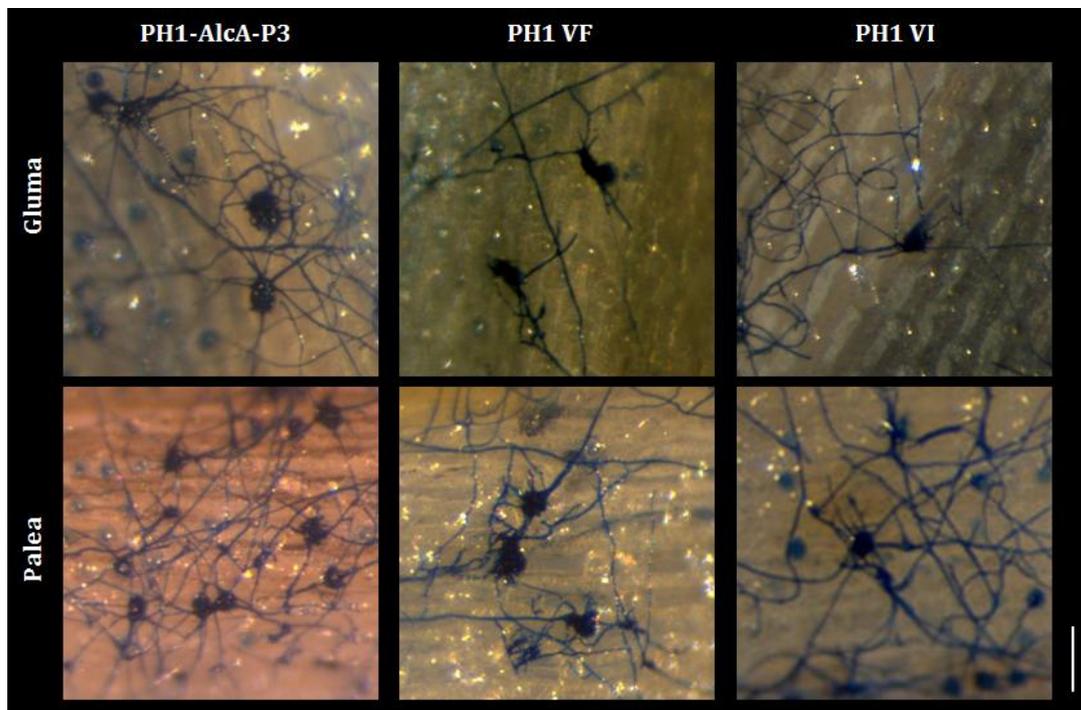


Abbildung 36: Infektionskissen von Fusarium-Mutanten, die P3 von FgV-ch9 exprimieren, sowie FgPH1 VF und FgPH1 VI. Inokuliert wurden Hüllspelzen (Glumae; obere Reihe) und Vorspelzen (Paleae; untere Reihe) mit je 100 Konidien. Die Färbung erfolgte mit 0,1 % (w/v) Trypanblau in 45 % Essigsäure; 5dpi. Der Maßstab (weiße Linie) entspricht einer Größe von 100 µm.

Bei allen untersuchten Stämmen konnten Infektionskissen gefunden werden, wobei durchgängig die meisten Infektionskissen auf Paleae gebildet wurden. Die P4-Expressionsmutanten bildeten auf Glumeae insgesamt die wenigsten Infektionskissen aus. Beispielhaft sind die Infektionskissen von einer P3-exprimierenden Mutante sowie von FgPH1 VF und FgPH1 VI in Abbildung 36 dargestellt.

3.5.3.3 Konzentration von Deoxynivalenol (DON) in infizierten Ährchen

Zur Bestimmung der Konzentration des Mykotoxins Deoxynivalenol (DON) wurden mit den Fusarium-Mutanten FgPH1-AlcA-P3.11 und FgPH1-AlcA-P3.27 sowie dem Wildtyp FgPH1 VF und dem FgV-ch9 infizierten Stamm FgPH1 VI Weizenähren inokuliert (2.2.4.2) und nach 10 dpi geerntet. In einem ELISA-basierenden Testsystem (2.2.4.3) wurde aus den inokulierten Ährchen die DON-Konzentration ermittelt. Vom gleichen Material wurde die identische Menge zur RNA-Extraktion (2.2.3.5) eingesetzt und mittels qPCR (2.2.3.7) mit den Primern Fg06611_fw und Fg06611_rev (2.1.2) der Anteil an Myzel und mit den Primern Wheat_GABA_for und Wheat_GABA_rev (2.1.2) der Anteil an Weizenmaterial in der jeweiligen Probe. Anschließend wurde das Verhältnis von DON zu Myzel berechnet und zur Menge im Wildtyp FgPH1 VF in Relation gesetzt.

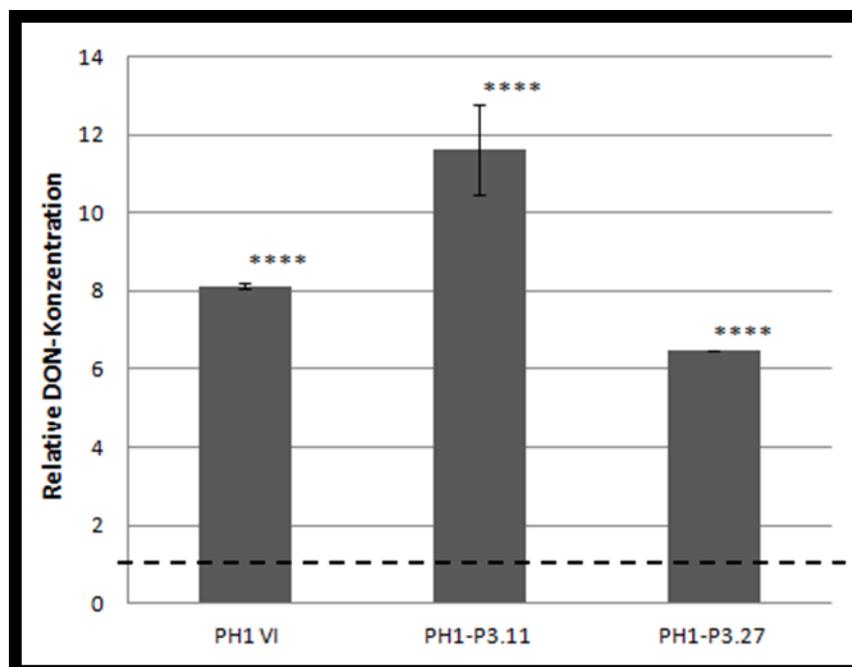


Abbildung 37: Analyse der relativen DON-Konzentration im Myzel von FgPH1-AlcA-P3.11, FgPH1-AlcA-P3.27 und FgPH1 VI. Die Werte berechnen sich aus dem Verhältnis von DON-Konzentration zu Myzelmenge und wurden zur Konzentration von DON im Wildtyp FgPH1 VF in Relation gesetzt (FgPH1 VF = 1; gestrichelte Linie).

Die statistische Signifikanz bezogen auf den Wildtyp FgPH1 VF wurde über einen Kruskal-Wallis H-Test mit angeschlossenem Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni) geprüft: ****P<0,0001; Fehlerbalken: Standardabweichung; n=3

Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte über einen Kruskal-Wallis H-Test mit angeschlossenem Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni).

Alle drei untersuchten Stämme weisen im Vergleich zum Wildtyp FgPH1 VF hochsignifikant höhere Konzentrationen an DON auf (Abbildung 37). Die DON-Konzentration in der Mutante FgPH1-AlcA-P3.27 ist um mehr als das 6-fache erhöht, in der Mutante FgPH1-AlcA.P3.11 sogar fast um das 12fache. In dem virusinfizierten Stamm ist die Konzentration um das 8fache erhöht.

3.5.3.4 Einfluss der Virusinfektion in FgPH1 auf die Transkription der Lipase FGL1 in infizierten Ährchen

Zur Überprüfung der Transkription der Lipase FGL1 (FGSG_05906) wurden Weizenähren mit den Stämmen FgPH1 VF, FgPH1 VI, FgCh9 LT und FgCh9 HT inokuliert (2.2.4.2) und nach 7 Tagen RNA extrahiert (2.2.3.5), in cDNA umgeschrieben (2.2.3.6) und mittels qPCR (2.2.3.7) mit den Primern qPCR_FGL1_for und qPCR-FGL1_rev (2.1.2) die Transkriptmenge der Lipase bestimmt. Die Werte wurden auf die Transkriptmenge des β -Tubulin-Gens bezogen. Diese Werte wurden über eine qPCR mit den Primern qPCR_FGL1_for und qPCR-FGL1_rev (2.1.2) erhalten.

Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm).

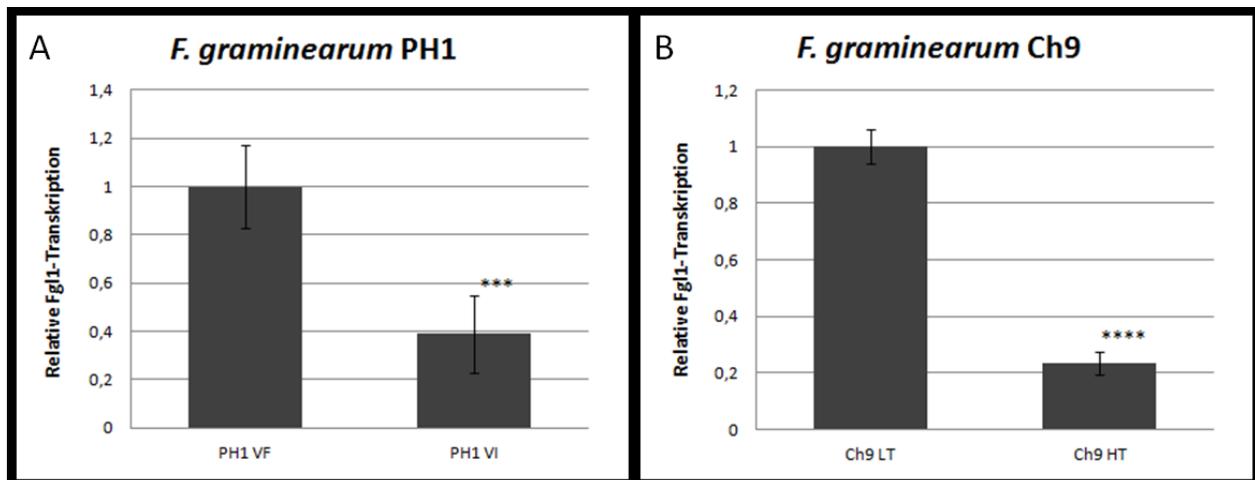


Abbildung 38: Analyse der relativen Transkription von FGL1 im Myzel der Fusariumstämme FgPH1 VF, FgPH1 VI, FgCh9 LT und FgCh9 HT. Die Werte wurden mittels qPCR erstellt und zur Transkription von FGL1 im Wildtyp PH1 VF (A) bzw. im Ch9 LT (B) in Relation gesetzt.

Die statistische Signifikanz bezogen auf den Wildtyp PH1 VF (A) bzw. Ch9 LT (B) wurde unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm) geprüft: *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=3$

A: Ergebnisse der qPCR bei Analyse des Stammes PH1

B: Ergebnisse der qPCR bei Analyse des Stammes Ch9

Die Ergebnisse der qPCR zeigen, dass die Transkripte von FGL1 im Stamm FgPH1 VI im Vergleich zum FgPH1 VF deutlich reduziert sind. Die Transkriptionsrate ist auf 40 % gesenkt (Abbildung 38A). Die verminderte Transkription lässt sich auch bei infiziertem

FgCh9 beobachten. In dem Stamm FgCh9 HT sind sogar nur 20 % der in FgCh9 LT vorhandenen Transkripte zu finden (Abbildung 38B). Beide Resultate sind signifikant.

3.5.4 Konidienbildung und -keimungsfähigkeit bei Expression von viralen Proteinen

Konidien werden bei der asexuellen Fortpflanzung gebildet und dienen dem Pilz als Überdauerungsstadium.

In diesem Experiment wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss die Expression viraler Proteine auf die Konidienbildung hat. Dazu wurden in Weizen-Medium angezogene Konidien suspensionen ausgezählt (2.2.1.3). Zusätzlich wurde die Keimfähigkeit der Konidien betrachtet (2.2.4.5). Untersucht wurden jeweils zwei Transformanden.

Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm).

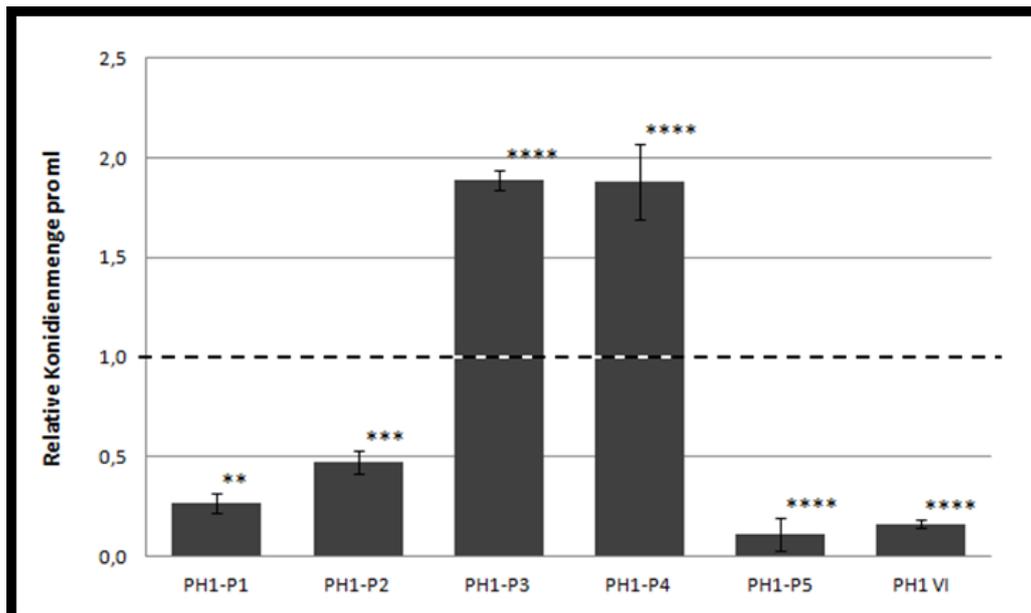


Abbildung 39: Statistische Analyse der relativen Konidienmenge von Fusarium-Mutanten. Die Werte berechnen sich aus den Mittelwerten der ausgezählten Suspensionen und wurden zur Menge des Wildtyps PH1 VF in Relation gesetzt (PH1 VF = 1; gestrichelte Linie).

Die statistische Signifikanz bezogen auf den Wildtyp PH1 VF wurde unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm) geprüft: ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=6$

Bei allen Mutanten konnten Konidien nachgewiesen werden und ihre Morphologie war durchgehend unauffällig (nicht gezeigt). Bei vier der sechs untersuchten Stämme war die Konidienproduktion signifikant verringert (Abbildung 39). P1-Expressionsmutanten zeigen durchschnittlich 30 % der Konidienmenge, wie sie im Wildtyp FgPH1 VF zu finden ist. Ähnlich verhält es sich mit den P2- und P5-Expressionsmutanten, die im

Durchschnitt 50 % bzw. 10 % der Menge im Wildtyp produzierter Konidien aufweisen. Auch der virusinfizierte Stamm FgPH1 VI bildet durchschnittlich nur etwa 20 % der Konidienmenge im Vergleich zum nicht infizierten Wildtyp aus. Anders verhält es sich mit den P3- und P4-Expressionsmutanten. Sie bilden im Vergleich zum Wildtyp doppelt so viele Konidien aus (Abbildung 39).

Die Keimungsraten der P1-, P2-, P4- und P5-exprimierenden Mutanten entsprechen etwa denen des Wildtyps FgPH1 VF (Abbildung 40). Die Keimungsrate bei den P3-exprimierenden Mutanten ist hingegen deutlich und signifikant reduziert. Bis zu 45 % der Konidien sind nicht in der Lage zu keimen (Abbildung 40). Ähnlich verhält es sich mit dem virusinfizierten Stamm FgPH1 VI. Bei diesem sind knapp 30 % der Konidien nicht fähig auszukeimen (Abbildung 40).

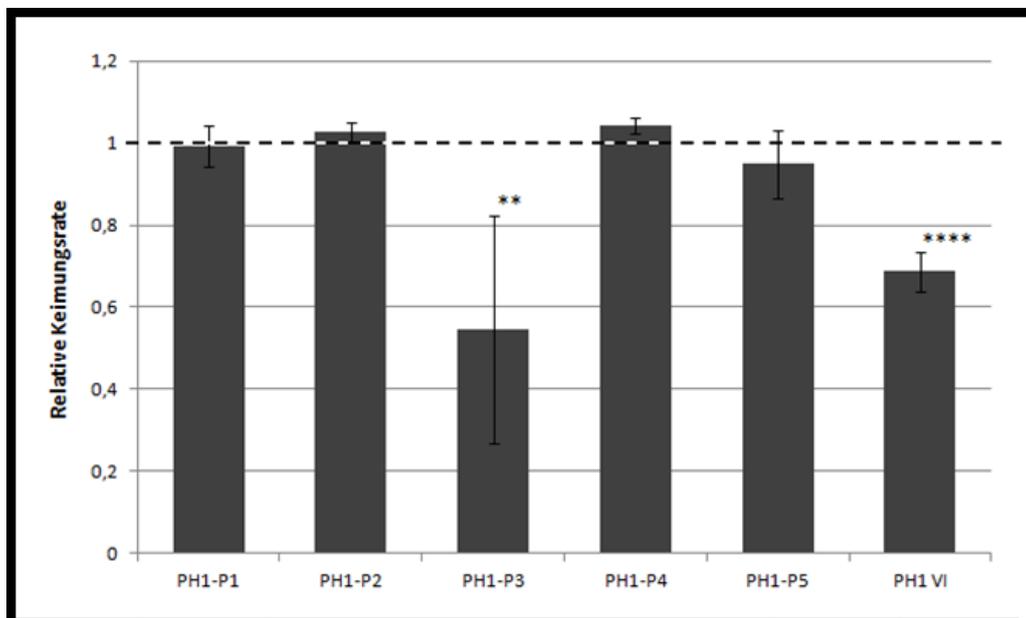


Abbildung 40: Statistische Auswertung der relativen Keimungsrate von Konidien. Die Werte berechnen sich aus den Mittelwerten der ausgezählten Konidien bezogen auf die Gesamtzahl der ausplattierten Konidien und sie wurden zur Keimungsrate des Wildtyps PH1 VF in Relation gesetzt (PH1 VF = 1; gestrichelte Linie).

Die statistische Signifikanz bezogen auf den Wildtyp PH1 VF wurde unter Anwendung einer einfaktoriellen ANOVA mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Bonferroni-Holm) geprüft: ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=9$

3.5.5 Perithezienformation bei Expression von viralen Proteinen

Perithezien werden bei der sexuellen Fortpflanzung gebildet und enthalten die haploiden Ascosporen. Es wurde untersucht, ob alle Fusarium-Mutanten, die einen ORF des Virus FgV-ch9 exprimieren, die Fähigkeit besitzen, Perithezien und Ascosporen zu bilden. Auch der Zeitpunkt des ersten Auftretens von Perithezien nach Inokulation der Weizenknospen wurde analysiert. Betrachtet wurden jeweils zwei Transformanten.

Bei allen untersuchten Mutanten sowie dem virusinfizierten Wildtyp FgPH1 VI konnten Perithezien beobachtet werden (Abbildung 41). Diese unterschieden sich auch in ihrem Aussehen kaum voneinander, in ihrer Größe allerdings schon. Die Perithezien des Wildtyps FgPH1 VF und FgPH1 VI sowie die der P1-, P3- und P5-exprimierenden Mutanten haben durchschnittlich eine Größe von etwa 0,3 mm. Die P2-exprimierenden Mutanten erzeugten relativ große Perithezien (0,4 mm), während die P4-exprimierenden Mutanten auffallend kleine Perithezien bildeten (0,15 mm). Darüber hinaus wurde in einem Keimungsassay (2.2.4.6) nachgewiesen, dass alle Mutanten und auch der virusinfizierte Wildtyp FgPH1 VI keimungsfähige Ascosporen erzeugten und diese bei Reife der Perithezien aus diesen herauskatapultierten.

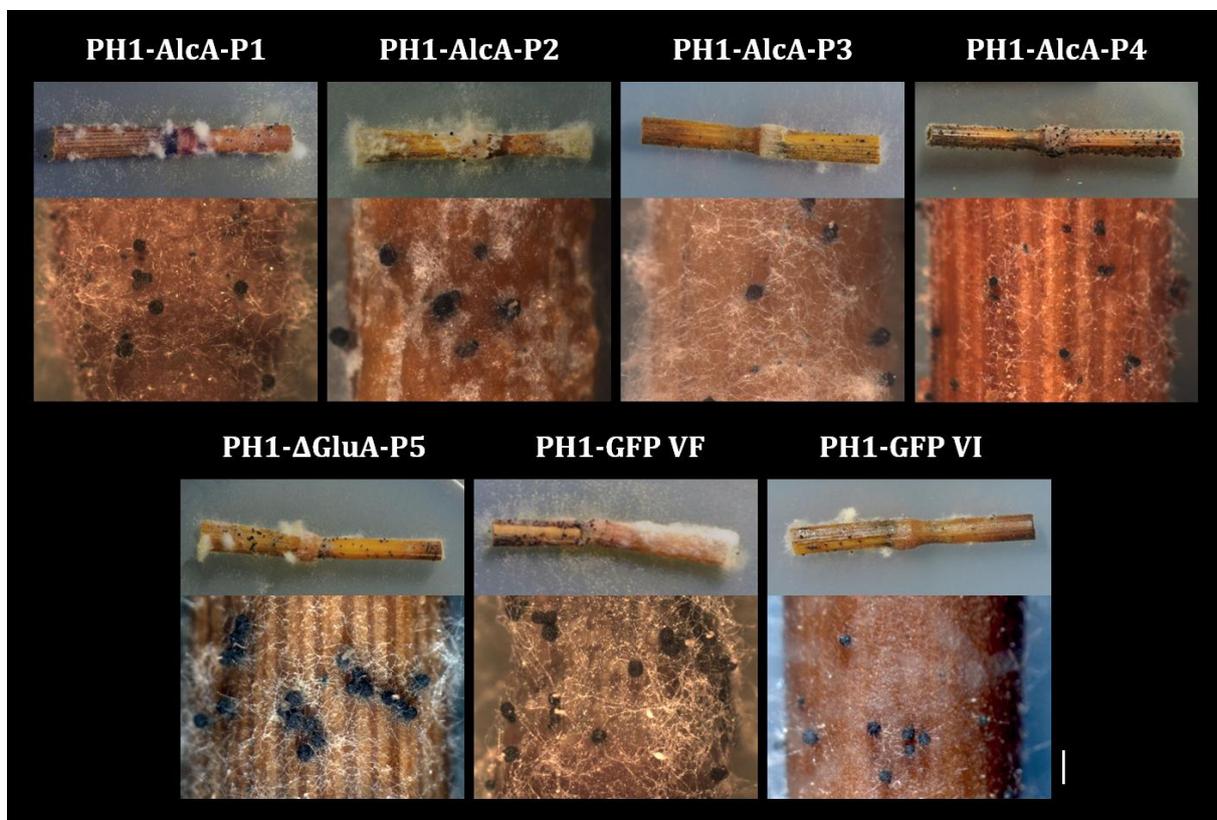


Abbildung 41: Perithezien von Fusarium-Mutanten, die die fünf ORFs von FgV-ch9 exprimieren, auf Weizennodien. Inokuliert wurden die Nodien mit je 100 Konidien. Der Maßstab (weiße Linie) entspricht einer Größe von 1 mm. Die Auswertung erfolgte zum jeweils ersten Auftreten der Perithezien im jeweiligen Stamm.

Auch ist der Zeitintervall des ersten Auftretens der Perithezien von Bedeutung (Abbildung 42). Der Wildtyp FgPH1 VF bildet im Zeitraum von 21-28 Tagen nach Inokulation Perithezien aus. Genauso verhalten sich die P2-Mutanten. Auch hier treten zwischen 21 und 28 Tagen die ersten Perithezien auf. Nur wenig früher, nach etwa 14-21 Tagen, zeigen sich Perithezien von P1-Mutanten. Deutlich früher werden die Perithezien bei den Expressionsmutanten von P3 und P5 sowie dem virusinfizierten

Wildtyp FgPH1 VI sichtbar, etwa nach 7-14 Tagen. Wirklich außergewöhnlich ist das Auftreten von Perithezien bei P4-Mutanten. Diese waren bereits nach etwa 5-7 Tagen vorhanden.

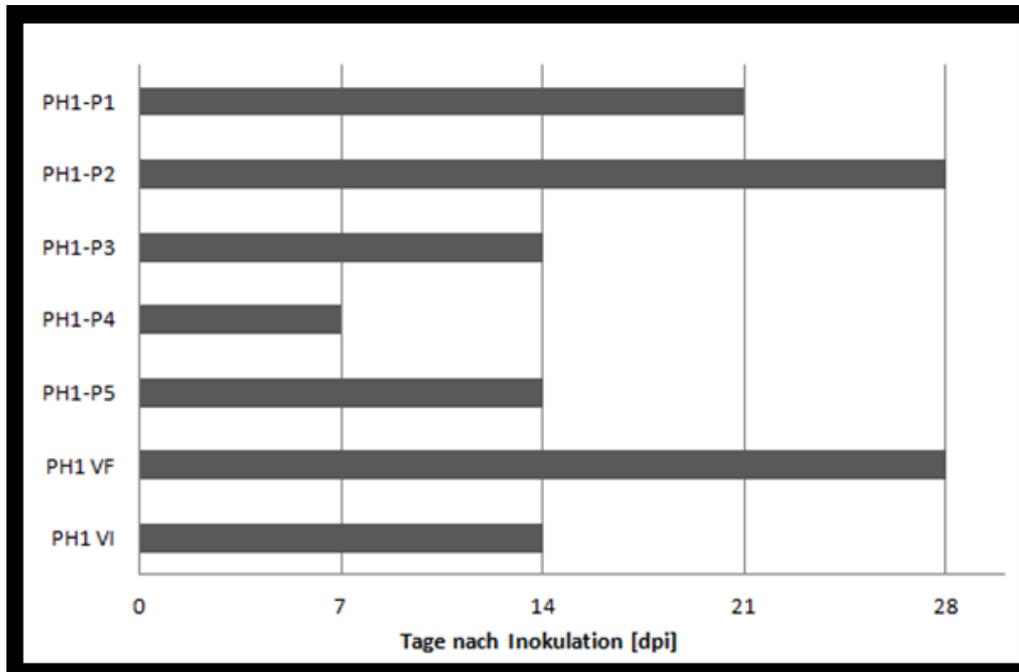


Abbildung 42: Grafische Darstellung der Zeitintervalle des ersten Auftretens von Perithezien nach Inokulation mit Konidien der Fusarium-Mutanten, die die fünf ORFs von FgV-ch9 exprimieren.

Es wurde außerdem untersucht, ob die Ascosporen des virusinfizierten Stammes FgPH1 VI Virus enthalten.

Zunächst wurde aus Ascosporen ausgekeimtes Myzel des virusinfizierten Stammes FgPH1 VI auf CM-Festmedium (2.1.5) phänotypisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die aus den Ascosporen auskeimenden Kolonien zwar noch immer signifikant kleiner als eine entsprechend virusfreie Wildtypkolonie von FgPH1 VF war, aber auch dem ursprünglichen Phänotyp eines infizierten Wildtyps (FgPH1 VI) nicht entsprechen (Abbildung 43, erste Reihe).

Es wurde RNA (2.2.3.5) aus diesen Kolonien gewonnen und über ein Agarosegel aufgetrennt (2.2.2.3). Deutlich sind beim infizierten Stamm FgPH1 VI die viralen dsRNA Banden mit einer Größe von etwa 3000 bis 3500 bp zu erkennen (Abbildung 43; PH1VI: roter Pfeil). Bei den untersuchten Kolonien aus Ascosporen sind diese Banden nicht zu finden (Abbildung 43, zweite Reihe).

Es folgte die Synthese von cDNA mit Random-Hexamer-Primern (2.2.3.6) und eine PCR (2.2.2.1) mit den virusspezifischen Primern 3116F und P3_Xho_1100 (2.1.2), die auf dem ORF von P3 binden. Es wurde eine Bande bei 666 bp berechnet. In Abbildung 43, dritte

Reihe, ist eine deutliche Bande von etwa 650 bp zu erkennen, die in den anderen Proben nicht vorhanden ist.

Die Kontroll-PCR mit den Primern Fg06611_fw und Fg06611_rev (2.1.2), die auf dem ORF des β -Tubulins von *F. graminearum* binden, zeigt bei jeder Kolonie eine Bande bei 184 bp (Abbildung 43, vierte Reihe).

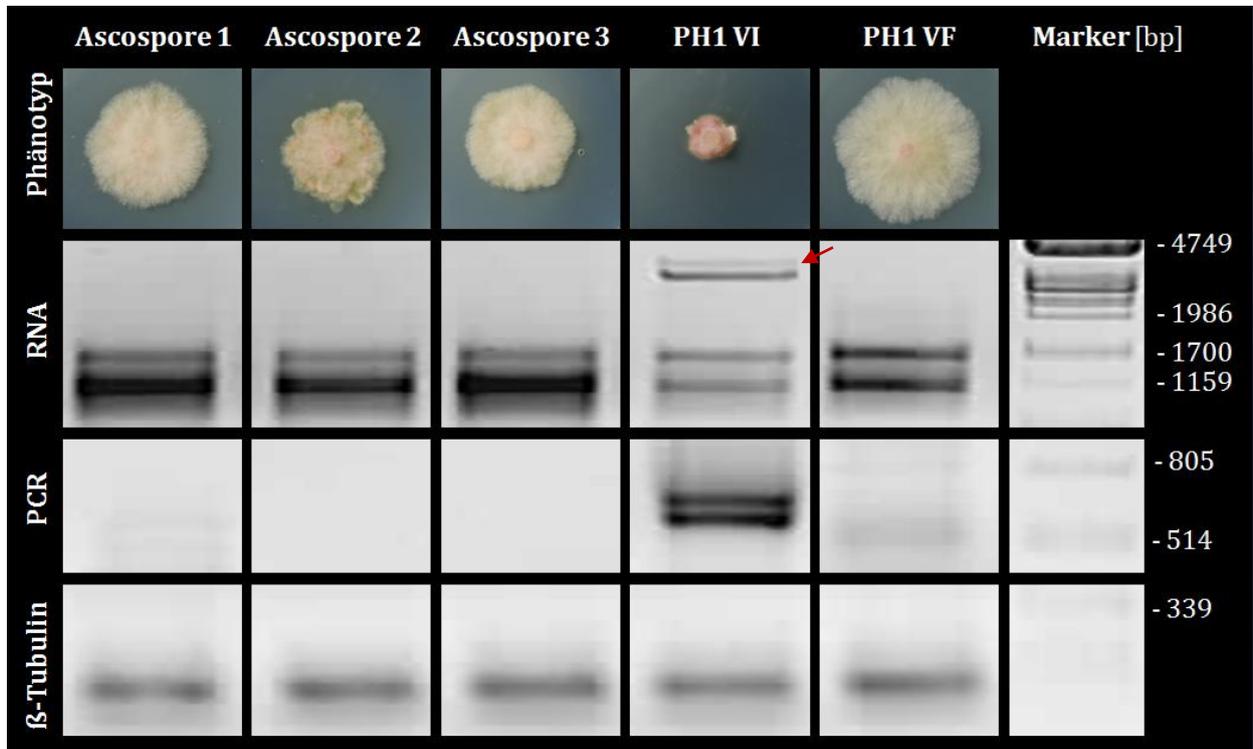


Abbildung 43: Untersuchung zum Virustiter in aus Ascosporen ausgekeimtem Myzel. Dargestellt sind 3 von 25 untersuchten Kolonien. Marker: λ DNA restringiert mit PstI.

Phänotyp: Analyse der Phänotypen der drei Kolonien im Vergleich zum infizierten und virusfreien Wildtyp

RNA: Darstellung der aus Myzel extrahierten RNA (roter Pfeil: virale dsRNA Banden)

PCR: Ergebnis einer PCR mit virusspezifischen Primern (binden auf ORF P3)

β -Tubulin: Ergebnis einer Kontroll-PCR mit β -Tubulin-Primern

Bei 25 untersuchten Ascosporen zeigte sich keine, bei der die viralen Segmente bereits in einem Agarosegel nachgewiesen werden konnten. Auch mittels PCR konnte keine Virusinfektion gezeigt werden.

3.6 Nachweis der *gene silencing* Suppressor-Funktion von P5

Das Protein P5, das auf RNA5 kodiert ist, weist sechs Zinkfinger-Domänen des Typs C₂H₂ auf. Zinkfinger-Domänen können dsRNAs binden und weisen auf eine Funktion des Proteins als *gene silencing* Suppressor hin. Erste Versuche haben auch bereits gezeigt, dass ein unvollständiges P5 eine solche Funktion hat (Blum, 2012). In den folgenden Versuchen sollte die Funktion von P5 im heterologen System *Nicotiana benthamiana* bestätigt und mit der Wirkung der anderen vier Proteine von FgV-ch9 verglichen werden (3.6.1). Außerdem sollte überprüft werden, ob die *gene silencing* Suppression auch im natürlichen Wirt *Fusarium graminearum* funktioniert (3.6.2).

3.6.1 Überprüfung der *gene silencing* Suppressor-Funktion von P1-P5 mit einem *Transient Expression Assay*

Die Überprüfung auf *gene silencing* Aktivität der Proteine von FgV-ch9 erfolgte durch einen *transient expression assay*. Dabei werden konstitutiv eGFP exprimierende *Nicotiana benthamiana* Domin. der Linie 16c (2.1.1.3) mit einem Gemisch aus *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 Mutanten infiltriert, die zum einen den *gene silencing inducer* (GFP) und zum anderen eines der Test-Proteine in dem Vektor pBIN19 unter der Kontrolle des 35S Promotors exprimieren. Handelt es sich bei dem Testprotein nicht um einen Suppressor wird die Expression von eGFP blockiert und die Fluoreszenz in den infiltrierten Bereichen nimmt ab. Besitzt das Testprotein hingegen eine Suppressor-Funktion wird das induzierte *gene silencing* unterdrückt, eGFP wird weiterhin exprimiert und die Fluoreszenz in den infiltrierten Bereichen bleibt bestehen. Als Positivkontrolle wurde der bekannte *gene silencing* Suppressor P19 (2.1.3) verwendet.

Aktivierete (2.2.5.1) *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme (3.2.4.1) wurden zu gleichen Teilen gemischt, sodass folgende Kombinationen in die Tabakblätter infiltriert (2.2.5.1) wurden:

Ansatz 1: GV3101-pBIN-[eGFP] + GV3101-(pBIN-P1)

Ansatz 2: GV3101-pBIN-[eGFP] + GV3101-(pBIN-P2)

Ansatz 3: GV3101-pBIN-[eGFP] + GV3101-(pBIN-P3)

Ansatz 4: GV3101-pBIN-[eGFP] + GV3101-(pBIN-P4)

Ansatz 5: GV3101-pBIN-[eGFP] + GV3101-(pBIN-P5)

Ansatz 6: GV3101-pBIN-[eGFP] + GV3101-pBIN-[P19]

Ansatz 7: GV3101-pBIN-[eGFP] + Infiltrationspuffer

Ansatz 8: Infiltrationspuffer

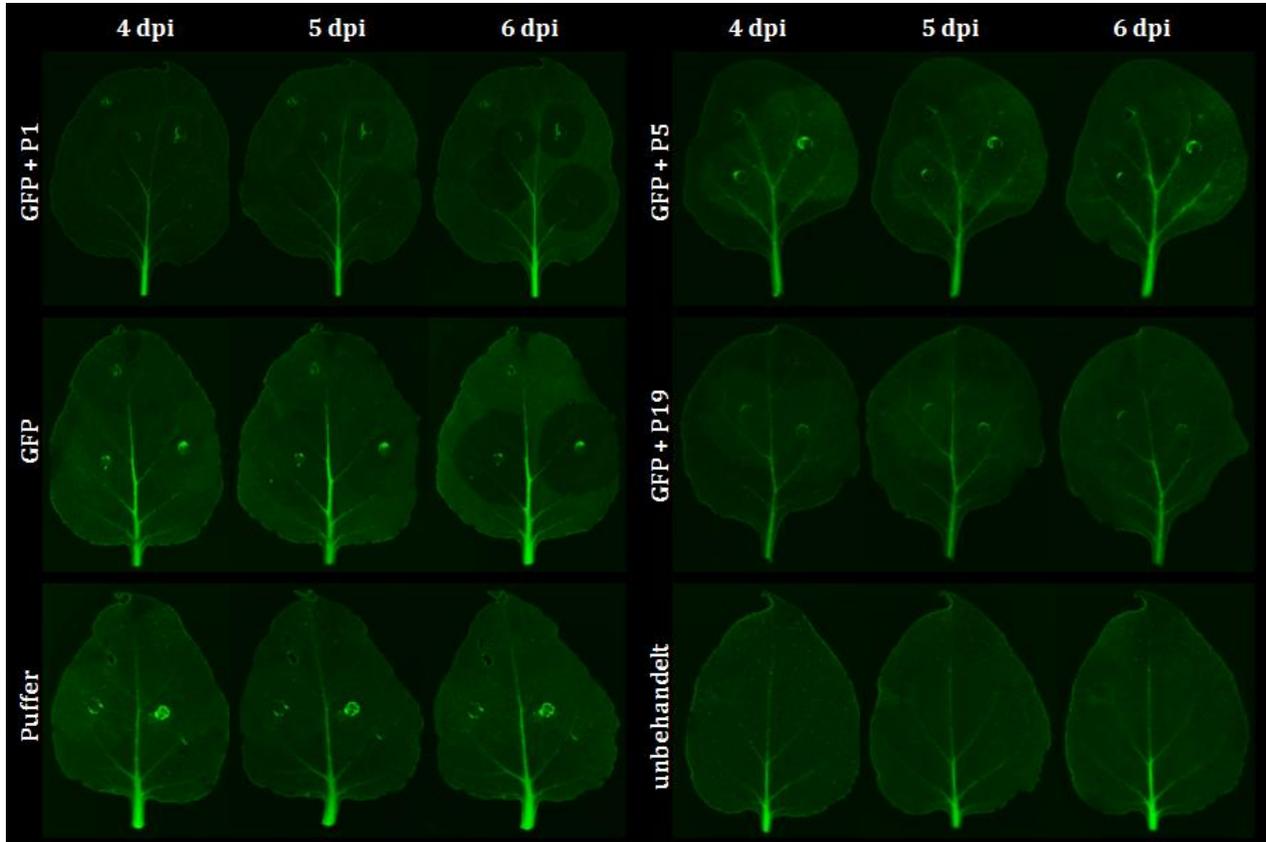


Abbildung 44: Detektion von GFP über 4-6 Tage in Blättern von *Nicotiana benthamiana* Linie 16c, infiltriert mit verschiedenen Agrobacterium-Stämmen zum Nachweis der *gene silencing* Suppression. Die verschiedenen Ansätze wurden im LAS (2.2.5.2) detektiert. n=50

Nach einer Inkubation von 4 Tagen wurden die infiltrierten Blätter geerntet, in einer feuchten Kammer gelagert und alle 24 h im LAS detektiert (2.2.5.2). Mit dem Bildanalyseprogramm „ImageJ“ wurde die Pixeldichte in den infiltrierten Bereichen gemessen und gegen die der unbehandelten Blätter verrechnet. Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung eines Kruskal-Wallis H-Tests mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni).

Bei einer gleichzeitigen Expression von eGFP und P1 ist nach 6 dpi deutlich ein Rückgang der Fluoreszenz, und damit des eGFPs, in den infiltrierten Bereichen zu erkennen. Der infiltrierte Bereich wird dunkler und die Fluoreszenz nimmt um mehr als 40 % ab (Abbildung 44, GFP + P1; Abbildung 45). Ein solcher Rückgang lässt sich nach 6 dpi auch bei den Blättern, die nur zusätzliches eGFP exprimieren, beobachten

(Abbildung 44, GFP). Hier geht die Fluoreszenz um mehr als 60 % zurück (Abbildung 45). Der Phänotyp der P2-P4 exprimierenden Blätter entspricht ebenfalls dem von P1 (nicht gezeigt). Anders verhält es sich bei der zeitgleichen Expression von eGFP und P5. Der infiltrierte Bereich zeigt nach 4 dpi und 5 dpi eine stärkere Fluoreszenz und unterscheidet sich nach 6 dpi nicht nennenswert von den umliegenden nicht infiltrierte Bereichen (Abbildung 44, GFP + P5). Gleiches gilt für den bekannten *gene silencing* Suppressor P19; auch hier ist zunächst eine stärkere Fluoreszenz zu erkennen, die sich nach 6dpi nicht mehr vom umliegenden Gewebe unterscheidet (Abbildung 44, GFP + P19). Die Pufferkontrolle unterscheidet sich nicht von unbehandelten Blättern und hat keinen Einfluss auf die Versuche (Abbildung 44, Puffer).

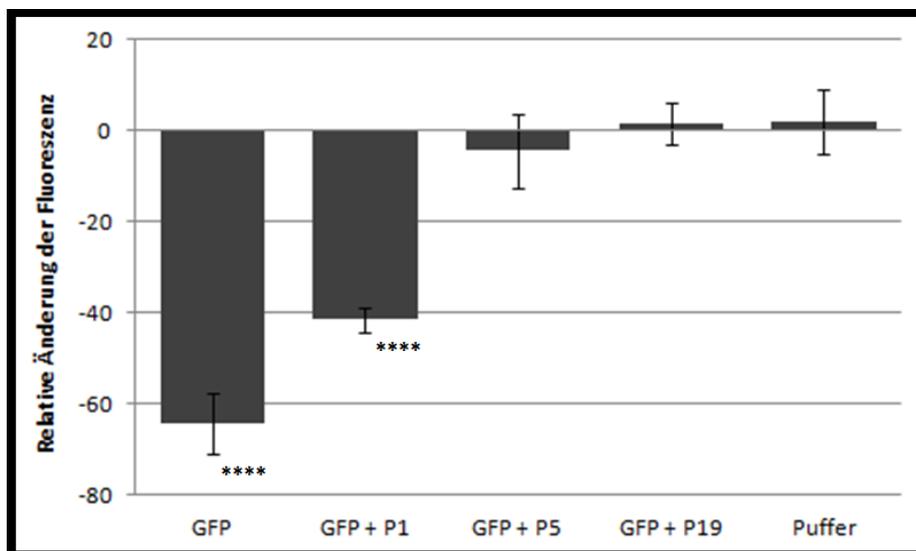


Abbildung 45: Relative Änderung der Fluoreszenz in den mit *A. tumefaciens* infiltrierte Bereiche der Blätter von *N. benthamiana* Linie 16c zum Nachweis von *gene silencing* Suppression, 6 nach der Infiltration. Die Werte wurden aus der gemessenen Pixeldichte (ImageJ, 2.2.5.2) berechnet und auf die Fluoreszenz der unbehandelten Blätter bezogen (Fluoreszenz der unbehandelten Blätter = 0).

Die statistische Signifikanz bezogen auf die Fluoreszenz im unbehandelten Blatt wurde unter Anwendung eines Kruskal-Wallis H-Test mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni) geprüft: **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=8$

3.6.2 Überprüfung der *gene silencing* Suppressor-Funktion von P5 in *Fusarium graminearum* mit einem Fluoreszenz Assay

Im *transient expression assay* konnte ermittelt werden, dass nur das virale Protein P5 von FgV-ch9 die Fluoreszenz des GFPs im Infiltrationsbereich von *Agrobacterium tumefaciens* konstant halten kann (3.6.1).

Zur weiteren Überprüfung in *Fusarium graminearum* wurde der *silencing*-Stamm FgPH1-SilentGFP (0) verwendet. In diesem konstitutiv eGFP exprimierenden Stamm wurde durch zusätzliche Integration eines Konstrukts, das dsRNA von eGFP

synthetisiert, die Expression von eGFP durch *gene silencing* unterdrückt. Von den drei vorhandenen Transformanten wurde die mit der geringsten Fluoreszenz verwendet. Zur Überprüfung der Wirkung von P5 wurde dieses unter der Kontrolle des 35S Promotors in dem *silencing*-Stamm exprimiert (2.2.3.1). Als Negativkontrolle wurde im gleichen Hintergrund die photoaktivierte Adenylatzyklase bPAC (2.1.3), die keine *gene silencing* Suppressor Funktion hat, exprimiert.

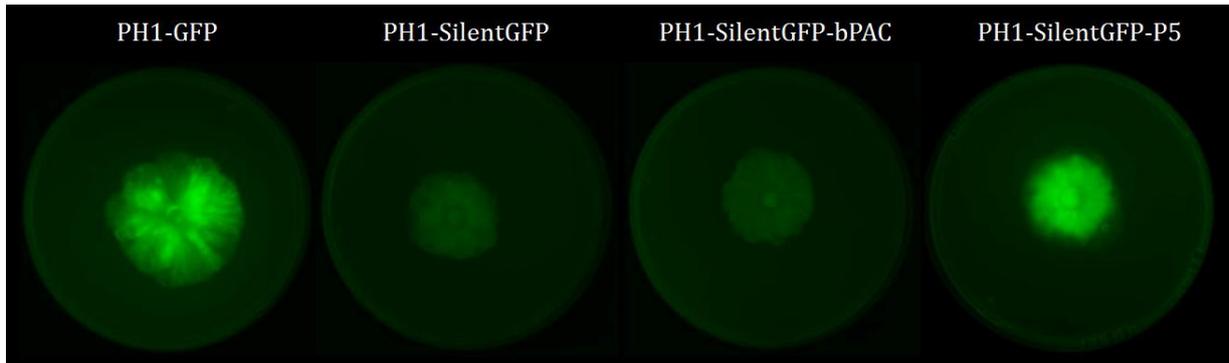


Abbildung 46: Detektion von GFP in Kolonien von *Fusarium graminearum* Mutanten auf CM-Festmedium zum Nachweis der *gene silencing suppressor* Aktivität von P5, 3 dpi. Die verschiedenen Mutanten wurden im LAS (2.2.5.2) detektiert.

Es wurden 3 Tage alte Kolonien von *F. graminearum* auf CM-Festmedium (2.1.5) im LAS (2.2.5.2) dokumentiert. Außerdem wurde in einem Fluoreszenz Assay auf Mikrotiterplatten (2.2.5.3) die Fluoreszenz gemessen. Die statistische Auswertung (2.2.5.4) erfolgte unter Anwendung eines Kruskal-Wallis H-Tests mit angeschlossenen Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni).

Der eGFP exprimierende Stamm FgPH1-GFP zeigt eine starke Fluoreszenz im gesamten Myzel (Abbildung 46). Der *silencing*-Stamm FgPH1-SilentGFP sowie der Kontrollstamm FgPH1-Silent-GFP-bPAC weisen eine starke Reduktion der Fluoreszenz auf (Abbildung 46). Sie nimmt in beiden Stämmen signifikant um mehr als 50 % ab (Abbildung 47). Der zusätzlich das Protein P5 exprimierende Stamm FgPH1-Silent-GFP-P5 zeigt wie FgPH1-GFP eine starke Fluoreszenz im gesamten Myzel (Abbildung 46). Es konnte sogar eine signifikante Steigerung der Fluoreszenz von etwa 20 % ermittelt werden (Abbildung 47).

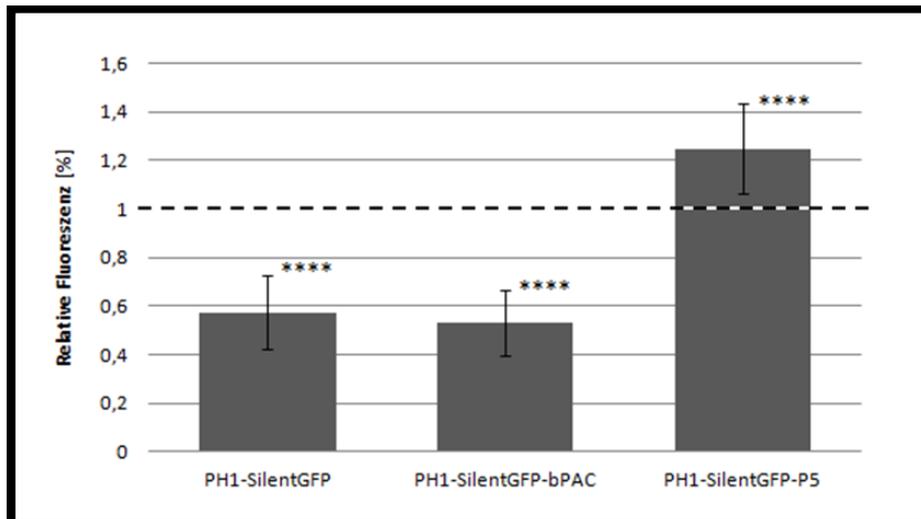


Abbildung 47: Statistische Auswertung der relativen Fluoreszenz von GFP, exprimiert im Mycel der *Fusarium graminearum* Mutanten PH1-GFP, PH1-SilentGFP, PH1-SilentGFP-bPAC und PH1-SilentGFP-P5. Die Werte berechnen sich aus den Mittelwerten der gemessenen Fluoreszenz und sie wurden zur Fluoreszenz von PH1-GFP VF in Relation gesetzt (PH1-GFP VF = 1; gestrichelte Linie).

Die statistische Signifikanz bezogen auf PH1-GFP VF wurde unter Anwendung eines Kruskal-Wallis H-Test mit angeschlossenem Post-Hoc-Test (Dunn-Bonferroni) geprüft: **** $P < 0,0001$; Fehlerbalken: Standardabweichung; $n=36$

4 Diskussion

Mykoviren sind weit verbreitet und infizieren ihren Wirt in der Regel ohne erkennbaren Phänotyp (Buck, 1986). Von besonderem Interesse sind jedoch diejenigen Viren, die die Virulenz eines pathogenen Wirts vermindern. Dieser Effekt nennt sich Hypovirulenz und soll für den Pflanzenschutz oder den medizinischen Bereich nutzbar gemacht werden. Sehr erfolgreich ist die Anwendung eines Mykovirus bei der Bekämpfung des Kastanienrindenkrebesses (*chestnut blight*) bei der Amerikanischen Kastanie (*Castanea dentata*), ausgelöst durch den Pilz *Cryphonectria parasitica* (Nuss, 1992). Aber auch bei Pilzkrankungen, die für landwirtschaftliche Kulturpflanzen von Bedeutung sind, wie beispielsweise die Weißstängeligkeit (*rapeseed stem rot*) bei Raps (*Brassica napus*), ausgelöst durch *Sclerotinia sclerotiorum* (Ju *et al.*, 2013; Xie & Jiang, 2014), oder der Wurzelschimmel (*white root rot*) bei diversen Reben und Obstgehölzen, ausgelöst durch *Rosellinia necatrix* (Chiba *et al.*, 2010), sind vielversprechende Ergebnisse erzielt worden.

Bei einem Isolat des Getreidepathogens *Fusarium graminearum* konnte ebenfalls eine Hypovirulenz beobachtet werden, ausgelöst durch das Mykovirus FgV-ch9 (Darissa *et al.*, 2012). Das Genom dieses dsRNA-Virus verfügt über fünf dsRNAs, auf denen jeweils ein ORF kodiert ist. Teilweise konnte den viralen Proteinen eine Funktion zugeordnet werden; so handelt es sich bei P1 um eine RdRP und bei P2 bzw. P3 um Strukturproteine (Darissa *et al.*, 2011). Im Folgenden sollen durch die heterologe Expression der fünf ORFs im natürlichen Wirt *F. graminearum* Rückschlüsse über die Sequenzen, den Syntheszeitpunkt sowie die Funktion der einzelnen viralen Proteine gezogen werden.

4.1 Duplikationen an den 3'-Termini der Segmente 2, 3 und 5 von FgV-ch9

Bei der Klonierung der fünf ORFs von FgV-ch9 in Expressionsvektoren fiel auf, dass die erwartete Größe des ORFs von Segment 5 nicht mit dem tatsächlich mittels RT-PCR synthetisierten Fragment übereinstimmte. Daher wurden Abschnitte sämtlicher Segmente des Virus erneut sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass drei der fünf Segmente Duplikationen am 3'-Terminus aufweisen.

Ein naher Verwandter von FgV-ch9 ist das ebenfalls in *F. graminearum* auftretende Fusarium graminearum mycovirus 2 (FgV2), das eine Sequenzidentität von 85-91 % zu FgV-ch9 hat (Chu *et al.*, 2002; Chu *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2011). Die Sequenzen beider Viren wurden *in silico* verglichen.

Die Resequenzierung zeigte, dass die 3'-Termini der Segmente 1 und 4 (HQ228213 und HQ228216) sowie die 5'-Termini sämtlicher Segmente keine Unterschiede zu den von Darissa *et al.* (2011) publizierten Sequenzen aufweisen.

Das Segment 2 (HQ228214) zeigt eine Duplikation von 81 bp im nicht-kodierenden Bereich, sodass die korrekte Segmentgröße nun bei 2931 bp liegt. Auch das Segment 2 (HQ343296) von FgV2 weist eine Duplikation am 3'-Terminus von 149 bp auf. Diese beinhaltet allerdings auch 20 bp des ORFs.

Das Segment 3 (HQ228215) von FgV-ch9 trägt eine Duplikation im nicht-kodierenden Bereich von 171 bp, sodass die korrekte Segmentgröße bei 3002 bp liegt. Mittels RT-PCR konnten beide Duplikationen verifiziert und die Anwesenheit von Fragmenten ohne Duplikation ausgeschlossen werden. Das Segment 3 von FgV2 hat ebenfalls eine solche Duplikation von 151 bp, allerdings ist diese identisch mit dem Terminus von Segment 2. Die Duplikation im Segment 5 ist Teil des ORFs und hat eine Größe von 505 bp, sodass von einer korrekten Segmentgröße von 2928 bp ausgegangen wird. Daraus lässt sich ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 96 kDa ableiten, während das von Darissa *et al.* (2011) publizierte Molekulargewicht bei 79 kDa liegt. Im Western Blot mit Gesamtprotein von infiziertem Myzel, unter Verwendung eines P5-spezifischen Antiserums, konnte eine Bande bei etwa 100 kDa nachgewiesen werden. Hingegen ist die erwartete Bande bei etwa 80 kDa nicht zu erkennen.

Eine Sequenzanalyse des korrigierten Segments 5 zeigt, dass es über sechs Zinkfinger-Domänen vom C₂H₂-Typ verfügt, zweieinhalb mehr, als in der ursprünglichen Sequenz zu finden waren. Eine solche Ansammlung von Zinkfingern führt oft zu einem anormalen Laufverhalten des Proteins auf SDS-PAGEs (Iakoucheva *et al.*, 2001), was die zusätzliche Bande bei etwa 130 kDa auf dem beschriebenen Western Blot erklären könnte.

Es wurde gezeigt, dass Proteine mit C₂H₂-Zinkfinger-Domänen ausschließlich doppelsträngige Nukleinsäure, vorzugsweise dsRNA, binden (Finery & Bass, 1997; Yang *et al.*, 1999) und möglicherweise als *gene silencing* Suppressoren (Landeo-Ríos *et al.*, 2015) oder viruskodierte Transkriptionsfaktoren von Wirtsgenen (Lukhovitskaya *et al.*,

2013a; Lukhovitskaya *et al.*, 2013b) fungieren. In Kapitel 4.6 wird gezeigt, dass P5 tatsächlich *gene silencing* Suppressor Aktivität aufweist. Wenn mehr als drei C₂H₂-Zinkfinger-Domänen nah beieinander stehen, sogenannte *multiple-adjacent-C₂H₂* (maC₂H₂) Domänen (Iuchi, 2001), binden diese schneller an ihre Liganden (Romaniuk, 1990; Kamiuchi *et al.*, 1998), was ein Hinweis dafür sein könnte, dass diese Duplikation dem Virus einen Vorteil bieten könnte.

Da das ursprüngliche Feldmaterial, aus dem das Virus FgV-ch9 extrahiert wurde, nicht mehr vorhanden ist und das aktuelle Material bereits über mehrere Jahre unter Laborbedingungen vermehrt wurde, besteht die Möglichkeit, dass die Duplikationen Folge der Kulturbedingungen sind. Dagegen spricht allerdings, dass keine Segmente ohne Duplikationen zu finden sind, weder im Myzel, noch in den *full-length* Klonen, die Darissa (2011) anfertigte. Allerdings ist nicht bekannt, wie oft bis zur ersten Sequenzierung von FgV-ch9 und auch von FgV2 das Material *in vitro* vermehrt worden war. Die Segmente unterscheiden sich von den in Segment 6L des *Mycoreovirus 1* auftretenden Duplikationen, wo neben dem Segment mit (6L) auch das Segment ohne Duplikation (6) weiterhin zu finden ist (Sun & Suzuki, 2008). Dieses Virus ist mit den Chrysoviren nicht verwandt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Duplikationen in den Segmenten 2, 3 und 5 tatsächlich von Vorteil für das Virus sind.

Die Duplikationen in FgV2 sowie eine Duplikation von 69 bp in Segment 3 (Ab560763.1) von *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1*, die ebenfalls *in silico* ermittelt wurde, weisen darauf hin, dass diese *rearrangements* nicht nur Spezies-spezifisch sind, sondern vielmehr in der gesamten Familie der *Chrysoviridae* auftreten können. Aber auch in anderen Familien von dsRNA Mykoviren wurden *rearrangements* beobachtet, dazu gehören die *Reoviridae* (Taniguchi & Urasawa, 1995; Sun & Suzuki, 2008) und die *Partitiviridae* (Chiba *et al.*, 2013a).

In den meisten hier beschriebenen Fällen lassen sich auf beiden Seiten der Duplikation einige nicht-homologe Nukleotide finden. Dies ist typisch für ssRNA Viren, wie das *Tobacco mosaic virus* (TMV) aus dem Genus *Tobamovirus* (Raffo & Dawson, 1991) oder dem *Brome mosaic virus* (BMV) aus dem Genus *Bromovirus* (Nagy & Bujarski, 1993). Beide Viren, TMV und BMV, stammen aus unterschiedlichen Familien (King *et al.*, 2011). Duplikationen in nicht-kodierenden Bereichen (UTRs) sind bei vielen Viren zu beobachten. Bei Flaviviren, zu denen unter anderem die bekannten Vertreter *Zika virus*

(ZIKV) und das FSME-Virus (*Tick-borne encephalitis virus*) gehören (King *et al.*, 2011), konnten sowohl Duplikationen des gesamten 3'-terminalen UTRs (Gritsun & Gould, 2006) als auch *tandem repeats* am 3'-Terminus (Bryant *et al.*, 2005) beobachtet werden. Außerdem konnten *head-to-tail* Sequenz-Duplikationen in der Nähe der Grenze von ORF und 3'-terminalem UTR bei diversen Rotaviren festgestellt werden (Arnold *et al.*, 2012). Allerdings scheinen Duplikationen wie bei Segment 2 und 3 von FgV-ch9 und FgV2 beschrieben, also *head-to-tail* Duplikationen, die den gesamten Terminus beinhalten und am äußersten 3'-Ende anschließen, bisher noch nicht beschrieben zu sein.

Von besonderem Interesse ist die in Segment 3 von FgV2 gefundene Duplikation, da diese sich als Teil des 3'-Terminus von Segment 2 herausstellte. Daraus ergibt sich die Frage, wie und zu welchem Zeitpunkt solche *rearrangements* entstehen.

Die Rekombination von Virus-RNA kann durch die Replikase angetrieben (*replicase-driven*) werden oder durch eine Kombination von Restriktion und Ligation (*breakage and ligation*) (Nagy & Simon, 1997). Da die Replikation bei dsRNA-Viren im abgeschlossenen Partikel stattfindet (Tao & Ye, 2010) und bei Chrysoviren jedes RNA-Segment einzeln in einem Partikel verpackt ist (Castón *et al.*, 2003; Jiang & Ghabrial 2004), ist es unwahrscheinlich, dass es sich um einen Replikase-betriebenen Mechanismus handelt. Für das *breakage and ligation* Prinzip erfolgt die Rekombination nach der Transkription der (+)ssRNA und dem Transport aus dem Partikel ins Zytoplasma. Hier ist es möglich, dass sich die Segmente 2 und 3 in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Daher scheint es wahrscheinlicher, dass Viren aus der Familie der *Chrysoviridae* nach dem Mechanismus des *breakage and ligation* rekombinieren.

Neben durch Duplikationen vergrößerte Segmente können bei Viren auch solche entstehen, die durch Deletionen stark verkürzt sind. Sie werden *defective interfering (DI) particles* genannt und sind zumeist nur in der Lage, eine Wirtszelle zu infizieren, wenn eine Co-Infektion mit der parentalen dsRNA vorliegt. Dann konkurrieren sie mit diesen um Ressourcen für die Replikation. Zu finden sind sie bei vielen Viren und können sowohl natürlich als auch als Folge der Laboranzucht auftreten (Simon *et al.*, 2004; Pathak & Nagy, 2009; Marriot & Dimmock, 2010; Stauffer Thompson & Yin, 2010).

In älteren Studien wird angenommen, dass DI Partikel *de novo* durch die gleichen Mechanismen entstehen wie Duplikationen, durch *replicase-driven template switches*

(Kirkegaard & Baltimore, 1986; Nagy & Simon, 1997) und durch *breakage and ligation* (Chetverin *et al.*, 1997; Gmyl *et al.*, 1999). Neuere Studien weisen darauf hin, dass ein funktionsfähiger *gene silencing* Mechanismus in Pilzen vorhanden sein muss, damit DI Partikel gebildet werden können. Wenn der *silencing* Mechanismus durch Ausschalten der Dicer- oder Argonauten-Proteine unterbrochen wird, ist auch keine DI RNA mehr nachweisbar (Zhang & Nuss, 2008; Sun *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012).

Interessant ist, dass keine solchen DI Partikel für FgV-ch9 nachgewiesen werden konnten, weder von Darissa (2011), noch in aktuellem Myzel. Es ist daher möglich, dass durch die Anwesenheit des *gene silencing* Suppressors P5 (siehe 4.6) der *silencing* Mechanismus so weit inhibiert ist, dass keine DI Partikel akkumulieren können. Auch Zhang & Nuss (2008) stellten bereits die Vermutung auf, dass starke *gene silencing* Suppressoren stabilisierend wirken könnten.

4.2 Protein P1 ist eine RdRp und hat Einfluss auf die Konidienbildung

Das Segment 1 von FgV-ch9 hat eine Größe von 3581 bp und besitzt einen ORF, der für ein Protein (P1) mit einem berechneten Molekulargewicht von 127 kDa kodiert. Sequenzanalysen der Proteinsequenz lassen darauf schließen, dass es sich um eine RdRP handelt (Darissa *et al.*, 2011).

Da die Funktion des Proteins bekannt ist und keine Prozessierung größerer Teile des Proteins vorliegt (das im Partikel ermittelte Molekulargewicht entspricht in etwa dem berechneten; Darissa, 2011), was mit P130, der RdRP von MoCV1-A, übereinstimmt (Urayama *et al.*, 2012), wurde kein Peptidantiserum gegen P1 hergestellt und keine Zeitreihe mit infiziertem Myzel über 20 Tage angelegt.

Das Protein P1 wurde mit einem His-Tag am N- sowie am C-Terminus versehen und in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* heterolog exprimiert. Die Integration in den ursprünglichen Wirt des Virus, *F. graminearum*, sowie die Transkription wurden mittels PCR bestätigt. Da die Transkriptionsraten der untersuchten Mutanten in etwa gleich waren, wurden zufällig die zwei Mutanten, FgPH1-AlcA-P1.6 und FgPH1-AlcA-P1.10, ausgewählt. Mittels Southern Blot wurde festgestellt, dass in erstere der ORF von Segment 1 ein Mal, in letzter drei Mal integriert wurde.

Zur Detektion des heterolog exprimierten Proteins P1 im Western Blot wurde das Antiserum *Anti-polyHistidin* verwendet. In den Proteinextrakten von *E. coli* und *S. cerevisiae* konnte das Protein P1 mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa nachgewiesen werden, nicht aber in den Extrakten von *F. graminearum*. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte die Expression des Proteins so niedrig sein, dass es unter die Detektionsgrenze des Antiserums fällt, wie das in filamentösen Pilzen oft der Fall ist (Kruszewska, 1999; Sharma *et al.*, 2009). Eine mögliche Ursache wäre nach Kruszewska (1999) insbesondere in dem Ort der Integration zu suchen, die bei dem verwendeten Vektor zufällig ist. Es besteht auch die Möglichkeit, dass P1 sehr schnell degradiert wird. Im Gegensatz zu einer natürlichen Virusinfektion, bei der das P1 im Partikel geschützt ist, liegt bei der heterologen Expression das P1 im Zytoplasma frei vor und ist damit den Angriffen von Proteasen ausgesetzt.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass das P1 zwar vorliegt, jedoch mit dem *Anti-polyHistidin* spezifischen Antiserum nicht detektiert werden kann. Beim nahe verwandten Chrysovirus *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1* (MoCV1-A) konnte beispielsweise kein N-terminales Methionin detektiert werden, was auf eine Prozessierung an dieser Stelle hindeutet (Urayama *et al.*, 2012). Sollte dies hier auch der Fall sein, könnte der Tag inklusive des Methionins ebenfalls abgespalten worden sein. Ähnliche Modifikationen am C-Terminus können nicht ausgeschlossen werden. Die Theorie der Prozessierung bzw. des Abbaus durch Proteasen wird auch von den Ergebnissen der heterologen Expression in Hefe gestützt. Hier ist 8 h nach Induktion das P1 mit seinem vollständigen Molekulargewicht nachweisbar, 24 h nach Induktion jedoch nicht mehr. Bei den Banden bei etwa 100 kDa könnte es sich um Abbauprodukte handeln. Eine identische Bande um 100 kDa tritt auch bei *E. coli* auf.

Darüber hinaus könnten die His-Tags durch Faltung nicht mehr für den Antikörper zugänglich sein.

Die phänotypische Charakterisierung der P1-exprimierenden Transformanten zeigen, dass die Expression dieses Proteins keinen signifikanten Einfluss auf den Pilz hat und sich die Mutanten weitestgehend wie der virusfreie Wildtyp verhalten was Morphologie, Virulenz und sexuelle Vermehrung angeht. Das könnte aber auch darauf zurückzuführen sein, dass gegebenenfalls nur wenig Protein exprimiert wurde. Einzig die Bildung von Konidien in Flüssigkultur ist auf nur 30 % der Menge im Wildtyp reduziert. Damit

verhalten sich die Mutanten in diesem Fall ähnlich wie der virusinfizierte Wildtyp FgPH1 VI, der nur noch 20 % Konidien produziert. Die Keimungsrate der Konidien der P1-Mutanten entspricht wiederum der des virusfreien Wildtyps. Ein virales Protein kann auf diverse Gene des Wirts Einfluss nehmen, die wiederum zu einer Reduktion der Konidienproduktion führen können. Eine Infektion von *F. graminearum* mit dem putativen Hypovirus FgV1 führt zu einer verminderten Transkription der Nukleotidase Hal2. Wird dieses Gen ausgeschaltet, kommt es unter anderem zu einer starken Reduktion der Konidienproduktion (Yu *et al.*, 2015).

4.3 Protein P2 ist Teil des Partikels und möglicherweise im Inneren lokalisiert

Das Segment 2 von FgV-ch9 hat eine Größe von 2931 bp und besitzt einen ORF, der für ein Protein (P2) mit einem berechneten Molekulargewicht von 94 kDa kodiert. Darissa *et al.* (2011) konnten durch eine Peptidsequenzierung zeigen, dass der N-terminale Bereich von P2 im Partikel vorliegt. Es handelt sich also um ein Strukturprotein, das bei einem Sequenzvergleich eine große Ähnlichkeit zum Strukturprotein von MoCV1-A zeigte (29 % Identität; 50 % Ähnlichkeit) und, so vermutet Darissa (2011), fungiert als Hüllprotein. Da eine Prozessierung vorliegt, wurde ein spezifisches Peptidantiserum gegen den N-Terminus von P2 hergestellt, *AK-P2N*.

Das Protein P2 wurde in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* heterolog exprimiert. Die Integration und Transkription in *F. graminearum* wurden mittels PCR verifiziert. Mittels Southern Blot konnte ermittelt werden, dass bei den beiden weiter untersuchten Mutanten FgPH1-AlcA-P2.8 und FgPH1-AlcA-P2.9 jeweils eine Integration des ORFs von P2 vorhanden ist, allerdings an unterschiedlichen Positionen im Genom.

Bei der Analyse der Zeitreihe von Gesamtprotein aus virusinfiziertem Wildtyp-Myzel mit dem spezifischen Antiserum *AK-P2N* zeigte sich, dass P2 in einer 3 Tage alten Kultur in seiner nicht-prozessierten Form mit einer Größe von 94 kDa vorliegt, genau wie es in einer Polysomenreinigung von infiziertem, 3 Tage altem Myzel der Fall ist. Jedoch sind auch schon nach 3 Tagen in beiden Aufarbeitungen weitere kleinere Banden erkennbar. Auch die Bande bei etwa 62 kDa, die im isolierten Partikel zu finden ist, ist vorhanden.

Nach 6 Tagen sind immer noch Teile des nicht-prozessierten Proteins sowie eventuelle Zwischenprodukte vorhanden, hauptsächlich liegt das P2 nun aber in seiner prozessierten Form von etwa 62 kDa vor, die auch im Partikel zu finden ist. Es wird deutlich, dass P2 bereits sehr schnell nach seiner Bildung prozessiert wird und dabei in erster Linie das C-terminale Ende abgebaut wird, da die verwendeten Antikörper im N-terminalen Teil des Proteins binden. Die prozessierte Form ist selbst in 20 Tage altem infiziertem Myzel noch nachweisbar. Hier liegt das P2 wahrscheinlich nur im Partikel vor, welches dann durch seine Anordnung vor Proteaseabbau geschützt ist. Für die Familie der *Reoviridae* gilt, dass in Partikel integrierte Proteine überaus stabil und gut gegen Degradation durch Proteasen geschützt sind (Reinisch *et al.*, 2000; Nakagawa *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2009). Die Prozessierung der entsprechenden Proteine der nahe verwandten Viren MoCV1-A bzw. FgV2 erfolgt nach dem gleichen Muster. Auch hier wird in erster Linie der C-Terminus abgebaut und mit fortschreitendem Alter der untersuchten Kultur akkumuliert die prozessierte Proteinform, während die nicht-prozessierte nach und nach verschwindet (Urayama *et al.*, 2012; Urayama *et al.*, 2014a; Yu *et al.*, 2011).

Bei der Verwendung des gegen Partikel von FgV-ch9 gerichteten Antiserums *AS0115* stellte sich heraus, dass in infiziertem Myzel weder bei etwa 100 kDa noch bei etwa 62 kDa eine spezifische Bande zu erkennen ist. Obwohl P2 Teil des Partikels ist, wirkte das P2 nicht als Antigen bei dieser Immunisierung. Möglicherweise ist das P2 im Inneren des Partikels angeordnet und kann, auch nach Prozessierung, nicht als Antigen auf den MHC-Klasse II-Komplexen präsentiert werden. Eine Anordnung im Inneren des Partikels vermutet auch Darissa (2011), da er nach Markierung mit Biotin lediglich die größeren P3-Banden und kaum die P2-Bande detektieren konnte. Allerdings lag lediglich das Antiserum einer einzigen Immunisierung vor, daher könnte das Fehlen von P2-spezifischen Antikörpern im Antiserum *AS0115* durch eine Kaninchen-spezifische Immunantwort begründet sein. So kann es selbst bei Immunisierung mit an Träger gekoppelten Peptiden in verschiedenen Individuen zu unterschiedlichen Immunantworten kommen. Beispielsweise erhielten Heinze *et al.* (2000) ein breit und ein eng reagierendes Antiserum nach Immunisierung mit einem identischen Peptid bei zwei Kaninchen zum Nachweis und zur Differenzierung von Tospovirus-Arten.

Das P2 könnte für die Positionierung der RdRP oder der dsRNA im Partikel zuständig sein. Zum Beispiel kann das Protein VP2 des *Norwalk virus* (NV) als Verbindungselement

zwischen dem Hüllprotein VP1, das nicht direkt mit Nukleinsäuren interagieren kann, und dem viralen Genom fungieren (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, 2003). Es könnte auch, wie beispielsweise das Hüllprotein VP3 des *Infectious bursal disease virus* (IBDV; *Birnaviridae*), die Ausrichtung von RNA und RdRP zueinander regeln (Tacken *et al.*, 2002; Reinisch, 2002). Da viele virale Proteine multifunktional sind (Reichert *et al.*, 2007), sind darüber hinaus auch weitere, gegebenenfalls enzymatische, Funktionen nicht ausgeschlossen.

Auf Grund der His-Tags und des S-Tags hat das heterolog exprimierte P2 ein berechnetes Molekulargewicht von 102 kDa. Bei der heterologen Expression von P2 in *E. coli* sowie in *S. cerevisiae* konnte mit dem Antiserum *AK-P2N* jeweils bei etwa 85 kDa eine spezifische Bande detektiert werden. Weder bei etwa 100 kDa noch bei etwa 65 kDa waren Banden zu finden.

Zur Klärung dieser Differenz wurde das Plasmid *pET-[P2]*, auf dem alle anderen P2-Konstrukte beruhen, sequenziert. Es zeigte sich, dass ein durch eine Punktmutation entstandenes zusätzliches Stopp-Codon zum frühzeitigen Abbruch der Translation führt. Die für diese Sequenz berechnete Proteingröße liegt bei etwa 85 kDa. Wann genau sich diese Mutation eingeschlichen hat, ist nicht klar, da bei Erstellung des Plasmids diese noch nicht vorhanden war und in früheren Versuchen in *E. coli* eine korrekte Bande bei etwa 100 kDa exprimiert werden konnte (Blum *et al.*, 2015). Bei der Expression in den Mutanten von *F. graminearum* tritt die Punktmutation wohl nicht auf, da hier eine spezifische Bande bei 100 kDa detektiert wurde. Das zusätzliche Stopp-Codon liegt im während der Prozessierung abgebauten Teil des Proteins; für Studien zur Prozessierung ist es also weiterhin geeignet.

Die erzielten Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Protein P2 nicht autoproteolytisch prozessiert wird, da weder in *E. coli*- noch in *S. cerevisiae*-Transformanden die prozessierte Form des Virus zu finden war. Anders verhält es sich bei dem Protein p48 des *Cryphonectria hypovirus 1* Stamm EP713 (CHV1-EP713), welches über Protease-Aktivität verfügt und sich selbst prozessiert (Shapira & Nuss, 1991). Bei Pflanzenviren sind viruseigene Proteasen häufig zu finden, so beispielsweise bei den ein Polyprotein-exprimierenden Potyviren (Riechmann *et al.*, 1992, Shukla *et al.*, 1994).

Bei der heterologen Expression von P2 in *F. graminearum* konnten in der Mutante, bei der die höhere Transkriptionsrate nachgewiesen wurde, zwei Proteine, eines mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa, das andere mit etwa 65 kDa, detektiert werden.

Diese entsprechen den Molekulargewichten der nicht-prozessierten sowie der prozessierten Form von P2.

Da P2 nicht in Hefe oder Bakterien, jedoch bei Expression in *F. graminearum* prozessiert wird, liegt der Verdacht nahe, dass hier die Prozessierung des entsprechenden Proteins wirtsinduziert ist. Das kann auch bei anderen Viren beobachtet werden (Soldevila *et al.*, 1998; Mahy & Regenmortel, 2010). Das *Infectious bursal disease virus* benötigt eine Aminopeptidase seines Wirtes zur Prozessierung seines Hüllproteins, andernfalls kann kein funktionsfähiges Partikel entstehen (Irigoyen *et al.*, 2012).

Auch bei dem nahe verwandten Mykovirus MoCV1-A werden die Hüllproteine, unter anderem das zu P2 homologe und auf ORF 3 kodierte P58, vor dem Einbau in den Partikel prozessiert (Urayama *et al.*, 2012). Die Prozessierung von Hüllproteinen ist auch für ein weiteres Mykoviren beschrieben worden, das nicht der Familie der *Chrysoviridae* angehört (Wu *et al.*, 2012). Bei diesem Virus, isoliert aus *Botrytis porri*, sind keine für Proteasen typischen Domänen detektiert worden, so dass wahrscheinlich ebenfalls durch eine Protease des Wirtes prozessiert wird.

Bei der Charakterisierung der P2-exprimierenden Mutanten stellte sich heraus, dass diese auf CM-Festmedium ein um 10 % erhöhtes radiales Wachstum zeigen. Auch die Resistenz gegen geringen osmotischen Stress ist leicht erhöht, während die Resistenz gegen oxidativen Stress leicht reduziert ist. Bei allen vier untersuchten Transformanden konnte dies beobachtet werden; wie es allerdings zu dieser Veränderung kommt, konnte nicht geklärt werden.

Auch die Virulenz auf Weizen ist im Vergleich zum Wildtyp leicht reduziert und beträgt nur etwa 75-80%. Dies könnte auf die reduzierte Resistenz gegen oxidativen Stress zurückzuführen sein, da die Freisetzung von *reactive oxygen species* (ROS) einer der Abwehrmechanismen gegen Pathogene von Pflanzen darstellt (Auh & Murphy, 1995; Grant *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2006).

Wie bereits bei der Expression von P1 beschrieben, ist auch bei der Expression von P2 die Konidienproduktion stark reduziert, auf etwa 50 % der vom Wildtyp gebildeten Menge. Damit werden immer noch deutlich mehr als im virusinfizierten Wildtyp gebildet (20%). Die Konidien der P2-exprimierenden Mutanten sind allerdings, im Gegensatz zu den Konidien des infizierten Wildtyps, voll keimungsfähig. Ein virales Protein kann auf diverse Wirtsfaktoren wirken, die wiederum zu einer Reduktion der

Konidienproduktion führen können. So führt eine Infektion von *F. graminearum* mit dem Hypovirus FgV1 zu einer verminderten Transkription des Transkriptionsfaktors Swi6, was unter anderem eine starke Reduktion der Konidienproduktion zur Folge hat (Liu *et al.*, 2013; Son *et al.*, 2016). In allen weiteren untersuchten Aspekten unterscheiden sich die P2-exprimierenden Mutanten nicht vom virusfreien Wildtyp.

4.4 Protein P3 ist ein Hüllprotein und der Hauptfaktor bei der Induktion von Hypovirulenz

Das Segment 3 von FgV-ch9 hat eine Größe von 3002 bp (siehe 4.1) und besitzt einen ORF, der für ein Protein (P3) mit einem berechneten Molekulargewicht von 93 kDa kodiert. Durch Sequenzvergleiche konnte eine signifikante Ähnlichkeit zu den Hüllproteinen anderer Viren (AbV-1, MoCV1 und FgV2) nachgewiesen werden (Darissa, 2011; Urayama *et al.*, 2012). Im Partikel wurde allerdings eine Doppelbande mit Molekulargewichten von etwa 70 kDa und 68 kDa nachgewiesen (Darissa *et al.*, 2011). Die im Partikel detektierten Molekulargewichte von P3 legen nahe, dass P3 prozessiert wird und als Strukturprotein zusammen mit P1 und P2 das Partikel bildet. Die Markierungsexperimente von Darissa (2011) legen nahe, dass das P3 nach außen exponiert ist und damit wahrscheinlich das Kapsid bildet. Ein Antiserum, welches am N-terminalen Teil von P3 bindet, wurde produziert, *AK-P3N*.

Das Protein P3 wurde in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* heterolog exprimiert. Die Integration und Transkription in *F. graminearum* wurde mittels PCR verifiziert und mittels Southern Blot konnte ermittelt werden, dass bei den weiter untersuchten P3-exprimierenden Mutanten FgPH1-AlcA-P3.7, FgPH1-AlcA-P3.11, FgPH1-AlcA-P3.27 und Fg8/1-ΔGluA-P3.5 jeweils eine Integration des ORFs vorhanden ist, allerdings an unterschiedlichen Positionen im Genom.

Es wurde eine Zeitreihe von Gesamtprotein aus infiziertem Myzel im Western Blot mit dem Antiserum *AK-P3N* analysiert. In 3 Tage altem Myzel war eine Bande mit einem Molekulargewicht von 94 kDa nachweisbar, welche mit der Masse des kompletten Proteins P3 übereinstimmt. Ebenso war auch schwach eine Bande bei etwa 70 kDa zu sehen, die auch im Partikel zu finden war. In der Polysomenreinigung war nur das nicht-

prozessierte Protein nachzuweisen. In der 6 Tage alten Kultur ist die prozessierte Doppelbande bei etwa 70 kDa, wie sie auch im Partikel vorliegt, deutlicher zu erkennen. In älteren Kulturen schwindet das nicht-prozessierte Protein immer mehr, während die Menge an prozessierten Proteinen steigt. Nicht-prozessierte Proteine wurden, anders als beim *Rosellinia necatrix* quadrivirus 1 (RnQV1), nie in die Partikel integriert (Lin *et al.*, 2012). Genau wie P2 wird auch P3 früh prozessiert und ist in dieser Form, vermutlich wegen des Einbaus in den Partikel, stabil. Dass in erster Linie der C-Terminus des Proteins abgebaut wird, wie bereits von Darissa (2011) beschrieben, kann hier bestätigt werden, da der am N-Terminus bindende Antikörper *AK-P3N* an die prozessierte Form binden kann. Somit erfolgt die Prozessierung auf die gleiche Weise wie bei P2 (siehe 4.3).

Auf Grund des His-Tags am C- und N-Terminus hat das heterolog exprimierte Protein P3 ein berechnetes Molekulargewicht von 101 kDa. Bei der heterologen Expression von P3 in *S. cerevisiae* ist auffällig, dass die mit P3N detektierten Banden, die keine Entsprechung in der Negativkontrolle zeigen, bei etwa 120 kDa laufen. Die Bande des nicht-prozessierten Proteins im Gesamtprotein und der Polysomenreinigung weist in dieser Aufarbeitung ebenfalls ein höheres Molekulargewicht als erwartet auf, bei etwa 110 kDa. Auch hier ist eine Differenz von mehr als 15 kDa zum berechneten Molekulargewicht zu erkennen. Im Verhältnis zueinander stimmen die Molekulargewichte der untersuchten Proteine also. Dieses fehlerhafte Laufverhalten kann auf den verwendeten Puffer oder den Marker zurückzuführen sein, da beispielsweise im Western-Blot der Zeitreihe von virusinfiziertem Wildtyp-Myzel die P3-Molekulargewichte den Erwartungen entsprechen.

Das in *E. coli* exprimierte Protein hat ein Molekulargewicht von knapp über 100 kDa und entspricht damit dem nicht-prozessierten P3. Weder bei der Expression in *E. coli* noch in *S. cerevisiae* konnte das prozessierte P3 mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass P3, genau wie P2, nicht autoproteolytisch prozessiert wird. Es ist allerdings auch möglich, dass die Tags eine Autoproteolyse verhindern. Zumeist haben nur größere Fusionsproteine, wie beispielsweise GFP, einen so starken Einfluss auf die Faltung und Prozessierung (Weinheimer *et al.*, 2010), während kleine Tags, wie der His- oder S-Tag, im Allgemeinen

kein Hindernis darstellen (Yang *et al.*, 1998; Terpe, 2003). Daher ist dies bei P3 unwahrscheinlich.

Die Transformation von P3 gestaltete sich als schwierig. Zunächst sollte der starke, konstitutive Promoter *gpdA* aus *Aspergillus nidulans* (Punt *et al.*, 1990) verwendet werden. Es konnten allerdings auch nach mehrmaligen Versuchen keine Transformanden erzeugt werden, was darauf schließen lässt, dass P3 in hohen Konzentrationen letal wirken kann. Daher wurde in FgPH1 der mittels L-Threonin induzierbare, deutlich schwächere Promotor *alcA* (Lockington *et al.*, 1987) verwendet. Da die induzierenden Stoffe Ethanol bzw. L-Threonin bereits Einfluss auf den Phänotyp der Transformanden nehmen können, wurde ebenfalls eine verkürzte Form des Promotors *gdpA* (Götsch, 2015), bei dem die Transkription ebenfalls schwächer ist, getestet. Mit beiden Promotoren wurden Transformanden erzeugt.

Bei der heterologen Expression von P3 in *F. graminearum* konnte in drei untersuchten Transformanden das nicht-prozessierte Protein mit dem Antiserum *AS0115* nachgewiesen werden, das prozessierte Protein allerdings nicht. Bei der Detektion mit dem Antiserum *AK-P3N* konnte keine spezifische Bande, weder des prozessierten noch des nicht-prozessierten Proteins, gezeigt werden. Da bekannt ist, dass Peptid-Antiseren oftmals eine niedrige Affinität ($K_D > 50 \text{ mM}$) haben (Rehm & Letzel, 2016) und P3 in den Transformanden, im Gegensatz zum virusinfizierten Wildtyp, nur in geringem Maße exprimiert wird und andernfalls letal sein könnte, wurde die Detektionsgrenze wohl nicht erreicht. Eine sehr geringe Expression könnte auch der Grund sein, weshalb in der Mutante Fg8/1- Δ GluA-P3.5 trotz des Vorhandenseins von Transkripten kein Protein mit dem *AS0115* detektiert werden konnte. Desweiteren werden virale Hüllproteine, die nicht in Partikel eingebaut werden, oftmals schnell abgebaut (Mateu, 2013), sodass die verwendeten Aminosäuren der Synthese weiterer Proteine zur Verfügung stehen. Da P3 alleine kein funktionsfähiges Partikel bildet und damit stabilisiert werden kann, ist das hier möglicherweise der Fall. Der Nachweis von ausschließlich nicht-prozessiertem Protein in *E. coli* weist darauf hin, dass P3 nicht autoproteolytisch prozessiert wird. In Hefe wurde unprozessiertes Protein detektiert sowie eine unspezifische Bande bei etwa 70 kDa. Auch hier findet also keine Prozessierung statt. Dass auch keine prozessierten Proteine in den *F. graminearum*-Mutanten detektiert werden konnten, weist darauf hin,

dass gegebenenfalls ein oder mehrere andere virale Proteine für die Prozessierung benötigt werden.

Bei der Expression des Fusionsproteins P3eGFP-C in *E. coli* und *S. cerevisiae*, welches aus P3, an dessen C-Terminus ein eGFP fusioniert wurde, besteht, konnten mit dem Antiserum *Anti-polyHistidin* das komplette Fusionsprotein sowie ein kleineres Protein mit einer Größe von knapp 100 kDa nachgewiesen werden. Da mit dem Antiserum *Anti-GFP* nur das vollständige Fusionsprotein detektiert werden konnte und bei der Expression in *F. graminearum* mit dem Antiserum *AS0115* wiederum nur eine Bande von knapp unter 100 kDa, scheint es, als würde das GFP bei einer Prozessierung von wenigen Aminosäuren am C-Terminus des anderweitig nicht-prozessierten Proteins abgespalten. Ähnliches wurde bereits für das Protein P1 vermutet (siehe 4.2) und wird durch die Ergebnisse von Urayama *et al.* (2012), die die Abspaltung des N-terminalen Methionins bei Proteinen von MoCV1-A beobachten konnten, unterstützt. Da die Prozessierung auch in *E. coli* zu beobachten ist, ist diese an dieser Stelle entweder autoproteolytisch, oder es ist eine generelle Protease verantwortlich, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten zu finden ist.

Das Protein P3 wurde in den *F. graminearum*-Stämmen FgPH1 und Fg8/1 exprimiert. Mit diesen wurde der ursprüngliche Wirt von FgV-ch9, FgCh9, in Bezug auf radiales Wachstum und Stressresistenz verglichen.

Auf CM-Festmedium ohne Stressinduktion zeigen alle das gleiche Wachstum, welches bei allen Stämmen bei Anzucht auf L-Threonin-haltigem Induktionsmedium stark verstärkt ist. Dies ist in erster Linie darauf zurückzuführen, dass L-Threonin eine Aminosäure ist, die als zusätzliche Kohlenstoffquelle dienen kann (Willetts, 1972; Kritzman *et al.*, 1976).

Bei leichtem osmotischem Stress (0,8 M NaCl) ist bei Fg8/1 und FgPH1 zunächst ein Anstieg des radialen Wachstums zu erkennen. Gerade Fusarium-Stämme, die in Trockengebieten wachsenden Weizen befallen, scheinen optimal an leichten Trockenstress bzw. osmotischen Stress angepasst zu sein und wachsen unter diesen Bedingungen ideal (Sung & Cook, 1981). Diese Reaktion bleibt bei FgCh9 LT aus. Mit steigendem osmotischem Stress wird deutlich, dass FgCh9 signifikant anfälliger ist, als die beiden anderen Stämme. Bei oxidativem Stress (H₂O₂) sind alle drei Stämme

größtenteils gleich anfällig. Nur bei hohem Stress (20 mM H₂O₂) ist das Wachstum von Fg8/1 noch weiter reduziert.

Ein bedeutender Unterschied ist, dass bei dem Stamm Fg8/1 bisher keine FgV-ch9 Infektion gelungen war. Die virusinfizierten Stämme FgPH1 und FgCh9 zeigen unter Stress keine signifikanten Unterschiede im Wachstum. Beide sind unter osmotischem Stress noch zu reduziertem Wachstum fähig, während bereits leichter oxidativer Stress ausreicht, um das Wachstum beider Stämme völlig zu unterbinden. Bei einer Färbung mit NBT zeigte sich, dass die infizierten Stämme bereits unter Normalbedingungen starkem Stress durch ROS ausgesetzt sind (C. Heinze, Universität Hamburg, pers. Mitteilung).

Bei der Charakterisierung der P3-exprimierenden FgPH1-Mutanten stellte sich heraus, dass diese auf CM-Festmedium ein um 20 % reduziertes radiales Wachstum zeigen und vermehrt Luftmyzel im mittleren Bereich der Kolonie bilden. Die Resistenz gegen osmotischen Stress ist signifikant reduziert, denn bereits bei einem Salzgehalt von 1,2 M ähneln die Transformanten eher dem virusinfizierten Wildtyp als dem virusfreien. Die Expression viraler Proteine kann Einfluss auf die Expression bestimmter Wirtsgene nehmen, die mit Stressresistenz in Verbindung stehen. So wurde mittels einer Transkriptionsanalyse festgestellt, dass nach einer Infektion mit FgV1 unter anderem der *osmotic stress transduction pathway* signifikant herunter reguliert ist (Lee *et al.*, 2014).

Auch die Resistenz gegen oxidativen Stress ist signifikant reduziert, allerdings sind die P3-exprimierenden Transformanten nicht so anfällig wie der virusinfizierte Wildtyp.

Die Expression von P3 in Fg8/1 löst keine Reduktion der Stresstoleranz des Pilzes aus. Da der Stamm sich sonst größtenteils wie FgPH1 verhält, ist vermutlich die geringe Expressionsrate ausschlaggebend für das Ausbleiben der morphologischen Veränderungen.

Bei Infektionsstudien auf Weizen mit den P3-exprimierenden Transformanten zeigt sich, dass diese wie der infizierte Wildtyp nicht in der Lage sind, die Ähre über das inokulierte Ährchen hinaus zu infizieren. Längsschnitte von inokulierten Ährchen (10 dpi) zeigen, dass der infizierte Wildtyp sowie die Transformanten in der Lage sind, sich innerhalb dieser zu verbreiten und für ein Absterben des Gewebes (Bleiche) zu sorgen. Auch der Bereich des Rachisknoten ist stark verbräunt, wie auch beim

virusfreien Wildtyp. Allerdings ist das Gewebe hinter dem Rachisknoten im Gegensatz zu diesem nicht von der Bleiche betroffen, sondern ähnelt den mit H₂O inokulierten Kontrollährchen.

Solch ein Phänotyp ist bekannt von DON-defizienten Tri5-ko-Mutanten (Bai *et al.*, 2002) und Lipase-defizienten Fgl1-ko-Mutanten (Voigt *et al.*, 2005). Daher wurde zunächst die Fähigkeit der Transformanden und des infizierten Wildtyps getestet, auf Weizen das Toxin Deoxinivalenol (DON) zu produzieren. Dabei stellte sich heraus, dass der infizierte Wildtyp etwa die 8-fache Menge an DON synthetisiert, während eine der P3-exprimierenden Transformanden etwa das 12-fache und die andere etwa das 6-fache synthetisiert. Die höchste Expression von Tri5 und damit verbunden die stärkste Synthese von DON lässt sich am dritten Tag nach der Inokulation eines Weizenährchens mit *Fusarium*-Konidien feststellen (Savard *et al.*, 2000). Dies ist in etwa der Zeitpunkt, an dem das Myzel des Pilzes auf den Rachisknoten trifft (Voigt *et al.*, 2007). Um diesen zu durchdringen, muss eine große Menge DON synthetisiert werden (Ilgen *et al.*, 2009). Bleibt die Infektion nun am Rachisknoten stecken, so bleibt die DON-Synthese, die nach dem Überwinden des Rachisknoten eigentlich wieder herunter reguliert wird, stets aktiv und DON akkumuliert im inokulierten Ährchen. Der gleiche Phänotyp wurde beobachtet, wenn ein anderer Virulenzfaktor von *Fusarium graminearum* ausgeschaltet wird, die Lipase FGL1. Die Infektion verbleibt im inokulierten Ährchen und DON akkumuliert in diesem (Voigt *et al.*, 2007).

Im nächsten Schritt wurde also die Transkription von Fgl1 mittels qPCR untersucht und es stellte sich heraus, dass im virusinfizierten FgPH1 die Fgl1-Transkripte auf 40 % der im virusfreien FgPH1 vorkommenden Transkriptemenge reduziert ist, im infizierten FgCh9 sind es sogar nur noch etwa 20 % im Vergleich zum mit niedrigem Virustiter infizierten FgCh9. FGL1 nimmt Einfluss auf die Freisetzung von ungesättigten Fettsäuren, die wiederum die Callosesynthese inhibieren. Fehlen nun diese Fettsäuren, kommt es zu einer vermehrten Synthese von Callose. Unter anderem verstärkt Callose die Zellwände und blockiert die Siebzellen, was zu einem mechanischen Schutz der Wirtspflanze führt. Sie gewinnt so Zeit, weiterführende Verteidigungsmechanismen gegen Pathogenangriffe einzuleiten (Blümke *et al.*, 2014).

Neben den hier beschriebenen Virulenzfaktoren DON und FGL1 gibt es wahrscheinlich noch viele andere, zum Beispiel Sekundärmetabolite wie Butenolide oder Effektoren,

und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Faktoren an der frühen Eindämmung der Pilzinfektion in Weizen beteiligt sind.

Die Konidienproduktion ist in den P3-exprimierenden Transformanten fast um das Doppelte im Vergleich zum Wildtyp erhöht, obwohl eine Infektion mit FgV-ch9 die Konidienproduktion eigentlich stark reduziert (Darissa *et al.*, 2011). Wenn das Gen Cpst12-E1, ein Homolog des Transkriptionsfaktors Ste12, in *Cryphonectria parasitica* ausgeschaltet ist, kommt es ebenfalls zu einer vermehrten Produktion von Konidien. Während einer Infektion mit CHV1-EP713, während der das Gen herunter reguliert ist, hingegen nicht (Deng *et al.*, 2007). Es könnte sein, dass P3 alleine Einfluss auf ein oder mehrere Gene von *F. graminearum*, vielleicht sogar auf ein Homolog von Ste12, nimmt, die während einer natürlichen Infektion mit allen Virusproteinen nicht im gleichen Maße beeinflusst werden.

In den P3-exprimierenden Transformanten sowie im virusinfizierten Wildtyp ist die Keimungsrate der Konidien signifikant reduziert. Urayama *et al.* (2016) haben Konidien von *Magnaporthe oryzae* mit dem heterolog in *S. cerevisiae* exprimierten Hüllprotein von MoCV1-A, das auf ORF 4 kodiert ist und Homologien zu P3 aufweist, inokuliert und ebenfalls eine starke Suppression der Keimung von Konidien beobachtet. Offenbar spielt das Hüllprotein beider Viren eine entscheidende Rolle während der asexuellen Fortpflanzung ihres Wirtes.

Die Bildung von Perithezien und Reife der Ascosporen erfolgt in den P3-exprimierenden Transformanten sehr früh, bereits nach zwei Wochen treten die ersten Perithezien auf. Nur die P4-exprimierenden Mutanten bilden noch früher Perithezien aus. Die nähere Betrachtung dieses Ergebnisses erfolgt in Kapitel 4.5.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Protein P3 mehr Einfluss auf die Virulenz sowie die sexuelle und asexuelle Fortpflanzung hat, als alle weiteren Proteine von FgV-ch9, und durchaus der Hauptauslöser der Hypovirulenz sein könnte. Dies bestätigen auch die Experimente von Urayama *et al.* (2012; 2014b). Zunächst wurde das P3-Homolog von MoCV1-A, kodiert auf ORF 4, in *S. cerevisiae* exprimiert und sorgte dort für cytologische Veränderungen, wie stark vergrößerte Vakuolen, und signifikante Wachstumsbeschränkung (Urayama *et al.*, 2012). Danach wurde das Protein im

humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* exprimiert und sorgte auch hier für ausgeprägte Wachstumsbeschränkungen, Zellkerndegradation und reduzierte Formierung der Kapsel, die eine der Hauptvirulenzfaktoren dieses Pilzes bildet (Urayama *et al.*, 2014b).

Das Protein P3 von FgV-ch9 führte in *S. cerevisiae* zwar zu keinem besonderen Phänotyp, die Wirkung auf *F. graminearum* ist allerdings enorm. Daher könnte es also nicht nur für den Pflanzenschutz von Interesse sein, sondern auch für den medizinischen Bereich eine gute Alternative zu herkömmlichen Antimykotika darstellen.

4.5 Protein P4 ist ein Nichtstrukturprotein und involviert in die frühzeitige Reife von Perithezien

Das Segment 4 von FgV-ch9 hat eine Größe von 2746 bp und besitzt einen ORF, der für ein Protein (P4) mit einem berechneten Molekulargewicht von 91 kDa kodiert. Sequenzanalysen der Proteinsequenz und Sequenzvergleiche zeigen keine Homologien zu bekannten Proteinen oder Domänen. Die Funktion ist nicht bekannt (Darissa *et al.*, 2011). Es wurde ein Peptidantiserum gegen den N-terminalen Teil dieses Proteins hergestellt, *AK-P4N*.

Das Protein P4 wurde in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* heterolog exprimiert. Die Integration und Transkription in *Fusarium* wurde mittels PCR verifiziert und mittels Southern Blot konnte ermittelt werden, dass die Mutante FgPH1-AlcA-P4.8 über drei und die Mutante FgPH1-AlcA-P4.9 über zwei Integrationen von P2 verfügt. Die von Darissa (2011) beschriebenen *tandem repeats* konnten nicht bestätigt werden.

Es wurde eine Zeitreihe von Gesamtprotein aus infiziertem Myzel im Western Blot mit dem Antiserum *AK-P4N* analysiert. In 3 Tage altem Myzel konnte deutlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 91 kDa nachgewiesen werden, welches ebenfalls in der Polysomenreinigung zu finden ist. In 6 Tage altem Myzel ist dieses Protein immer noch in geringerer Menge vorhanden. In älteren Kulturen sowie in gereinigtem Viruspartikel hingegen nicht. Das Protein P4 ist also ein Nichtstrukturprotein und unterliegt keiner offensichtlichen Prozessierung. Es wird in jungem Myzel synthetisiert und auch relativ schnell wieder abgebaut. Zum Zeitpunkt des Abbaus ist auch die Prozessierung der

Strukturproteine abgeschlossen. Das weist darauf hin, dass P4 als Protease fungieren könnte. Ein Proteasetest für eine größtmögliche Vielfalt an Proteasen (Protease Assay Kit, Calbiochem, USA) wurde mit Rohextrakten aller Proteine von FgV-ch9 aus *E. coli* und *S. cerevisiae* durchgeführt. Unter den verwendeten Bedingungen, Casein-Abbau bei einem pH-Wert von 7,8, zeigte keines eine erhöhte Proteaseaktivität. Allerdings könnte das Optimum der Aktivität verfehlt oder die Proteinmenge zu gering sein, sodass hier ein falsch-negatives Ergebnis erzielt wurde. Spezifischere Protease-Tests und eine native Aufreinigung der Proteinextrakte könnten eventuell eindeutigere Ergebnisse liefern. Es sind jedoch auch weitere regulatorische Funktionen denkbar, so könnte es beispielsweise ein Kofaktor der Polymerase, eine RNA-Helikase oder eine Kinase sein.

Das heterolog in *E. coli* und *S. cerevisiae* exprimierte P4 verfügt über zwei His-Tags und einen S-Tag, sodass die erwartete Größe bei etwa 97 kDa liegt. In *E. coli* konnte allerdings nur eine spezifische Bande bei einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa und in *S. cerevisiae* eine spezifische Bande bei etwa 115 kDa nachgewiesen werden. Alle anderen beobachteten Banden waren unspezifisch. Diese Diskrepanz zum erwarteten Molekulargewicht könnte durch posttranslationale Modifikationen oder unterschiedliche Laufverhalten der verwendeten Extraktionspuffer zu erklären sein. Auch scheinen His-Tags das Laufverhalten von Fusionsproteinen zu beeinflussen, sodass das Protein bei einem höheren Molekulargewicht läuft, als erwartet wurde (Tang *et al.*, 2000). Daher kann hier nicht von absoluten Größen gesprochen werden.

Bei der Expression des Fusionsproteins P4eGFP-N in *S. cerevisiae* konnte mit dem Antiserum *AK-P4N* eine spezifische Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 110 kDa detektiert werden. Damit hat diese allerdings ein deutlich niedrigeres Molekulargewicht als die erwarteten 127 kDa. Da aber auch mit den Antiseren *Anti-GFP* und *S-Tag* eine Bande auf gleicher Höhe gezeigt wurde, sind sowohl das N-terminale GFP als auch der S-Tag vollständig vorhanden. Das gleiche Ergebnis zeigte die Expression des Fusionsproteins in *E. coli*.

Bei der Expression von P4eGFP-N in *F. graminearum* konnten bei der Detektion mit dem Antiserum *AK-P4N* gleich mehrere Banden detektiert werden. Darunter auch eine Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht entspricht. Die große Anzahl an Nebenbanden weist darauf hin, dass dieses Antiserum

sehr unspezifisch bindet. Da bei einer Detektion mit dem Antiserum *Anti-GFP* einzig die Bande bei etwa 130 kDa spezifisch war, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser um das Fusionsprotein handelt. Das Antiserum *S-Tag* hat wie erwartet nicht gebunden. In *F. graminearum* konnte kein Protein mit diesem Antiserum detektiert werden, da die Detektionsgrenze dieses Antiserums wahrscheinlich über der Expression liegt.

Diese Ergebnisse der Expression in allen drei Organismen zeigen, dass bei P4 wohl keine Prozessierung am äußersten N-Terminus des Proteins stattfindet, wie er bei den Strukturproteinen vermutet wird.

Bei der Charakterisierung der P4-exprimierenden FgPH1-Mutanten stellte sich heraus, dass diese auf CM-Festmedium das gleiche radiale Wachstum zeigen wie der nicht infizierte Wildtyp. Die Resistenz gegen osmotischen Stress ist signifikant reduziert, denn bereits bei einem Salzgehalt von 1,2 M ähneln die Transformanten eher dem virusinfizierten als dem virusfreien Wildtyp. Auch die Resistenz gegen oxidativen Stress ist stark reduziert. Das Ausmaß wie beim infizierten Wildtyp wird allerdings nicht erreicht. Allgemein verhalten sich die P4-exprimierenden Transformanten unter Stress wie die P3-exprimierenden Mutanten. Gegebenenfalls nimmt P4 Einfluss auf die gleichen Stress-induzierten Signalwege wie P3.

Obwohl auf Spelzen weniger Infektionskissen gezählt wurden, entspricht das Schadbild auf Weizenähren, die von den P4-exprimierenden Transformanten infiziert wurden, nahezu dem des Wildtyps. Mit einer durchschnittlichen Befallsrate der Ährchen von 85 % ist zwar eine tendenzielle Verminderung der Virulenz zu sehen, diese ist aber nicht signifikant.

Die Konidienproduktion ist in den P4-exprimierenden Transformanten stark erhöht. Es werden fast doppelt so viele Konidien wie im Wildtyp gebildet. Auch hier ist die Ähnlichkeit zu den P3-exprimierenden Transformanten zu erkennen, da diese im etwa gleichen Maße mehr Konidien produzieren. Da Konidien auch als Überdauerungsform dienen und bei Stress gebildet werden (Park & Yu, 2016), könnte dies auf die verstärkte Anfälligkeit sowohl von P3 als auch von P4 auf beide hier untersuchten Stressfaktoren,

oxidativer und osmotischer Stress, zurückzuführen sein. Die Keimungsfähigkeit ist durch P4 allerdings nicht beeinträchtigt.

Die Bildung von Perithezien erfolgt bei den P4-exprimierenden Transformanten außergewöhnlich früh. Bereits nach 7 Tagen sind diese auf Weizennodien zu erkennen. Damit treten sie kurz vor den Perithezien vom virusinfizierten Wildtyp, den P3-, und den P5-exprimierenden Transformanten auf, die sich nach 10-14 Tagen bilden. Ihre geringe Größe ist wahrscheinlich auf die stark beschleunigte Bildung und Reife zurückzuführen. Die herausgeschleuderten Ascosporen sind voll keimungsfähig.

Während viele fakultativ sexuell reproduzierenden Organismen bei Stress zu früherer und verstärkter sexueller Fortpflanzung neigen (Bell, 1982), konnte dies nicht auf alle Ascomyceten übertragen werden. *Aspergillus nidulans* beispielsweise bildet bei Stress eher Konidien als Ascosporen (Schoustra *et al.*, 2010). Die asexuell gebildeten Konidien sind in den meisten Fällen besser gegen abiotische Stressfaktoren gewappnet und benötigen zur Bildung einen geringeren Energieaufwand (Adams *et al.*, 1998; Park & Yu, 2016). Perithezien hingegen werden von *F. graminearum* bevorzugt bei einem warmen und feuchten Klima gebildet, was den optimalen Lebensbedingungen dieses Pilzes entspricht (Manstretta & Rossi, 2016).

Die vereinzelt Ascosporen des infizierten Wildtyps FgPH1 VI wachsen zu Kolonien aus, die eher dem virusfreien Wildtyp ähneln. Auch konnten weder bei einer RNA-Extraktion, noch mittels RT-PCR virale RNAs nachgewiesen werden. Aus den Ascosporen sind also mindestens Hyphen mit einem sehr niedrigen Virustiter oder sogar frei von Viren ausgewachsen. Dieses Phänomen wurde schon häufig bei Viren beobachtet, die sich im Zytoplasma befinden (Rawlinson *et al.*, 1973; Day *et al.*, 1977), weshalb allgemein angenommen wird, dass die meisten Mykoviren sich vertikal über Konidien verbreiten und nicht über Ascosporen (Coenen *et al.*, 1997). Ausnahmen bilden Viren, die in Organellen zu finden sind, wie zum Beispiel die dsRNA NB631 aus *Cryphonectria parasitica*, die in den Mitochondrien auftritt (Polashock & Hillmann, 1994). Dieses ist das einzige Virus aus der Familie der *Hypoviridae*, das in erster Linie über Ascosporen verbreitet wird (Polashock *et al.*, 1997).

Der Mechanismus zur Bildung von Ascosporen scheint eine Schlüsselrolle bei der Übertragung von Viren auf die Sporen zu spielen. Das Zytoplasma in unreifen Ascis wird

durch spezielle Doppelmembranen auf die jeweilige Anzahl an Ascosporen aufgeteilt. Dabei verbleibt der Großteil des Zytoplasmas außerhalb der unreifen Ascosporen und wird zu Material für die Zellwandsynthese der Sporen abgebaut. Nur ein sehr geringer Teil des Zytoplasmas wird zusammen mit den Organellen der Zelle in die Sporen aufgenommen. Erst im Inneren der Spore wird neues Zytoplasma, genannt Sporoplasma, nachgebildet (Zopf, 1890; Read & Beckett, 1996). Auf diesem Wege gelangen kaum bis gar keine Viren aus dem Zytoplasma in die neu gebildeten Ascosporen, die aus Organellen hingegen schon.

Die schnelle Bildung von Ascosporen, die beim virusinfizierten Wildtyp sowie den P3-, P4- und P5-exprimierenden Transformanten beobachtet werden konnte, könnte also auch eine Reaktion des Pilzes auf das Virus sein, um eine Verbreitung einzudämmen. Da ein kompatibler Partner und sexuelle Rekombination bei homothallischen Pilzen, wie *F. graminearum*, nicht zur Bildung von Ascosporen nötig ist (Cavinder *et al.*, 2012) können virusfreie Ascosporen so relativ leicht erzeugt werden. Nun gibt es zwei Wege diese Ergebnisse zu interpretieren. Zum einen könnten Proteine von FgV-ch9, wie eben P3, P4 oder P5, eine Abwehrreaktion beim Wirt auslösen und dieser sichert sein Überleben durch das Erzeugen virusfreien Myzels. Zum anderen könnte das Virus dies aber auch ausnutzen, indem die Ressourcen des befallenen Myzels so weit wie möglich ausgeschöpft werden und bei Kontakt das durch Ascosporen gebildete, virusfreie Myzel infiziert wird. Die Ressourcenversorgung wäre so längerfristig gewährleistet. Beide Interpretationen sind gleichermaßen denkbar.

In mit dem Hypovirus FgV1 infiziertem *F. graminearum* wird die Nukleosidase Hal2 herunter reguliert, was zu einer Verringerung sowohl der Akkumulation von viraler dsRNA als auch der vertikalen Transmission des Virus über Konidien führt. So treten nach mehreren Generationen vertikaler Vermehrung virusfreie Isolate auf (Yu *et al.*, 2015). Auch bei diesem Beispiel sind beide Interpretationen möglich.

4.6 Protein P5 ist ein Nichtstrukturprotein und besitzt *gene silencing* Suppressor-Funktion

Das Segment 5 von FgV-ch9 hat eine Größe von 2928 bp und besitzt einen ORF, der für ein Protein (P5) mit einem berechneten Molekulargewicht von 96 kDa kodiert (4.1). Sequenzanalysen zeigen, dass das Protein sechs C₂H₂-Zinkfinger-Domänen trägt,

desweiteren aber keine Homologien zu bekannten Proteinen aufweist. Es wurde ein Peptidantiserum gegen den N-terminalen Teil dieses Proteins hergestellt, *AK-P5N*.

Das Protein P5 wurde in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* heterolog exprimiert. Die Integration und Transkription in *Fusarium* wurde mittels PCR verifiziert. Mittels Southern Blot konnte ermittelt werden, dass die Mutanten FgPH1- Δ GluA-P5.6 und FgPH1- Δ GluA-P5.8 über jeweils eine Integration von P5 an unterschiedlicher Position im Genom verfügen.

Es wurde eine Zeitreihe von Gesamtprotein aus infiziertem Myzel im Western Blot mit dem Antiserum *AK-P5N* analysiert. In 3 Tage altem Myzel ist deutlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 96 kDa zu erkennen, welches ebenfalls in der Polysomenreinigung zu finden ist. Darüber hinaus kann in beiden Proben eine Doppelbande bei knapp unter 130 kDa nachgewiesen werden. In 6 Tage altem Myzel ist nur noch eine leichte Bande bei 96 kDa vorhanden, die Bande bei 130 kDa ist vollständig verschwunden. In älteren Kulturen sowie in gereinigtem Viruspartikel ist keines der Proteine vorhanden.

Das Protein P5 ist also ein Nichtstrukturprotein, das keine größeren Prozessierungen aufweist, da das beobachtete Molekulargewicht dem berechneten entspricht, und schnell abgebaut wird. Die Banden bei etwa 130 kDa sind wahrscheinlich durch anormales Laufverhalten zu erklären. Dieses Phänomen, ausgelöst durch die große Anzahl von Zinkfinger-Domänen, wurde von Iakoucheva *et al.* (2001) für Proteine mit zahlreichen Zinkfinger-Domänen beschrieben.

Das heterolog in *E. coli* und *S. cerevisiae* exprimierte P5 verfügt über einen His-Tag und einen S-Tag am N-Terminus, sodass die erwartete Größe bei etwa 102 kDa liegt. In beiden Organismen konnte die zuvor beschriebene Bande mit einem Molekulargewicht von etwa 130 kDa nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist also unabhängig vom Wirt und tritt auch in anderen Organismen auf. Eine Zunahme des Molekulargewichtes durch beispielsweise Glykolysierungen kann damit ausgeschlossen werden. Zusätzlich ist in *E. coli* noch eine Bande bei etwa 110 kDa zu erkennen. Abweichungen vom berechneten Molekulargewicht könnten durch die verwendeten Extraktionspuffer zu erklären sein.

Auch die verwendete Konzentration von Polyacrylamid kann zu Abweichungen bei den Lauflängen von Proteinen führen (Rath *et al.*, 2013).

Bei der Charakterisierung der P5-exprimierenden FgPH1-Mutanten stellte sich heraus, dass diese auf CM-Festmedium ein um etwa 10 % reduziertes Wachstum zeigen und die Kolonien asymmetrisch wachsen. Sie sind außerdem weniger resistent gegen oxidativen Stress als der virusfreie Wildtyp. Dagegen ist die Resistenz gegen osmotischen Stress erhöht.

Die Konidienbildung ist bei den P5-exprimierenden Mutanten extrem reduziert. Es werden nur knapp 10 % der durchschnittlich beim virusfreien Wildtyp ermittelten Konidienmenge gebildet. Die Keimungsrate der Konidien entspricht hingegen der des virusfreien Wildtyps.

Ein virales Protein kann diverse Wirtsfaktoren beeinflussen, die wiederum zu einer veränderten Stresstoleranz, vermindertem Wachstum oder einer Reduktion der Konidienproduktion führen können (Liu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2015; Son *et al.*, 2016).

Die Bildung von Perithezien und Reife der Ascosporen erfolgt in den P5-exprimierenden Transformanten, wie bei P3 und P4, sehr früh, bereits nach zwei Wochen treten die ersten Perithezien auf. Die nähere Betrachtung dieses Ergebnisses erfolgte in Kapitel 4.5. Alle weiteren betrachteten Faktoren, wie die Virulenz auf Weizen oder die Bildung von Infektionskissen, unterscheiden sich nicht vom virusfreien Wildtyp.

Das Protein P5 verfügt über sechs C₂H₂-Zinkfinger-Domänen. Diese binden in erster Linie dsRNA (Finery & Bass, 1997; Yang *et al.*, 1999). Die Fähigkeit zur Bindung von dsRNA führte zu der Annahme, dass es sich bei P5 um einen *gene silencing* Suppressor handeln könnte (Valli *et al.*, 2008; Chiba *et al.*, 2013b). Eine direkte Beteiligung von P5 bei der Replikation ist dagegen unwahrscheinlich, da dieses Protein nicht im Partikel vorkommt, die virale dsRNA diesen allerdings auch nicht verlässt.

RNA-induced gene silencing ist ein hoch konservierter Mechanismus, der in den meisten eukaryotischen Systemen vorkommt (Cogoni, 2001; Hannon, 2002; Baulcombe, 2004) und in Pilzen früher auch *quelling* genannt wurde (Romano & Macino, 1992). Neben der Regulation der eigenen Genexpression (Chang *et al.*, 2012) dient dieser auch der Abwehr von fremder Nukleinsäure, insbesondere von Viren (Matzke *et al.*, 2000).

Auch *F. graminearum* verfügt über ein System zum *gene silencing*. Bei der Sequenzierung des Genoms dieses Pilzes wurden zwei *Dicer*, zwei *Argonaute*-Proteine und fünf RdRPs identifiziert (Cuomo *et al.*, 2007). Funktionsanalysen zeigten, dass das System funktionsfähig ist. Anders als bei anderen Pilzen scheint hier allerdings nicht die Regulation von Genexpressionen im Vordergrund zu stehen, sondern die Abwehr von viraler RNA (Segers *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015).

Um trotz *gene silencing* eine virale Infektion zu etablieren, sind einige Viren in der Lage, *gene silencing* Suppressoren zu exprimieren. Diese können beispielsweise als Protease wichtige Bestandteile des RISC abbauen (Suzuki *et al.*, 1999; Varrelmann *et al.*, 2007), die Synthese oder Aktivität von *Dicer* und *Argonaute*-Proteinen hemmen (Zhang *et al.*, 2006; Haas *et al.*, 2008), die Umsetzung von dsRNA zu siRNA unterdrücken (Aliyari *et al.*, 2008) oder die siRNA binden (Ye *et al.*, 2003; Mérai *et al.*, 2005). Auf Grund der Menge an möglichen Interventionspunkten ist es nicht verwunderlich, dass sich die einzelnen Suppressoren oftmals weder in ihrer Struktur noch in ihrer Sequenz ähneln (Voinnet, 2005).

Um zu ermitteln, ob tatsächlich eines der Proteine von FgV-ch9 die Funktion hat, *gene silencing* zu unterdrücken, wurden alle 5 ORFs in einem *transient expression assay* (Roth *et al.*, 2004) getestet. Dabei wurden konstitutiv eGFP exprimierende *N. benthamiana* mit *A. tumefaciens*-Gemischen bestehend aus einem Stamm, der einen *silencing inducer* exprimiert, und einem Stamm, der eines der viralen Proteine exprimiert, infiltriert. Als *inducer* wurde das eGFP-Gen verwendet, da die Transkription eines zusätzlichen eGFPs in Verbindung mit dem im Genom integrierten das sogenannte *sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing* (S-PTGS) auslöst (Dalmay *et al.*, 2000; Béclin *et al.*, 2002). So kann dsRNA gebildet werden, ohne ein spezielles Konstrukt zu verwenden.

Der *silencing*-Effekt äußert sich in diesem Assay so, dass im infiltrierten Bereich die Fluoreszenz von eGFP abnimmt und dieser als dunkler Kreis auf den Blättern sichtbar wird. Wird nun ein *silencing* Suppressor parallel exprimiert, so wird das *gene silencing* unterdrückt, die Fluoreszenz bleibt bestehen und die infiltrierten Bereiche bilden keine dunklen Kreise. Als bestätigter Suppressor in der Positivkontrolle dient das Protein P19 des *Tomato bushy stunt virus* (Ye *et al.*, 2003). Es bindet siRNA mit einer Größe von 21 Nukleotiden (Qu & Morris, 2002).

Die Untersuchung der fünf Proteine von FgV-ch9 ergab, dass nur bei der parallelen Expression von P5 die Fluoreszenz erhalten blieb, bei P1, P2, P3 und P4 zeigten sich die durch *silencing* verdunkelten Bereiche. Dem entsprechend hat nur P5 eine Funktion als Suppressor.

Um zu verifizieren, ob P5 auch im natürlichen Wirt von FgV-ch9, *F. graminearum*, den gleichen Effekt hat, wurde in den konstitutiv eGFP exprimierende Stamm FgPH1-GFP zunächst ein *silencing*-Konstrukt eingebracht, das konstitutiv dsRNA von eGFP synthetisiert (FgPH1-SilentGFP). In einem weiteren Klon wurde zusätzlich P5 heterolog in diesem Stamm exprimiert (FgPH1-SilentGFP-P5). Als Negativkontrolle wurde das Protein bPAC, eine photoaktivierte Adenylatzyklase (Jansen *et al.*, 2015), die keinerlei Suppressor-Funktion besitzt, ebenfalls in dem Stamm exprimiert (FgPH1-SilentGFP-bPac). Es zeigte sich, dass die Fluoreszenz in dem Stamm FgPH1-GFP deutlich zu erkennen ist, während die Fluoreszenz sowohl in FgPH1-SilentGFP als auch in FgPH1-SilentGFP-bPAC um mehr als 50 % reduziert ist. Die Fluoreszenz in FgPH1-SilentGFP-P5 hingegen ist sogar um 20 % stärker ausgeprägt. Bei P5 handelt es sich also eindeutig um einen *gene silencing* Suppressor, der auch in *F. graminearum* seine volle Wirkung entfaltet.

Die beschriebene Steigerung der Fluoreszenz kann nicht nur in den *F. graminearum*-Mutanten beobachtet werden, sondern auch bei den mit den Suppressoren P5 und P19 infiltrierten Blättern. Gegebenenfalls verstärken die Suppressoren die Fluoreszenz, indem sie das eGFP stabilisieren, da beispielsweise spontanes *silencing*, wie es auch schon durch ssRNA herbeigeführt werden kann (Martinez *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2012), ebenfalls gehemmt wird.

Es wurde beschrieben, dass die Expression von *gene silencing* Suppressoren deutliche phänotypische Veränderungen auslösen kann. So sorgt der Suppressor P29 aus CHV1 für eine Reduktion der Pigmentierung und der asexuellen Sporenbildung in seinem Wirt *Cryphonectria parasitica* (Craven *et al.*, 1993). Es ist allerdings möglich, dass dies nicht zwangsläufig an der Funktion des Proteins als Suppressor liegt. In *F. graminearum* wurde gezeigt, dass das Stilllegen des *gene silencing* Mechanismus keine Auswirkungen auf Wachstum, Stressresistenz, sexuelle und asexuelle Fortpflanzung sowie Virulenz des Pilzes hat. Dazu wurden jeweils die beiden *Dicer*- und *Argonaute*-Proteine ausgeschaltet sowie Doppel-ko-Mutanten von beiden *Dicer*- und *Argonaute*-Proteinen erstellt. Keine

dieser Mutanten zeigte einen Effekt auf die genannten Faktoren. Der *gene silencing* Mechanismus wird also nicht zur Regulation der vegetativen Entwicklung oder Pathogene verwendet (Chen *et al.*, 2015). Da bei den P5-exprimierenden Transformanten aber durchaus Veränderungen in diesen Bereichen zu erkennen sind, werden diese wahrscheinlich durch eine weitere Funktion, die das Protein hat, ausgelöst. Gerade bei *gene silencing* Suppressoren ist es nicht ungewöhnlich, dass sie mehrere Aufgaben erfüllen. Beschriebene *gene silencing* Suppressoren von Pflanzenviren fungierten auch als *movement*-Protein für die *cell-to-cell* Verbreitung über Plasmodesmata oder auch für die *long-distance* Verbreitung über das Phloem. Sie können als Proteasen während der Prozessierung auftreten oder spielen bei der RNA-Amplifikation eine Rolle (Voinnet *et al.*, 2000; Kasschau & Carrington, 2001; Park *et al.*, 2004).

Auch bei einigen anderen Mykoviren konnte ein *gene silencing* Suppressor identifiziert werden. Das Protein P29 des Hypovirus CHV1 (Segers *et al.*, 2006) sowie das Protein P32 des Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 (RnMyRV3; Yaegashi *et al.*, 2013) zeigen *gene silencing* Funktion. Homologien zwischen diesen beiden Proteinen und P5 konnten nicht festgestellt werden.

4.7 Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die viralen Proteine P1-P5 von FgV-ch9 näher untersucht. Dabei sollten Schlüsse über deren Zeitpunkt der Synthese, Prozessierung, Funktion und Wechselwirkung mit dem Wirt *F. graminearum* gezogen werden.

Zunächst wurden Abschnitte aller fünf Segmente erneut sequenziert, wobei im nicht-kodierenden C-terminalen Bereich von P2 und P3 sowie im kodierenden C-terminalen Bereich von P5 Duplikationen der Sequenz ermittelt wurden. Diese neuen Sequenzen wurden mit denen nahe verwandter Viren verglichen und es stellte sich heraus, dass diese teilweise ebenfalls über Duplikationen in ihrem Genom verfügen.

Mittels Zeitreihen von infiziertem Myzel, analysiert mit spezifischen Antiseren, konnten Expressions- und Prozessierungszeiträume der viralen Proteine ermittelt werden.

Durch die Expression von viralen Proteinen in *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* konnten Rückschlüsse über deren Prozessierung gezogen werden. Es konnte ermittelt werden, dass das Protein P2 C-terminal durch wirtseigene Proteasen prozessiert wird, während die C-terminale Prozessierung beim Protein P3 von weiteren viralen Proteinen abhängig ist. Autoproteolytische Prozesse konnten in beiden Fällen ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde deutlich, dass auch am N-Terminus von P3 und ggf. P1 einzelne Aminosäuren abgebaut werden. Die genauen Prozessierungs-Schnittstellen konnten allerdings in keinem dieser Fälle identifiziert werden. Bei P4 und P5 treten keine offensichtlichen Prozessierungen auf.

Die Charakterisierung der *F. graminearum*-Expressionsmutanten führte zu Erkenntnissen über die Wirkung der viralen Proteine auf ihren Wirt. Es wurde das Wachstum auf Festmedium, die Stressresistenz, die Virulenz auf der Wirtspflanze, sowie die sexuelle und asexuelle Sporulation analysiert. Daraus ließen sich Schlussfolgerungen über die Funktion der einzelnen viralen Proteine ziehen.

Die Funktion von P1 als RdRP war bereits bekannt. Bei P2 handelt es sich vermutlich um ein Strukturprotein, das eine Aufgabe im Inneren des Partikels erfüllt. Bei P3 handelt es sich um das Hüllprotein, welches den Hauptauslöser der Hypovirulenz darstellt. Das Protein P4 nimmt starken Einfluss auf die sexuelle und asexuelle Sporulation, die genaue Funktion konnte allerdings nicht ermittelt werden. Das Protein P5 fungiert als *gene silencing* Suppressor. Die auf diesem Protein vorhandenen Zinkfinger-Domänen legen nahe, dass dies durch Binden von siRNA geschieht. Ein Nachweis der Abnahme von siRNA in den Suppressor-exprimierenden Mutanten konnte nicht erbracht werden.

5 Zusammenfassung

Fusarium graminearum ist ein weltweit vorkommendes Gräserpathogen, welches erheblichen wirtschaftlichen Schaden verursacht. Die Bekämpfung mit Fungiziden ist schwierig und resistente Sorten nicht erhältlich. Eine alternative Bekämpfung könnte durch Hypovirulenz induzierende Viren etabliert werden. Ein solches Virus ist *Fusarium graminearum* Virus-China 9 (FgV-ch9). Von diesem Virus waren bisher lediglich die Sequenz und die Ausbildung von Hypovirulenz beschrieben worden. Seine Replikationsstrategie, die Expression und Prozessierung seiner Proteine sowie deren Funktion und Einfluss auf den Wirt wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Das Segment 1 und das darauf kodierte Protein P1 zeigten weder Besonderheiten auf Nukleinsäure- noch auf der Proteinebene. Wie schon vorher bekannt war, kodiert es für die viruseigene RdRP und ist Bestandteil des Partikels. Die Expression in Bakterien und Hefen zeigte ein Protein mit dem errechneten Molekulargewicht. Durch Expression im natürlichen Wirt *F. graminearum* wurden keine signifikanten phänotypischen Veränderungen hervorgerufen.

Die Segmente 2 und 3 zeigen einzigartige nicht-kodierende *head-to-tail* Duplikationen des extremen 3' Endes mit unbekannter Funktion. Ein Sequenz-Artefakt kann ausgeschlossen werden, da nach eingehender Analyse ebenfalls ähnliche Duplikationen in nahe verwandten Viren gefunden wurden. Die Proteine, die von den beiden Segmenten translatiert werden, sind jeweils Bestandteil des Partikels und werden während der Morphogenese prozessiert. Diese Prozessierung ist bei P2 auf eine Protease des Wirtes zurückzuführen. Bei P3 ist die Prozessierung durch andere virale Proteine wahrscheinlich, jedoch konnte eine Autoproteolyse ausgeschlossen werden. Diese Interpretation ist auf Western-Blot-Analysen nach Expression in verschiedenen Wirtsorganismen begründet. Während dem Protein P2 lediglich ein starker Einfluss auf die Konidienproduktion zugeschrieben werden kann, hat das Protein P3 einen zentralen Einfluss auf die Biologie des Wirtes. Die Expression von P3 im natürlichen Wirt *F. graminearum* war nur möglich, wenn ein schwacher bzw. ein induzierbarer Promoter verwendet wurde. Selbst bei einer schwachen Expression war das radiale Wachstum der Mutanten eingeschränkt und sie wiesen eine signifikant geringere Toleranz gegenüber

Stress auf. Genau wie der virusinfizierte Wildtyp zeigten die P3 exprimierenden Mutanten Hypovirulenz. Diese ist in beiden Fällen darauf zurückzuführen, dass das Myzel den Rachisknoten nicht überwinden kann. Wie bei einer Infektion mit dem virusfreien Wildtyp von *F. graminearum* werden in beiden Fällen Infektionsstrukturen und das Mykotoxin DON auf der Wirtspflanze gebildet. Der Gehalt an DON ist in den infizierten Ährchen sogar stark erhöht, was durch anhaltende Induktion der Toxinbiosynthese durch den Rachisknoten erklärt werden kann. Die Expression eines weiteren Virulenzfaktors, der Lipase FGL1, ist hingegen deutlich reduziert. Dies könnte unter anderem der Grund für das Feststecken der Infektion im Rachisknoten sein.

Die beiden Nichtstruktur Proteine P4 und P5 sind nicht, bzw. nicht auffällig, prozessiert. Die Funktion von P4 ist völlig rätselhaft. Lediglich eine Beteiligung an Stressreaktionen, eine stark erhöhte Produktion von Konidien sowie eine starke Beschleunigung der Ascosporenbildung konnten diesem Protein zugeschrieben werden. Eine regulatorische Funktion in frühen Phasen der Infektion, die allerdings in einer Einzel-Expression des Proteins im Wirt nicht sichtbar sein muss, ist wahrscheinlich, da es nur in diesen frühen Stadien nachgewiesen werden konnte.

Das Protein P5 hat durch eine Duplikation im kodierenden Bereich ein um 16 kDa erhöhtes Molekulargewicht. Dieses erhöhte Molekulargewicht fiel beim Nachweis des P5 in infiziertem Myzel mittels Western-Blots auf und wurde durch Expression und Sequenzierung bestätigt. Im nahe verwandten Virus FgV2 konnte solch eine Duplikation allerdings nicht nachgewiesen werden. Die Duplikation resultiert in einer Verdoppelung der ursprünglich drei nachgewiesenen Zink-Finger Motive. Diese Zink-Finger-Domänen können Nukleinsäure binden, was beispielsweise Auswirkungen auf den Mechanismus des *gene silencing* haben könnte. Tatsächlich konnte im heterologen System Tabak ausschließlich für P5 eine *gene silencing* Suppressor Funktion nachgewiesen und im natürlichen Wirt *F. graminearum* bestätigt werden.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse über die Replikationsstrategie, die Expression und Prozessierung der Proteine von FgV-ch9 sowie deren Funktion und Einfluss auf den Wirt zusammengetragen werden. Diese können eine Grundlage für die Anwendung des Virus als nachhaltiges und ökologisch vertretbares Pflanzenschutzmittel bilden.

6 Summary

The necrotrophic ascomycete *Fusarium graminearum* is a globally occurring pathogen of grasses and cereals, which causes severe economic damage. The use of fungicides is difficult and until now there are no relevant resistant cultivars available. Hypovirulence inducing viruses could be used as an alternative biocontrol agent. *Fusarium graminearum* virus-china 9 (FgV-ch9) is such a hypovirulence inducing virus. So far only the sequences of its segments and the ability to induce hypovirulence are known about this virus. Its replication strategy, the expression and processing of its proteins as well as their function and influence on the host were investigated in this thesis.

Segment 1 and the protein P1, encoded thereon, neither showed any peculiarities on the nucleic acid nor on the protein level. As already known, it encodes the viral RdRp and is part of the particle. During the expression in bacteria and yeast a protein of the calculated molecular weight was detected. When it is expressed in the natural host *F. graminearum*, no significant phenotypical changes occurred.

The segments 2 and 3 show unique head-to-tail duplications at their extreme 3'-terminus with unknown function. A sequence artefact can be excluded because similar duplications could also be found in closely related viruses. The proteins translated from these segments are part of the particle and get processed during morphogenesis. The processing of P2 requires a host protease, while the processing of P3 seems to depend on other viral proteins. Autoproteolysis can be ruled out. This interpretation is based on Western blot analysis after expression in different organisms. While P2 has only a significant influence on the conidia production, the protein P3 has a major impact on the biology of the host. The expression of P3 in the natural host *F. graminearum* was only possible with a weak or inducible promoter. Even a low level of protein expression leads to reduced radial growth and reduced tolerance against stress. The P3 mutants, like the virus-infected wildtype, showed hypovirulence. In both cases the hypovirulence is caused by the inability of the fungus to pass the rachis node. Like the virus-free wildtype, both hypovirulent strains form infection structures and produce the mycotoxin DON while infecting the host plant. The amount of DON in infected spikelets is strongly increased, which can be explained by the continuing

induction of the toxin biosynthesis by the rachis node. However, the expression of another virulence factor, the lipase FGL1, is significantly reduced. This could be one of the reasons why the fungus is not able to grow through the rachis node.

The non-structural proteins P4 and P5 are not, or not significantly, processed. The function of P4 is a total mystery. Only a participation in stress reactions, a strongly increased production of conidia and a high acceleration of ascospore formation is attributed to this protein. A regulatory function during the early stages of infection, which however does not have to be visible in an expression of the protein alone in the host, is likely, since it could only be detected in these stages.

Because of a duplication in the coding region, the molecular weight of protein P5 is increased by 16 kDa. This increased molecular weight was observed during the detection of P5 in infected mycelia by Western blots and confirmed by expression and sequencing. However, a duplication like this could not be detected in the closely related virus FgV2. The duplication results in a doubling of the originally three detected zinc finger motifs. These zinc finger domains can bind nucleic acid, which could have, for example, an effect on the mechanism of gene silencing. In fact, in the heterologous system tobacco a gene silencing suppressor function could be detected exclusively for P5 and confirmed in the natural host *F. graminearum*.

The results of this study led to new understanding of the replication strategy, the proteins' expression and processing in FgV-ch9 as well as their function and impact on the host. This can provide the basis for the application of the virus as a sustainable and ecologically acceptable agent of biocontrol.

7 Literatur

Adams TH, Wieser JK, Yu JH (1998) Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 35-54

Alder A (2014) Expression von P5 während des Replikationszyklus von Virus China 9 aus *Fusarium graminearum*. Bachelorarbeit, Universität Hamburg, Deutschland: 77 Seiten

Aliyari R, Wu Q, Li H-W, Wang X-H, Li F, Green LD, Han CS, Li W-X, Ding S-W (2008) Mechanism of induction and suppression of antiviral immunity directed by virus-derived small RNAs in *Drosophila*. *Cell Host & Microbe* 4: 387-397

Allen TD, Nuss DL (2004) Specific and common alternations in host gene transcript accumulation following infection of the chestnut blight fungus by mild and severe hypoviruses. *Journal of Virology* 78: 4145-4155

Anonymus (2005) Commission regulation (EC) No. 856/2005 of 6 June 2005 amending regulation (EC) No. 466/2001 as regards Fusarium toxins. *Official Journal of the European Union L 143*: 3-8

Aoki N, Moriyama H, Kodama M, Arie T, Teraoka T, Fukuhara T (2009) A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alernaria alernata*. *Virus Research* 140: 179-187

Arnold MM, Brownback CS, Taraporewala ZF, Patton JT (2012) Rotavirus variant replicates efficiently although encoding an aberrant NSP3 that fails to induce nuclear localization of poly(A)-binding protein. *Journal of General Virology* 93: 1483-1494

Auh CK, Murphy TM (1995) Plasma Membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by Phytophthora elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiology* 107: 1241-1247

Bai GH, Desjardins AE, Plattner RD (2002) Deoxynivalenol-nonproducing *Fusarium graminearum* causes initial infection, but does not cause disease spread in wheat spikes. *Mycopathologia* 153: 91-98

Baulcombe D (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363

Béclin C, Boutet S, Waterhouse P, Vaucheret H (2002) A branched pathway for transgene-induced RNA silencing in plants. *Current Biology* 12: 684-688

Bell, G (1982) The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality. Croom Helm, London, UK

Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* 16: 497-516

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366

Bertolotti-Ciarlet A, Crawford SE, Hutson AM, Estes MK (2003) The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein. *Journal of Virology* 77: 11603-11615

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7: 1513-1523

Blum C (2012) Etablierung eines Systems für den Nachweis von *gene silencing* Suppressoren zur Anwendung bei idem Mycovirus FgV-ch9. Masterarbeit, Universität Hamburg, Deutschland: 111 Seiten

Blum C, Alder A, Heinze C (2015) Structural and non-structural proteins of *Fusarium graminearum* mycovirus-china 9 (FgV-ch9) and their processing in the fungal host. 47. Jahrestreffen des Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen", Posterbeitrag; 16. und 17. März 2015, Berlin, Deutschland

Blum C, Götsch S, Heinze C (2017) Duplications in the 3' termini of three segments of *Fusarium graminearum* virus China 9. *Archives of Virology* 162: 897

Blümke A, Falter C, Herrfurth C, Sode B, Bode R, Schäfer W, Feussner I, Voigt CA (2014) Secreted fungal effector lipase releases free fatty acids to inhibit innate immunity-related callose formation during wheat head infection. *Plant Pathology* 165: 346-358

Boenisch MJ, Schäfer W (2011) *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat. *BMC Plant Pathology* 11: 110

Bönnighausen J (2014) Charakterisierung des Metaboloms sowie des GABA-shunts während der Weizenblüteninfektion von *Fusarium graminearum*. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland: 157 Seiten

Brückner E (2012) Charakterisierung einer Adenylatzyklase-Ausschaltmutante von *Fusarium graminearum*. Bachelorarbeit, Universität Hamburg, Deutschland: 83 Seiten

Brune W, Ménard C, Hobom U, Odenbreit S, Messerle M, Koszinowski UH (1999) Rapid identification of essential and nonessential herpesvirus genes by direct transposon mutagenesis. *Nature Biotechnology* 17: 360-364

- Bryant JE, Vasconcelos PFC, Rijnbrand RCA, Mutebi JP, Higgs S, Barrett ADT (2005) Size heterogeneity in the 3' noncoding region of South American isolates of Yellow fever virus. *Journal of Virology* 79: 3807-3821
- Buck KW (1986) Fungal Virology – an Overview. In: Fungal Virology (Eds. Buck KW). CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: 1-84
- Castón JR, Ghabrial SA, Jiang D, Rivas G, Alfonso C, Roca R, Luque D, Carrascosa JL (2003) Three-dimensional structure of Penicillium chrysogenum virus: a double-stranded RNA virus with a genuine T=1 capsid. *Journal of Molecular Biology* 331: 417-431
- Cavinder B, Sikhakolli U, Fellows KM, Trail F (2012) Sexual development and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. *Journal of Visualized Experiments* 61: e3895
- Chang SS, Zhang Z, Liu Y (2012) RNA interference pathways in fungi: mechanisms and functions. *Annual Review of Microbiology* 66: 305-323
- Chen Y, Gao Q, Huang M, Liu Y, Liu Z, Liu X, Ma Z (2015) Characterization of RNA silencing components in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports* 5: 12500
- Chetverin AB, Chetverina HV, Demidenko AA, Ugarov VI (1997) Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell* 88: 503-513
- Chiba S, Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N (2010) マイコウイルスとヴァイロコントロール. *Uirusu* 60:163-76
- Chiba S, Lin YH, Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N (2013a) Effects of defective interfering RNA on symptom induction by, and replication of, novel partitivirus from a phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*. *Journal of Virology* 87: 2330-2341
- Chiba S, Hleibieh K, Delbianco A, Klein E, Ratti C, Ziegler-Graff V, Bouzoubaa S, Gilmer D (2013b) The benyvirus RNAsilencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nuclear localization for its silencing-suppression activity. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26: 168-181
- Cho WK, Lee KM, Yu J, Son Moonil, Kim KH (2013) Mycoviruses: Chapter Ten – Insight into mycoviruses infection *Fusarium* species. *Advances in Virus Research* 86: 273-288

Chu YM, Jeon JJ, Yea SJ, Kim YH, Yun SH, Lee YW, Kim KH (2002) Double-stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2529-2534

Chu YM, Lim WS, Yea SJ, Cho JD, Lee YW, Kim KH (2004) Complexity of dsRNA mycovirus isolated from *Fusarium graminearum*. *Virus Genes* 28: 135-143

Coenen A, Kevei F, Hoekstra RF (1997) Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. *Genetic Research* 69: 1-10

Cogoni C (2001) Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Annual Review of Microbiology* 55: 381-406

Craven MG, Pawlyk DM, Choi GH, Nuss DL (1993) Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *Journal of Virology* 67: 6513-6521

Cuomo CA, Güldener U, Xu JR, Trail F, Turgeon BG, Di Pietro A, Walton JD, Ma LJ, Baker SE, Rep M, Adam G, Antoniw J, Baldwin T, Calvo S, Chang YL, Decaprio D, Gale LR, Gnerre S, Goswami RS, Hammond-Kosack K, Harris LJ, Hilburn K, Kennel JC, Kroken S, Magnuson JK, Mannhaupt G, Mauceli E, Mewes HW, Mitterbauer G, Münsterkötter M, Nelson O, O'donnell K, Oullet T, Qi W, Quesneville H, Roncero MI, Seong KY, Tetko IV, Urban M, Waalwijk C, Ward TJ, Birren BW, Kistler HC (2007) The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science* 317: 1400-1402

Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S, Baulcombe DC (2000) An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553

Darissa O (2011) Molecular characterization of a novel segmented dsRNA mycovirus and its association with hypovirulence of *Fusarium graminearum*. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland: 119 Seiten

Darissa O, Willingmann P, Schäfer W, Adam G (2011) A novel double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*: Nucleic acid sequence & genomic structure. *Archives of Virology* 156: 647-658

Darissa O, Adam G, Schäfer W (2012) A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. *Journal of Plant Pathology* 134: 181-189

Day PR, Dodds JA, Elliston JE, Jaynes RA, Anagnostakis SL (1977) Double-stranded RNA in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 67: 1393-1396

Deng F, Allen TD, Nuss DL (2007) Ste12 transcription factor homologue CpST12 is down-regulated by hypovirus infection and required for virulence and female fertility of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryotic Cell* 6: 235-244

Dougherty WG, Semler BL (1993) Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews* 57: 781-882

Dubin HJ, Gilchrist L, Reeves L, McNab A (1997) Fusarium head scab: global status and prospects. CIMMYT, Mexiko-Stadt, Mexiko

van Egmond HP, Jonker MA (2004) Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003. FAO Food and Nutrition Paper No. 81. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rom, Italien

Emmett RW, Parbery DG (1975) Apressoria. *Annual Review of Phytopathology* 13: 147-165

Finerty PC, Bass BL (1997) A *Xenopus* zinc finger protein that specifically binds dsRNA and RNA-DNA hybrids. *Journal of Molecular Biology* 271: 195-208

Garten H (2013) Ansätze zur Herstellung von spezifischen Antiseren gegen FgV-ch9. Masterarbeit, Universität Hamburg, Deutschland: 76 Seiten

Ghabrial SA, Suzuki N (2009) Viruses of plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 47: 353-384

Ghabrial SA, Castón JR (2011) *Chrysoviridae*. In: *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Eds. King, AMQ, Lefkowitz E, Adams, MJ, Carstens, EB). Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande

Ghabrial SA, Cáston JR, Jiang D, Nibert ML, Suzuki N (2015) 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479: 356-368

Gilbert J, Fernando WGD (2004) Epidemiology and biological control of *Gibberella zeae*/*Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 464-472

Goswami RS, Kistler HC (2004) Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology* 5: 515-525

Götsch S (2013) Viruseliminierung und Reinfektion von *Fusarium graminearum* V-Ch9. Bachelorarbeit, Universität Hamburg, Deutschland: 73 Seiten

Götsch S (2015) Strategien zur Etablierung eines selbst-replizierenden Elements für die Genomanalyse des Mykovirus FgV-ch9. Masterarbeit; Universität Hamburg, Deutschland: 93 Seiten

Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant Journal* 23: 441-450

Gritsun TS, Gould EA (2006) The 3' untranslated regions of Kamiti River virus and Cell fusing agent virus originated by self-duplication. *Journal of General Virology* 87: 2615-2619

Gyml AP, Belousov EV, Maslova SV, Khitrina EV, Chetverin AB, Agol VI (1999) Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *Journal of Virology* 73: 8958-8965

Haas G, Azevedo J, Moissiard G, Geldreich A, Himber C, Bureau M, Fukuhara T, Keller M, Voinnet O (2008) Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *The EMBO Journal* 27: 2102-2112

Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952

Hammond SM, Caudy AA, Hannon G (2001) Post-transcriptional gene silencing by doublestranded RNA. *Nature Reviews Genetics* 2: 111-119

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557-580

Hannon G (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251

Heiniger U, Rigling D (1994) Biological control of chestnut blight in Europe. *Annual Review of Phytopathology* 32: 581-599

Heinze C, Meiss E, Adam G, Casper R (1995) The complete nucleotide sequence of the S RNA of a new *tospovirus* species, representing serogroup IV. *Phytopathology* 85: 683-690

Heinze C, Roggero P, Sohn M, Vaira AM, Masenga V, Adam G (2000) Peptide-derived broad-reacting antisera against tospovirus NSs-protein. *Journal of Virological Methods* 89: 137-146

Hollings M (1962) Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196: 962-965

- Huang L, Buchenauer H, Han H, Zhang X, Kang Z (2008) Ultrastructural and cytochemical studies on the infection process of *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115: 6-19
- Iakoucheva LM, Kimzey AL, Masselon CD, Smith RD, Dunker AK, Ackerman EJ (2001) Aberrant mobility phenomena of the DNA repair protein XPA. *Protein Society* 10: 1353-1362
- Ihrmark K, Johannesson H, Stenstrom E, Stenlid J (2004) Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. *Fungal Genetics and Biology* 36: 147-154
- Ilgen P, Hadeler B, Maier FJ, Schäfer W (2009) Developing kernel and rachis node induce the trichothecene pathway of *Fusarium graminearum* during wheat head infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 899-908
- Irigoyen N, Castón JR, Rodríguez JF (2012) Host proteolytic activity is necessary for Infectious bursal disease virus capsid protein assembly. *Journal of Biological Chemistry* 287: 24473-24482
- Iuchi S (2001) Three classes of C₂H₂ zinc finger proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 625-635
- Jackson AO, Larkins BA (1976) Influence of ionic strength, pH and chelation of divalent metals on isolation of polyribosomes from tobacco leaves. *Plant Physiology* 57: 5-10
- Jansen V, Alvarez L, Balbach M, Strünker T, Hegemann P, Kaupp UB, Wachten D (2015) Controlling fertilization and cAMP signaling in sperm by optogenetics. *eLife* 2015;4:e05161
- Jiang D, SA Ghabrial (2004) Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus Chrysovirus. *Journal of General Virology* 85: 2111-2121
- Jiang D, Fu Y, Guoqing L, Ghabrial SA (2013) Mycoviruses: Chapter Eight – Viruses of the pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Advances in Virus Research* 86: 215-248
- Ju X, Li B, Fu Y, Xie J, Cheng J, Ghabrial SA, Li G, Yi X, Jiang D (2013) Extracellular transmission of a DNA Mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 1452-1457
- Kamiuchi T, Abe E, Imanishi M, Kaji T, Nagaoka M, Sugiura Y (1998) Artificial nine zinc-finger peptide with 30 base pair binding sites. *Biochemistry* 37: 13827-13834

- Kang Z, Buchenauer H (2000) Ultrastructural and immunocytochemical investigation of pathogen development and host responses in resistant and susceptible wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 255-268
- Kasschau KD, Carrington JC (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of Potyviral HC-Pro. *Virology* 285: 71-81
- King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (Eds.) (2011) Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande
- Kirkegaard K, Baltimore D (1986) The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell* 47: 433-443
- Kraus D (2014) Consolidated data analysis and presentation using an open-source add-in for the Microsoft Excel® spreadsheet software. *Medical Writing* 23: 25-28
- Kritzman G, Okon Y, Chet I, Henis Y (1976) Metabolism of L-threonine and its relationship to Sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii*. *Journal of General Microbiology* 95: 78-86
- Kruszewska JS (1999) Heterologous expression of genes in filamentous fungi. *Acta Biochimica Polonica* 46: 181-195
- Kwon SJ, Cho SY, Lee KM, Yu J, Son M, Kim KH (2009) Proteomic analysis of fungal host factors differentially expressed by *Fusarium graminearum* infected with *Fusarium graminearum* virus-DK21. *Virus Research* 144: 96-106
- Landeo-Ríos Y, Navas-Castillo J, Moriones E, Cañizares MC (2015) The p22 RNA silencing suppressor of the crinivirus Tomato chlorosis virus preferentially binds long dsRNAs preventing them from cleavage. *Virology* 488: 129-136
- Lee KM, Cho WK, Yu J, Son M, Choi H, Min K, Lee YinW, Kim KH (2014) A comparison of transcriptional patterns and mycological phenotypes following infection of *Fusarium graminearum* by four mycoviruses. *PLoS ONE* 9: e100989
- Li L, Liu J, Xu A, Wang T, Chen J, Zhu X (2013) Molecular characterization of a trisegmented Chrysovirus isolated from the radish *Raphanus sativus*. *Virus Research* 176: 169-178
- Li P, Zhang H, Chen X, Qiu D, Guo L (2015) Molecular characterization of a novel hypovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* 481: 151-160

- Lin YH, Chiba S, Tani A, Kondo H, Sasaki A, Kanematsu S, Suzuki N (2012) A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology* 426: 42-50
- Lipardi C, Wei Q, Paterson BM (2001) RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107: 297-307
- Liu N, Fan F, Qui D, Jiang L (2013) The transcription cofactor FgSwi6 plays a role in growth and development, carbendazim sensitivity, cellulose utilization, lithium tolerance, deoxynivalenol production and virulence in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* 58-59: 42-52
- Lockington R, Scazzocchio C, Sequeval D, Mathieu M, Felenbok B (1987) Regulation of alcA, the positive regulatory gene of the ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology* 1: 275-281
- Lukhovitskaya NI, Solovieva AD, Boddeti SK, Thaduri S, Solovyev AG, Savenkov EI (2013a) An RNA Virus-encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. *Plant Cell* 25: 960-973
- Lukhovitskaya NI, Gushchin VA, Solovyev AG, Savenkov EI (2013b) Making sense of nuclear localization: a zinc-finger protein encoded by a cytoplasmically replicating plant RNA virus acts a transcription factor. *Plant Signaling & Behavior* 8: e25263
- Magdwick JW, West JW, White RP, Semenov MA, Townsend JA, Turner JA, Fitt BDL (2011) Impacts of climate change on wheat anthesis and Fusarium ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology* 130: 117-131
- Magsig B (2013) Stabile Infektion von *Fusarium graminearum* PH1 mit dem Mycovirus V-CH9. Masterarbeit; Universität Hamburg, Deutschland: 85 Seiten
- Mahy BW, van Regenmortel MV (Eds.) (2010) Desk encyclopedia of plant and fungal virology. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Niederlande
- Maier FJ, Miedaner T, Hadelers B, Felk A, Salomon S, Lemmens M, Kassner H, Schäfer W (2006) Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (Tri5) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* 7: 449-461
- Manstretta V, Rossi V (2016) Effects of temperature and moisture on development of *Fusarium graminearum* perithecia in maize stalk residues. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 184-191

- Markell SG, Francl LJ (2003) Fusarium head blight inoculum: species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. *Plant Disease* 87: 814-820
- Márquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ (2007) A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515
- Marriott AC, Dimmock NJ (2010) Defective interfering viruses and their potential as antiviral agents. *Reviews in Medical Virology* 20: 51-62
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110: 563-574
- Mateu M (2013) Assembly, stability and dynamics of virus capsids. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 531: 65-79
- Matzke MA, Mette MF, Matzke AJM (2000) Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanism in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biology* 43: 401-415
- McCormac AC, Elliott MC, Chen DF (1998) A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Journal of Molecular Biotechnology* 9: 155-159
- McMullen M, Jones R, Gallenberg D (1997) Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact. *Plant Disease* 81: 1340-1348
- Mentges M (2012) Molekulare Charakterisierung zweier Regulatoren der Stressantwort in *Fusarium graminearum*. Bachelorarbeit, Universität Hamburg, Deutschland: 74 Seiten
- Mérai Z, Kerényi Z, Molnár A, Barta E, Válczi A, Bisztray G (2005) Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNA without size specificity. *Journal of Virology* 79: 7217-7226
- Mirhosseini N, Gray PL, Tizard I, Payne S (2012) Complete genome sequence of bavian Bornovirus genotype 1 from a macaw with proventricular dilatation disease. *Journal of Virology* 86: 7023
- Molekeki N, van Heerden SW, Wingfield MJ, Wingfield D (2003) Transformation of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe RNA virus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3952-3956

- Molnar A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyán J (2005) Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79: 7812-7818
- Nagy PD, Bujarski JJ (1993) Targeting the site of RNA-RNA recombination in brome mosaic virus with antisense sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 6390-6394
- Nagy PD, Simon AE (1997) New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235: 1-9
- Nakagawa A, Miyazaki N, Taka J, Naitow H, Ogawa , Fujimoto Z, Mizuno H, Higashi T, Watanabe Y, Omura T, Cheng RH, Tsukihara T (2003) The atomic structure of Rice dwarf Virus reveals the self-assembly mechanism of component proteins. *Structure* 11: 1227-1238
- Nakayashiki H, Hanada S, Nguyen BQ, Kadotani N, Tosa Y, Mayama S (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genetics and biology* 42: 275-283
- Nguyen QB (2008) Development of a novel RNA silencing system for functional genomics in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Dissertation; Kobe University, Japan: 135 Seiten
- Nuss DL (1992) Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiological Reviews* 56: 561-576
- Nuss DL (2005) Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nature Reviews Microbiology* 3: 632-642
- Pan J, Dong L, Lin L, Ochoa WF, Sinkovits RS, Havens WM, Nibert ML, Baker TS, Ghabrial SA, Tao YJ (2009) Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 4225-4230
- Park JW, Faure-Rabasse S, Robinson MA, Desvoyes B, Scholthof HB (2004) The multifunctional plant virus suppressor of gene silencing P19 interacts with itself and an RNA binding host protein. *Virology* 323: 49-58
- Park HS, Yu JH (2016) Molecular Biology of asexual sporulation in filamentous fungi. In: The Mycota Volume III – Biochemistry and Molekular Biology. (Eds. Hoffmeister D).Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland
- Pathak KB, Nagy PD (2009) Defective interfering RNAs: foes of viruses and friends of virologists. *Viruses* 1: 895-919

Paulitz TC (1999) Fusarium head blight: a re-emerging disease. *Phytoprotection* 80: 127-133

Pearson MN, Beever RE, Boine B, Arthur K (2009) Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 10: 115-128

Pfaffl MW, Horgan GW, 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

Pirgozliev SR, Edwards SG, Hare MC, Jenkinson P (2003) Strategies for the control of Fusarium head blight in cereals. *European Journal of Plant Pathology* 109: 731-742

Polashock JJ, Hillman BI (1994) A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8680-8684

Polashock JJ, Bedker PJ, Hillman BI (1997) Movement of a small mitochondrial double-stranded RNA element of *Cryphonectria parasitica*: ascospore inheritance and implications for mitochondrial recombination. *Molecular Genetics and Genomics* 256: 566-571

Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP (1995) Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Mikrobe Interactions Journal* 8: 593-601

Punt PJ, Dingemans MA, Kuyvenhoven A, Soede RD, Pouwels PH, van den Hondel CA (1990) Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans* gpdA gene encoding glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* 93: 101-109

Qu F, Morris TJ (2002) Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 193-202

Raffo AJ, Dawsen WO (1991) Construction of Tobacco mosaic virus subgenomic replicons that are replicated and spread systematically in Tobacco Plants. *Virology* 184: 277-289

Rath A, Cunningham F, Deber CM (2013) Acrylamide concentration determines the direction and magnitude of helical membrane protein gel shift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 15668-15673

Rawlinson CJ, Hornby D, Pearson V, Carpenter JM (1973) Virus-like particles in the take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis*. *Annals of Applied Biology* 74: 197-209

- Read N, Beckett A (1996) Ascus and ascospore morphogenesis. *Mycological Research* 100: 1281-1314
- Rehm H, Letzel T (2016) Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics. Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland
- Reichert VL, Choi M, Petrillo JE, Gehrke L (2007) Alfalfa mosaic virus coat protein bridges RNA and RNA-dependent RNA polymerase in vitro. *Virology* 364: 214-226
- Reinisch KM, Nibert ML, Harrison SC (2000) Structure of the reovirus core at 3.6 Å resolution. *Nature* 404: 960-967
- Reinisch KM (2002) The dsRNA *Viridae* and their catalytic capsids. *Nature Structural Biology* 9: 714-716
- Ribichich KF, Lopez SE, Vegetti AC (2000) Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease* 84: 794-802
- Riechmann JL, Laín S, García JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73: 1-16
- Robin C, Heiniger U (2001) Chestnut blight in Europe: diversity of *Cryphonectria parasitica*, hypovirulence and biocontrol. *Forest, Snow and Landscape Research* 76: 361-367
- Romaniuk PJ (1990) Characterization of the equilibrium binding of *Xenopus* transcription factor IIIA to the 5 S RNA gene. *Journal of Biological Chemistry* 265: 17593-17600
- Romano N, Macino G (1992) Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular Microbiology* 6: 3343-3353
- Roth BM, Pruss GJ, Vance VB (2004) Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 102: 97-108
- Ruiz MT, Voinnet O, Baucombe DC (1998) Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *The Plant Cell* 10: 937-946
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA
- Savard ME, Sinha RC, Seaman WL, Fedak G (2000) Sequential distribution of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat spikes after inoculation with *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22: 280-285

- Schmitt MJ, Breinig F (2006) Yeast viral killer toxin: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology* 4: 212-221
- Schoustra S, Rundle HD, Dali R, Kassen R (2010) Fitness-associated sexual reproduction in a filamentous fungus. *Current Biology* 20: 1350-1355
- Segers GC, van Wezel R, Zhang X, Hong Y, Nuss DL (2006) Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNAsilencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryotic Cell* 5: 896-904
- Segers GC, Zhang X, Deng F, Sun Q, Nuss DL (2007) Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12902-12906
- Shapira R, Nuss DL (1991) Gene expression by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus involves two papain-like protease activities. *Journal of Biological Chemistry* 266: 19419-19425
- Sharma R, Katoch M, Srivastava PS, Qazi GN (2009) Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25: 2083-2094
- Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) *The Potyviridae*. CAB International, Wallingford, UK
- Simon AE, Roossinck MJ, Havelda Z (2004) Plant virus satellite and defective interfering RNAs: new paradigms for a new century. *Annual Review of Phytopathology* 42: 415-437
- Snijders CHA (1990) Fusarium head blight and mycotoxin contamination of wheat, a review. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 96: 187-198
- Soldevila AI, Huang S, Ghabrial SA (1998) Assembly of the Hv190S Totivirus capsid is independent of posttranslational modification of the capsid protein. *Virology* 251: 327-333
- Son M, Yu J, Kim KH (2015) Five questions about mycoviruses. *PLoS Pathogens* 11: e1005172
- Son M, Lee Y, Kim KH (2016) The transcription cofactor Swi6 of the *Fusarium graminearum* is involved in Fusarium graminearum virus 1 infection-induced phenotypic alternations. *Plant Pathology Journal* 32: 281-289
- Stack RW (1999) Return of an old problem: Fusarium head blight of small grains. *APSnet Plant Health Progress*

- Stauffer Thompson KA, Yin J (2010) Population dynamics of an RMA virus and its defective interfering particles in passage cultures. *Virology Journal* 7: 257
- Sun L, Suzuki N (2008) Intragenic rearrangements of a mycovirus induced by the multifunctional protein p29 encoded by the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *RNA* 14: 2557-2571
- Sun Q, Choi GH, Nuss DL (2009) A single argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 17927-17932
- Sung JM, Cook RJ (1981) Effects of water potential on reproduction and spore germination by *Fusarium roseum* "Graminearum", "Culmorum" and "Avenaceum". *Ecology and Epidemiology* 71: 499-504
- Sutton JC (1982) Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 4: 195-209
- Suzuki N, Chen B, Nuss DL (1999) Mapping of a Hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to Potyvirus HC-Pro protease. *Journal of Virology* 73: 9478-9484
- Tabara H, Yigit E, Siomi H, Mello CC (2002) The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DEXH-box helicase to direct RNAi in *C. elegans*. *Cell* 109: 861-871
- Tacken MGJ, Peeters BPH, Thomas AAM, Rottier PJM, Boot HJ (2002) Infectious bursal disease virus capsid protein VP3 interacts both with VP1, the RNA-dependent RNA polymerase, and with viral double-stranded RNA. *Journal of Virology* 76: 11301-11311
- Tan X (2008) A comparative testing of *Cucumber Mosaic Virus* (CMV)-based constructs to generate virus resistant plants in tobacco species. Dissertation, Universität Hamburg, Deutschland: 97 Seiten
- Tang W, Zhang J, Wang Z, Hong M (2000) The cause of deviation made in determining the molecular weight of His-tag fusion proteins by SDS-PAGE. *Acta Phytophysiologica Sinica* 26: 64-68
- Taniguchi K, Urasawa S (1995) Diversity in rotavirus genomes. *Seminars in Virology* 6: 123-131
- Tao YJ, Ye Q (2010) RNA virus replication complexes. *PLoS Pathogens* 6: e1000943
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 523-533

- Torres MA, Jones JDG, Dangl JL (2006) Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141: 373-378
- Trail F, Xu H, Loranger R, Gadoury D (2002) Physiological and environmental aspects of ascospore discharge in *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Mycologia* 94: 181-189
- Trail F (2009) For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics Era. *Plant Pathology* 149: 103-110
- Urayama S, Kato S, Suzuki Y, Aoki N, Le MT, Arie T, Teraoka T, Fukuhara T, Moriyama H (2010) Mycoviruses related to Chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Virology* 91: 3085-3094
- Urayama S, Ohta T, Onozuka N, Sakoda H, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Moriyama H (2012) Characterization of *Magnaporthe oryzae* Chrysovirus 1 structural proteins and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology* 86: 8287-8295
- Urayama S, Sakoda H, Takai R, Katoh Y, Minh Le T, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Moriyama H (2014a) A dsRNA mycovirus, *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B suppresses vegetative growth and development of rice blast fungus. *Virology* 448: 265-273
- Urayama S, Fukuhara T, Moriyama H, Toh-E A, Kawamoto S (2014b) Heterologous expression of a gene of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A disrupts growth of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology and Immunology* 58: 294-302
- Urayama S, Kimura Y, Katoh Y, Ohta T, Onozuka N, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Komatsu K, Moriyama H (2016) Suppressive effects of mycoviral proteins encoded by *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A on conidial germination of the rice blast fungus. *Virus Research* 223: 10-19
- Valli A, Dujovny G, García JA (2008) Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of silencing suppressor P1b from *Cucumber Vein Yellowing Ipomovirus*. *Journal of Virology* 82: 974-986
- Varrelmann M, Maiss E, Pilot R, Palkovics L (2007) Use of pentapeptide-insertion scanning mutagenesis for functional mapping of the plum pox virus helper component proteinase suppressor of gene silencing. *Journal of General Virology* 88: 1005-1015
- Voigt CA, Schäfer W, Salomon S (2005) A secreted lipase of *Fusarium graminearum* in a virulence factor required for infection of cereals. *Plant Journal* 42: 364-375

- Voigt CA, von Scheidt B, Gácsér A, Kassner H, Lieberei R, Schäfer W, Salomon S (2007) Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. *European Journal of Plant Pathology* 117: 1-12
- Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-167
- Voinnet O (2005) Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nature Reviews Genetics* 6: 206-221
- Wang L, Jiang J, Wang Y, Hong N, Zhang F, Xu W, Wang G (2014) Hypovirulence of the phytopathogenic fungus *Botryosphaeria dothidea*: association with a co-infecting Chrysovirus and a Partitivirus. *Journal of Virology* 88: 7517-7527
- Weinheimer I, Boonrod K, Moser M, Zwiebel M, Füllgrabe M, Krczal G, Wassenegger M (2010) Analysis of an autoproteolytic activity of rice yellow mottle virus silencing suppressor P1. *Biological Chemistry* 391: 271-281
- Willetts AJ (1972) Metabolism of threonine by *Fusaria* growth on threonine as the sole carbon and nitrogen source. *Antonie van Leeuwenhoek* 38: 591-603
- Wu M, Jin F, Zhang J, Yang L, Jiang D, Li G (2012) Characterization of a novel bipartite double-stranded RNA mycovirus conferring hypovirulence in the phytopathogenic fungus *Botrytis porri*. *Journal of Virology* 86: 6605-6619
- Xie J, Jiang D (2014) New insights into mycoviruses and exploration for the biological control of crop fungal diseases. *Annual Review of Phytopathology* 52: 45-68
- Yaegashi H, Yoshikawa N, Ito T, Kanematsu S (2013) A mycoreovirus suppresses RNA silencing in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology* 444: 409-416
- Yang X, Chang HY, Baltimore D (1998) Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Molecular Cell* 1: 319-325
- Yang M, May WS, Ito T (1999) JAZ requires the double stranded RNA-binding zinc finger motifs for nuclear localization. *Journal of Biological Chemistry* 274: 27399-27406
- Ye K, Malinina L, Patel D (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426: 874-878

Yu J, Lee KM, Son M, Kim HK (2011) Molecular characterization of *Fusarium graminearum* virus 2 isolated from *Fusarium graminearum* strain 98-8-60. *Plant Pathology Journal* 27: 285-290

Yu D, Pendergraft H, Liu J, Kordasiewicz HB, Cleveland DW, Swayze EE, Lima WF, Crooke ST, Prakash TP, Corey DR (2012) Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant huntingtin expression. *Cell* 150: 895-908

Yu J, Lee KM, Son M, Kim KH (2015) Effects of the deletion and over-expression of *Fusarium graminearum* gene FgHal2 on host response to mycovirus *Fusarium graminearum* virus 1. *Molecular Plant Pathology* 16: 641-652

Zhang X, Yuan Y-R, Pei Y, Lin S-S, Tuschl T, Patel DJ, Chua N-H (2006) Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis argonaute1* cleavage activity to counter plant defense. *Genes & Development* 20: 3255-3268

Zhang X, Nuss DL (2008) A host dicer is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 16749-16754

Zhang X, Shi D, Nuss DL (2012) Variations in hypovirus interactions with the fungal-host RNA-silencing antiviral-defense response. *Journal of Virology* 86: 12933-12939

Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J (2007) Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology* 45: 1-18

Zopf W (1890) *Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung*. Verlag von Eduard Trewendt, Breslau, Polen

8 Anhang

Anhang 1: Sequenzen von Segment 2, 3 und 5 mit Duplikationen

Die duplizierte Sequenz ist unterstrichen und die Duplikation selbst ist mit einer Pünktchen-Linie unterstrichen. Start- und Stopp-Codon sind fett dargestellt. Zusätzliche nicht-homologe Nukleotide sind durch eine Box markiert.

Anhang 1A: Sequenz von Segment 2 aus FgV-ch9

```

1      GCAAAAAAGA GAATAAAGCC ATTTGTGCAC ATAGGTGCGC GGGGAGAAAC TTTCGAACCG
61     TGGCAAATTT GCACCCTTGT TCTAACATAC ATCATGTCAG GACAATTGAA CATTTCGTTCA
121    ACCGCTCATC TTAGCAACA AGCCGTGGCA CCGGATCAAT ATCGTGCCGG CGCTGTGGCT
181    GGTCTTTGCA GTTACAGTGT CCCAACTCCA AGCATCACAC GCCGTGTGCA CTACAACGCA
241    GGTGTGTCAA CAGTCGAATC TGGCGCAGGC AGCGCTGACA AATTAGAGTC GTTCTACCAC
301    CACCGGATTC CAAGGGATGT GGCCTGACG TCACTGCGCG CCGGAACAAT TAAGCATGAT
361    GTGGTGACAT TTGATGTGAG TGAGCGGGGA CCGACGCAGC CCCTCACCAA CCAGATTGTT
421    AATGTCACGT ACAAGCAGCA ATACAATTTT ATCGACGTGG GCGTGAGCGC AGCCATAGTC
481    AGAACTGAGC TTCAATTCTT CCCCCTCCGT CCACCTGTTG ATAACACGAA GCTGAACCTA
541    CTTAAGAATG CGCTGACTGT GCATGAAGTG GTGAAGCCTC TCAAACCTACA ACTTCCCAAG
601    CTGGTGGCGC AATCGCACGC GTCGCCAGGC CTCCCCTTGT ACAGTGATTT CGAGCCACTG
661    CGGCGCGCGA TCGCGAACCA GGCCATAAAT GATGATTATG GCATGAGATT GTCACACATG
721    GCACGCATTG TGCTACACTC GTTCACTGCA CAAGCAGCCG GTTTATCACA CGCGGCTTCA
781    GATGTCGTGT CGACAGTTGA TGTTAGGACG ATGTTTGTGG CTGAAACGTA CCAGATGAGC
841    GCCGCCGAGT TGCAGCAGCG GCGTTCGTG TATGTGGATG ATGACATTAG TGAAGAATAC
901    TGGGCCTTCC TGCCAATGGC AATGCTGGGC ATAAACACTA ATGTGGGTAA TACGCGCACC
961    GTATACTCAA GGCTAGTGTC GGTGTCAGAG TTGCGCGGCG GTCAGCAGCT ATACTACGTG
1021   ATGAAAAGCG GGGAGAACAC ACCGGCCAAC ATCAGCCAAA ATGCTTGCGC GTCGGTATTG
1081   AACAACTCTG AGAAATGCCT CTCATTCTAT AACGCCTATG CGCAATCATT AGGTTTAGCA
1141   CAAGAGGCGT CATCAGTCCT GCGCCAAGTT GCGGTGATGC CATTTCATGTT TACTAAGAAC
1201   GCTACATTAC CGTACAAAGC ACGCGAGAAC CCCAAAGCTG ACGCATACTG GTACTTGCTC
1261   CGCGAGACTG CTGAGGACAT TCGATTGATG TACAATAGCG TTGAGACTCT GGTATATCAA
1321   GCCCCGATTA TCGCGGGCGC TGTTAAGGCA GGTGTGGCAG CGATATCTAT GTCGTACCGT
1381   GTCAAGAACT CGCTAAATGT GCCCTCCATA CTCGCAGCTA TCAAAGAGAT CCTCGCTGAC
1441   CCTAGTTCCT GCAGGAGCAC AATGTCAGCG GTGTTGTGCT CATACTGGTG TATCACGGCC
1501   GACTTGGAGT GGCTACTACC ATTCACAGAA GGAGTGGATA TAGCCATGGA TGCATGCGTG
1561   CGCGCCTACA GGGATTGCGG GTGGCTTATC ACGACTTACA ACGACTTGTC GTGCCTGGGT
1621   GCTTATGCTC CAGCATTTAG TACGGGTGTG GATATGCGCA ATGCACAATT CGGTTACGAC
1681   GTAGCGAGCA GACCGTATCT CGAGTCACTG ATCGCGCTGT CGACTCAAGG TTTACCGTGG
1741   ACGTTCGAAA ACGAATCTTT GGATGGACCA ACGACTGCAAC GTGCCGCCAG GGACGTGGTG
1801   CACTGGGAGG CCGTAATTCA ATGGGATGCT TACTCACCAG GCGAAGGCGT AAGCGTGGCC
1861   CACATAACGC CAACCCCGT CTCACCGAAA CAGGCCCGGC CTTTCGAGAC AGAGCCAAAC
1921   GCTCATCTGA GCGAACGGTG GCAAAAATCG AAGCGCACGC TGAGCGGTAA CGGCCTTAAA
1981   GCATTGACGC TGAGTCCACC ATCGGCTGCA GCACGCAGCG AAGCAACAAA AACGGCATCA
2041   GTAGCCGAAA CTCTGCGCAC ACACACGCGC TCAATGTCAG TCAAACCCAA CCCGGCACCC
2101   GGAACAAAGC CGCACAATAT GCCATGGCCA GTACAGGCGG CAGCCTCAGT ACCATCTGGC
2161   GAAGTTAGTG ATTCTGAGAG TACAACCACC CGAGTAACGC GGGCGAATTC AGTTGCATCA
2221   ACAGATGACA CGGCCAGTGC TGCTACGGTA GTTCAGACTG CCCACCCGG CGTGACAAGC
2281   CCGCCGCGTG GCCGGTCCGT TACACCTATA GGTACGACTG TGGATTTGAG CCGTGAACCA
2341   ACGCCATCGC TGGCGGAACG GCTGAAGTCA CCATTCCGTC ACCAACGTGT TAGATCACGC
2401   AGTGTGAGTA GTAGTCGTGG TCGTGCAGC AGCGACACTA ACATGGGCCA AATGCTGGAC
2461   CGTGGCGCAA GTGAGTCGAG TGAGATAGCA CTAATACGGA AGACGAAGCC AAAGGACGTG
2521   GCTGAGCTAG GCGAACATAT TGTCACGAGC GACGGGCGAA TTGAGCTTAT AACGCAATTG
2581   GCGGGTAAAC GTGACTACAG TGATGTAGTG CGGGACCTAT TACCAGGCGG TGTAGGTACC
2641   CCAGACGTTG GCGATTGGAC GGGGACGAGT AAGAATGGTG AACAAACGCAA TATCACAACG

```

2701 CTCATGAATG TGAACAAG**TG** A**TTT**GGTTCG GAAATGCTTG TATAATTGTA TTACAGTTAT
 2761 ACGAGGCCGG ATAGGCAAGC TAGCAGCAGT TCGGTA**CTAC** CGTGGTGT**TG** CAAACCGCAT
 2821 AAGGTATTA AGTCATGGGA CTTTAATGGC GATAGGCAAG CTAGCAGCAG TCGGTA**CTA**
 2881 CCGTGGTGT GCAAACCGCA TAAGGTATTA AAGTCATGGG ACTTTAATGG C

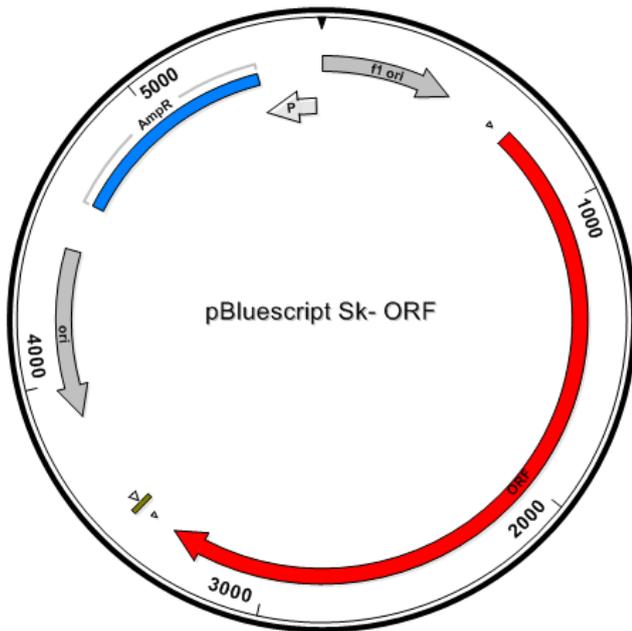
Anhang 1B: Sequenz von Segment 3 aus FgV-ch9

1 GCAAAAAAGA AAAGAAGGGT AAGAGTACCT CAACCGCACA TAGGTGCGCG GGGAGAAATT
 61 TTCAAACCGT GGCAAATTTG CACAAACCAT ATTTGATTTA CAAAT**AT**GC ATCGAACGCA
 121 TTGTTTCGACA GACGTGGTGG TGGTGAGCAA GGTGTTAGTG GCAACAACGG AAGT**TCT**GCG
 181 GGGCGCACCG TTAAGCCAGC ATTCCAGGGG GATGATTTCT TTGGAATAGC TTCTGCGCTG
 241 GAGATGAACC CAAACATGGG TGTA AACGAC ATGATGCTTG TTGGTCGGGA TAAGCTAATG
 301 TCGGGGAAGC AGCAAGCAAA CCCC**GGCCTA** GTGGGATGGC AGCACGATAT GCAGCGCAAC
 361 CTGGCCACAG ACGCATCAGC CTGGGTCGTG CGCAAGGAAA TACGAGACCT GGCTGGCC**TC**
 421 CTACCTGATA ACCCCAATGA TGACACAGCG AGACTGGAGA CCGTGGTCAC GTT**CACATA**C
 481 CAGGTCGAAC CCGTCAACCA GCGAGCTGAT CGGTCACACC GACGCGATGT GGCTGTGCAA
 541 TACAAAGCTC CTT**CAGTGGG** CGATGGTACA GTCATCCAGT TCGCTAAATC CACCAAAGAG
 601 TTGACTACA AGGCGAGCGC AGCTACAGCG TCGTCGGCCG CTATAGGTA TGCTAGCAG
 661 GTGAATTCCT ATTCCCGGAC TGGCATCTCC GGTCACATGG GCCTGGCAAT GGAAGTTGGT
 721 CGTGGACCGG ATATGCTGGG TGTGTT**CACG** GTGATGTGGC TGTTGCAACT TGATGTGGCG
 781 GGTGGAGCAC GTGTGGAGCT CGGCATAAAC GCGAATGATA TGCGCGTGCT GGTGCCATCA
 841 TCGGTGTCAC CCCTGGATGA AGCTGACGCA ATGAAGGCAG TGCCCGGCAT CAGGCTACAT
 901 TCAGACGCC TCGACCCTCT AGCATA**CCGG** CTGCTATA**CA** CTGCAACGCA CCGGTCAGCC
 961 CTTGGCGCCG CATCTCCGTG GGTCAACAGA TATCGCTGGC CAACCACACC GCTAACTGTG
 1021 TATAGCGCG CACTAAACCC GGGACCGTAC ATGCAAGCAT TCAATGGTAG GCCTGCAGCT
 1081 GCGCAGCTAG CCGGGCAGAT TGTCAACATT GCGAACACGT ATGACCTGCG TGACACGTGC
 1141 AGTCGTGCTT ACAGCATTGC ATTCTCTCTT TACGGTGATC GTTGTGTGAA CAGGAAT**TT**C
 1201 CGCCTGCACT GCGGTAGGCA GACACTGTTC CATGAAATCA GTAATGGGCA GAGCAAAGCA
 1261 CAGGTGCCTC AAATGTGTTG GGCCCTCGGT AGTTACCAGC TGCCATATGGC GGCAAAGTTC
 1321 AATGGGTATG CGAACGCAGA GTACATGCGC GACCTGTGTC GTTCTACGAT AACTGCTGGC
 1381 TTGCGCATCA GGGACCGCGA CGCTGTCCGA CGGGCCGT**TG** ACCAAATCGA TGTGCATGCC
 1441 CTCAA**AACTG** TGCAGCAACG TTTT**GAGGAA** GGACAGCAAC TAACGGATGC ATTGCCAATA
 1501 GACTACAGGC ATTATGTTAA GCATGGC**ATC** CGACGCGCCT GGGTCGTT**CG** AGGCATCTTG
 1561 CACAATCTCT CGCTCGGCCG TGCTGTGCCG GCAGCGATCA GCGGCTCAGC AGT**TAAACAA**
 1621 TTACGCATG CAAGTGAAG AGAATGGCG GACACCGACG TGCTGGCGTA TGGGAAGGAG
 1681 CGTCCGGAGT CAGAAGCAAA TGCGTGGCTC ATAAATGAAC TGATACGAAA CCGTGGTACT
 1741 AGCTTATGCC AGAGTGTAGA TGAGGCCATA CCACGATCTG GCGCAACAGC AGT**TTGCAC**
 1801 ACCGATTGCC GTTATTACAT GGGCATGGAT CTACAATACA AGATTGTTGG ATT**CGGTAAT**
 1861 GATATGCGCA TAAAGTACAA CAGGCCGCTC AACTTTGTGT ATGCACCTAC ACCCACAATG
 1921 GTAACACACC AGCGTGATGA TCAACTGCGT GAACCAAGTG CGTACC**GAT** GACTGTGGTA
 1981 GACAAGGAGC TAGCAGATGA CAAAGCTGAC GACACTGTTG TGACCCCGGA AGATATACTG
 2041 CGTGAGGTAA TGCAGATGCG CGGCACTCGC ACGTCAACGT GGTTCAGGGG GAAACCACCC
 2101 ACAAAGCGC CGCCGGTTCG GTACCACGAT AGTGACGTTT TGACCGTGAC AGCTGCCCGT
 2161 GATGATGTAC GCCAATCTGT GGTCCA**ACTA** GCCCAAGAAG GTGGTGGTCC TGGACCACCC
 2221 AGCGGTGAAA ATCTGCTGTG TGGTGCTCAT GCGATACAGA TGGCGCTAGA ATT**CGCAGGT**
 2281 CACCCCAACC ACATAACAGT GGAACAGTTG GAGGATGAGC TGCGCACTGC CGTGCTCGAT
 2341 GCACCTGTGG ATGATGACTC GGAATTGCGG AGTGCAAACA ATTT**CACGGC** AGACCAATTG
 2401 GGCAGAGTAG CTAATCGGCA CGGGTATAAT CTGACAGTCG TGACAGGACA AGGCAAAGGT
 2461 GCCGCACTGG CATA**CAGCGC** AACAGAGCTG GTCGGTGCAC CCCACCTTGT TGTGTTCAAC
 2521 TTCGGAGGCA ATCACTGGGA AGGTCCGGTC CGGCAAGGTA AGCGTCATGC AATACGAGTA
 2581 GAAGGTCAAG ATGCAGGTAC GCCAGCGGTA GAAGCGGCAC GGGCCCGGTC CCAGCGTGGC
 2641 AGCGTGT**TTG** AGAAGACCGT GAACCGTCGA CGT**TAA**ATCA CAAACAATAA ATAGTTAATT
 2701 GGTATTACCG GTTAGTCTAT TGCCAAAT**TG** GCGCCAGTAG CAACACACTC GCACGCTACG
 2761 CCACAGTCTG TACAGCACTG CTGCCCAGAA TGTCGCCAAA TTAGGTATTT AAGGAGAAC
 2821 CTTAAATGGC ACGAAACCGTC GACGTTAAAT CACAAACAAT AAATAGTTAA TTGGTATTAC
 2881 CGGTTAGTCT ATTGCCAAAT TGGCGCCAGT AGCAACACAC TCGCACGCTA CGCCACAGTC
 2941 TGTACAGCAC TGCTGCCCGAG AATGTCGCCA AATTAGGTAT TTAAGGAGAA CCCTTAAATG
 3001 GC

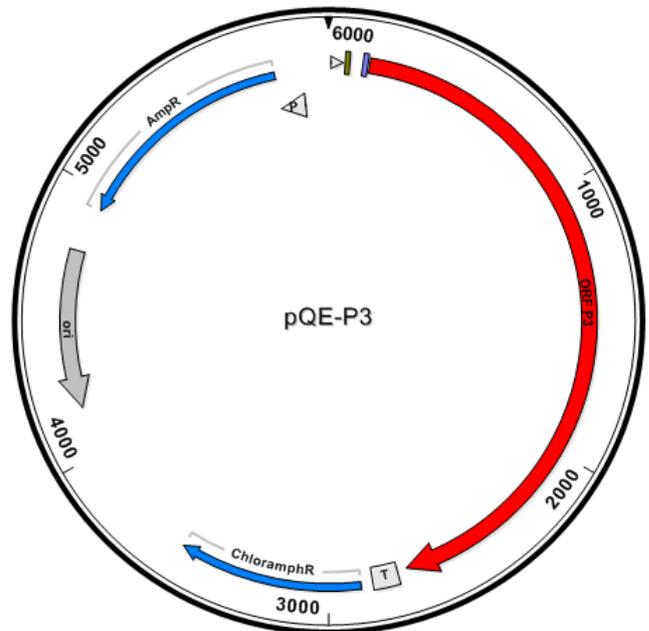
Anhang 1C: Sequenz von Segment 5 aus FgV-ch9

1 GCAAAAAGA GAAAAAGCCA CAAACCGCAC ATAGGTGCGC GGGGAGAAAT TTTCTAACTG
61 CAGCTAATTA GCATAACATA CCAGCAATTC GCCGAT**ATG**T ATTTCGACTC AAGTTCAAGT
121 GCACAACGCG CAGCTGTTTG GGCGCAACAA CAGCGAACCG TGGCCTTTAC GGCCCATCAA
181 TCAAACHTTA CCGACGTGGC ACTGGGCACA CCACGCCATA CCATGGTGGC TCAGCCCCGG
241 AATGGTGTGG CATCTAGGGA AAATCATGCT CAGCAGTGGT CTGATGAGCG GATTCCAAC
301 GGGCCAGGGT ATGACCTGGT TAACCGCTTC GAGATGATTG CAGACCGTGA GCTTGAGCGT
361 GCTGGGTTGG CAGAGCCACG CACAACGCAC TATGGTGAAG GCGCTGCTAG TTCGGCAAGT
421 TCGACCACGA GCGCTAGACA TTCGTTATTT AGCGTGCAAC CTCAAAGCAC CACTGGTTGT
481 GCTTCGAGTA CTAACGGAGA GAGCGACGAT GATGGAGGCT ATGACTACGA GAGCGTAGT
541 AGTTATGACG ATGATGCACG CTCGGCAGGC GATGACACCT TGTATAACAT GCGTGACAC
601 ACCCAGTACC AGCATGAGCT GCACGAAGAG AACCTGCTTG ATGAGGCAGA TGATTACATC
661 CATTCTGCTG CACTCACCCG GTCCACACCC CCGCTCTGGT TAGCCGACAC CTACCCGATA
721 ACTGAGCCAG CTATTGAAGC CCGGTACGAC GTTTATTACG ATCAGTACCA CAGTGTAACC
781 ACCCCAATTT ATCCAGGACC AGGTGCAACA CTGCACGAAG ATTTGGTGTCT TGACGCCCGG
841 CCCTTTGTTT GCCATAAACC CCTGACCCAG CCAGCACCGA TCGCGTCTCG TACTGGGTCA
901 CTTGAGTATC AGCTAGAATT GCAAGTCGCT GCTATGGCAG CGGGGGACAC GGATTTGGTC
961 GTTAACATGA TCAAGCTCGA ACGATCAAGC AGCCCCGCAT CACCACAGGA TCGGCAGTCT
1021 AGGCACGGTG AGAACCAAGT TGCTGAAGCA TCTGGTCACA GACACCCCTCT GCCGGACCTG
1081 GCATGCCCGA TTTGCTTCGA GCCACAACGT TCGCGACGTT CACTTGCCGC CCACCGGAGC
1141 TCATCGCACC CTAAACAAGT ATGTGGTCAG GCGCACTGCA GCTACACTAC TGACGTGCCG
1201 GCTGACTTTG CTTTCCATAT GGATGAAGAA CACCCTGTCT TAGGGTGTGA TTCAACAGGC
1261 TGCGATTACA CTACACGCAG CAGCCAACTA CACTGGACTC ATATGGTTGG GCACCTGAGT
1321 TGCACAGTGT GTGGGCTGCT AAGTGCCAAC CTCGCAGCGG CTGCTGATCA CATTCGCGAA
1381 CATGCTGGAA AGTGGTCCTG TTCACTGTGC AACGAGCCCT TCGAGGACGC GTTCAGCCTT
1441 AATGAAACA ATCAGGATGT GCACHTTACC TGCTGCACTC AATGTGAAGC CATTGTAAGA
1501 GACAAGAACG AACTACTGGA CCACTGCCAT GATGTTACC CGTACTACG GTGTCGTGAA
1561 GTAGGCTGCG CGTTCGCAC ATTTGAACCA CCGGAGCTAG CAGCACACCA TGATTGGCAT
1621 GATCAATACC CATTGTCGTT CTTCTGTGGT AAGTTGCAAT GCCCTGACCT CGGTTGCACT
1681 CATGCGGCAT CAAGTCATGA GATGGCAGCG CTACATTACA ACACTCACTT GCAGAAAACCG
1741 AATTACGCGT GTGAAAGTTG TGACGCTTGG TGCCACAGCC ACACTGCCCT AATCAGGCAC
1801 TCCCGGATGC ACAAGCAGGT AGAGCAGAAT CTGCGAGAAC AGCCCGCACT CCAACAAGCA
1861 CCTGCAACGG CGTCTGGCGA TGTGTGCAA TGTCCACATT GTGCGTTCAC GAGTAAGTCA
1921 AAAGTTGAAT GGCAAGATCA TATCAACATC AATCACCCTT CATCCAACA TCTAGCATTA
1981 CTTGTAGCT TATGCGGCAA GGTGTTCACT GCGTGAATG CCGTCCGGAA ACATCACTGT
2041 CACAAACGTG ATTGGCATGA TAAACCGCAC CGTTGTGGTA AATGTAATGC ACGATTTGGT
2101 CAGTCTCGCG ACCTAGAGCG CCATAAAGCG ACACATGAGG CAGCTAGGCC CCGACACCAA
2161 TGTCAGGTTT GCCACGAAAC ATTCGCGCGG CTGGACCATT TGCAACGCCA CGTTAGACGG
2221 CGGCACTCCC GGATGCACAA GCAGGTAGAG CAGAATCTGC GAGAACAGCC TGCACTCCAA
2281 CAAGCACCTG CAACGGCGTC TGGCGATGTG TACAAATGTC CACATTGTGC GTTCACGAGT
2341 AAGTCAAAAG TTGAATGGCA AGATCATATC AACATCAATC ACCGTTTATC CCAACATCTA
2401 GCATTACCTT GTAGCTTATG CGGCAAGGTG TTCACTGGCG TGAATGCGGT CCGGAAACAT
2461 CACTGTCACA AACGTGATTG GCATGATAAA CCGCACCGTT GTGATAAATG TAATGCACGA
2521 TTTGGTCAGT CTCGCGACCT AGAGCGCCAT AAAGCGACAC ATGAGGCAGA TAGGCCCGA
2581 CACCAATGTC AGGTTTGCCA CGAAACATTC GCGCGGCTGG ACCATTTGCA ACGCCAGTT
2641 AGACGGCGAC ATACA**TAA**TG GCACCACACT GGTACGTTGG CATACTTGTG GTATTACCGC
2701 AGTACTTGCC ACCCTAATTT GGGATGCTGC TAGCATGTAA TGGCACCACA CTGGTACGTT
2761 GGCATACTTG TGGTATTACC GCAGTACTTG CCACCTAAT TTGGGAT**T**GC TGCTAGCAAT
2821 GCATGAGTAC CAGTAACATA CTGCCGACA CAACAGCCAA ACACCTGTTT TGGCACCAGG
2881 CAGTATGGTA ATTAATAATT ATTTAGGCTT GGCCTACCCC TAAATGCG

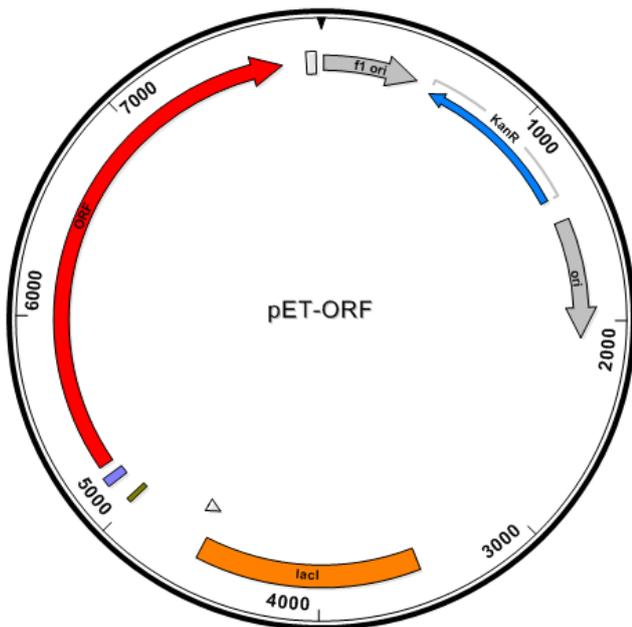
Anhang 2: Vektorkarten der für diese Arbeit erstellten Konstrukte



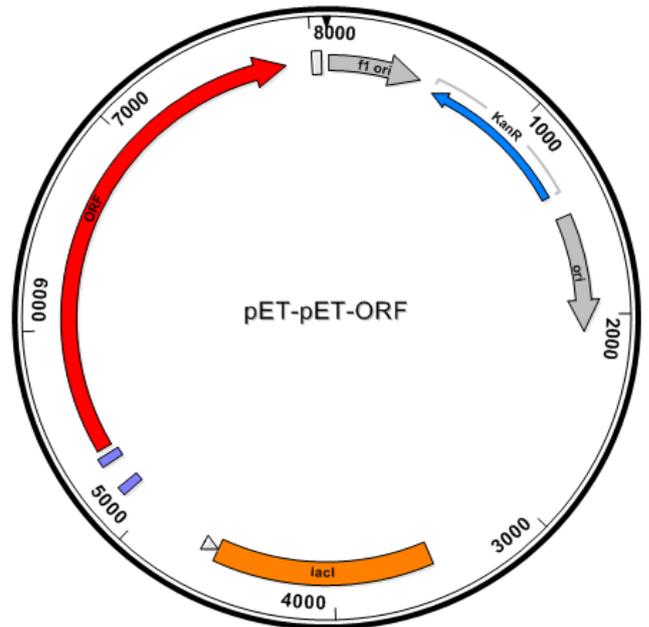
Anhang 2A: pBluescript Sk- mit integriertem ORF (Segment 2 oder 5)



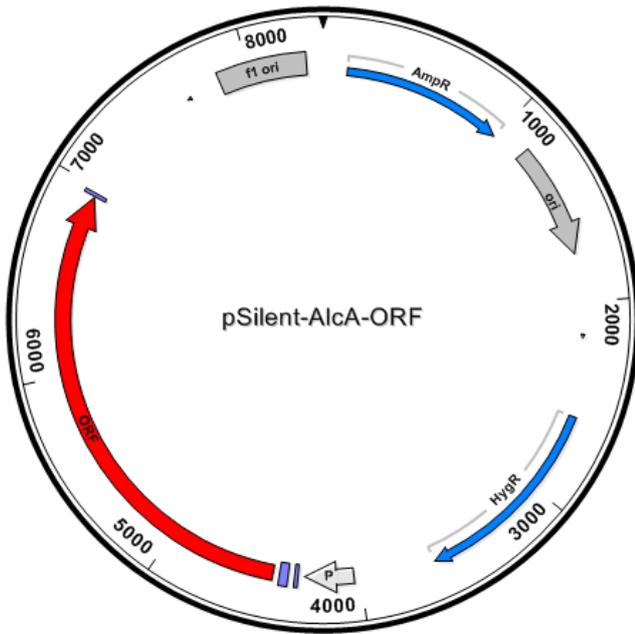
Anhang 2B: pQE-32 mit integriertem ORF von Segment 3



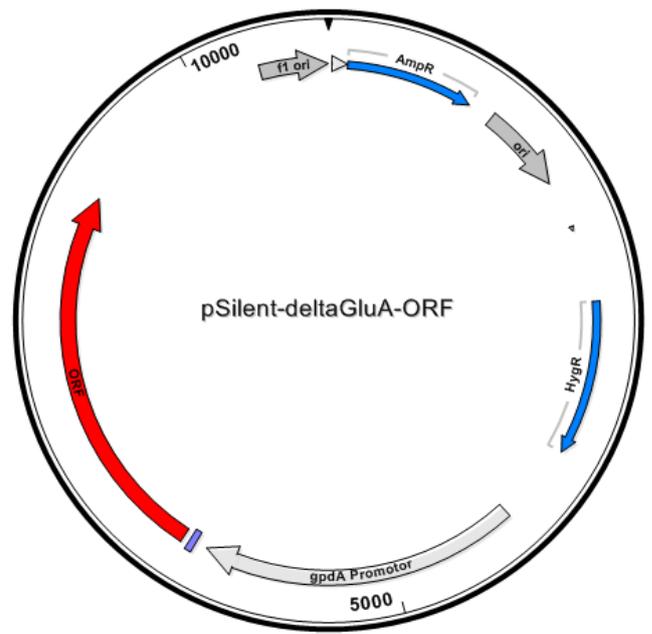
Anhang 2C: pET-30a mit integriertem ORF (Segment 2, 3, 4 oder 5)



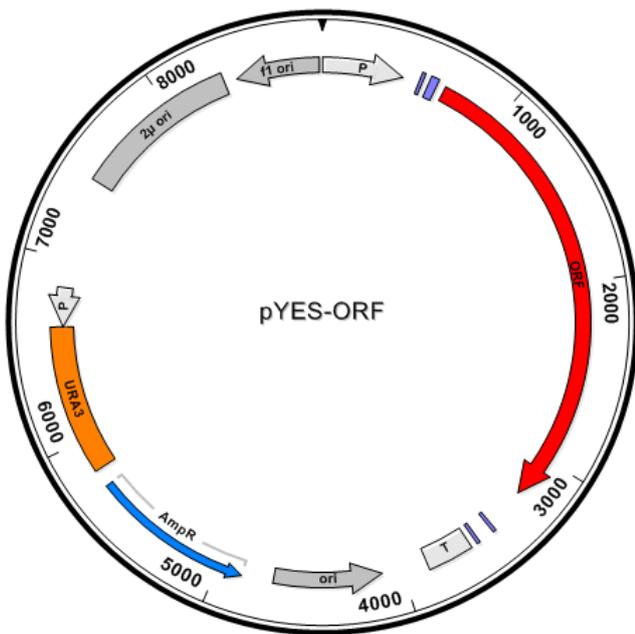
Anhang 2D: pET-30a mit integriertem ORF (Segment 2, 3 oder 4), der mit den Primern pET_hin und pET_rück aus pET-ORF amplifiziert wurde



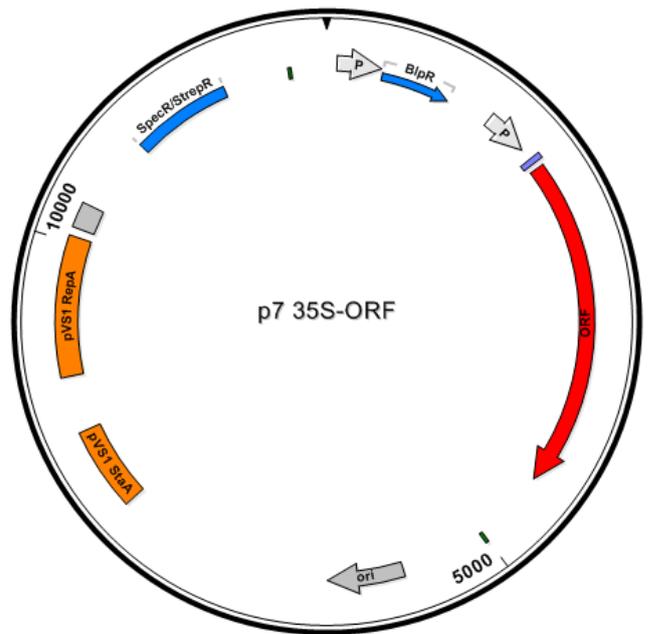
Anhang 2E: pSilent-AlcA mit integriertem ORF (Segment 1, 2, 3, 4, 3eGFP-C oder 4eGFP-N)



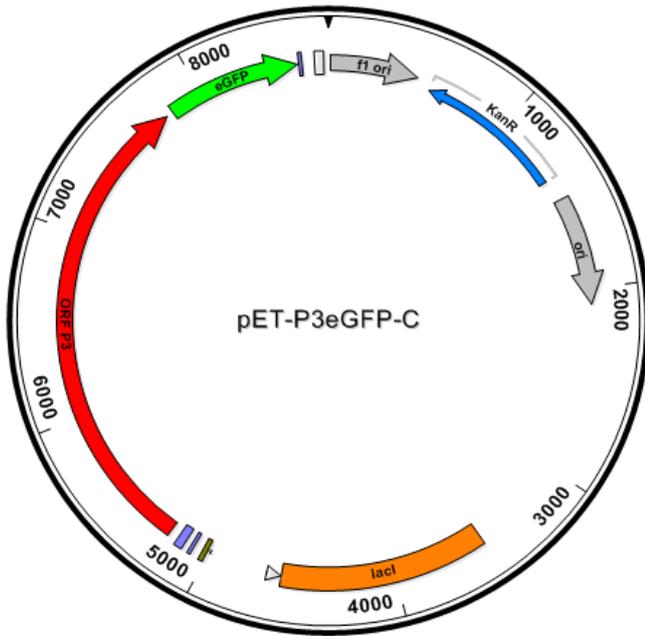
Anhang 2F: pSilent- Δ GluA mit integriertem ORF (Segment 3 oder 5)



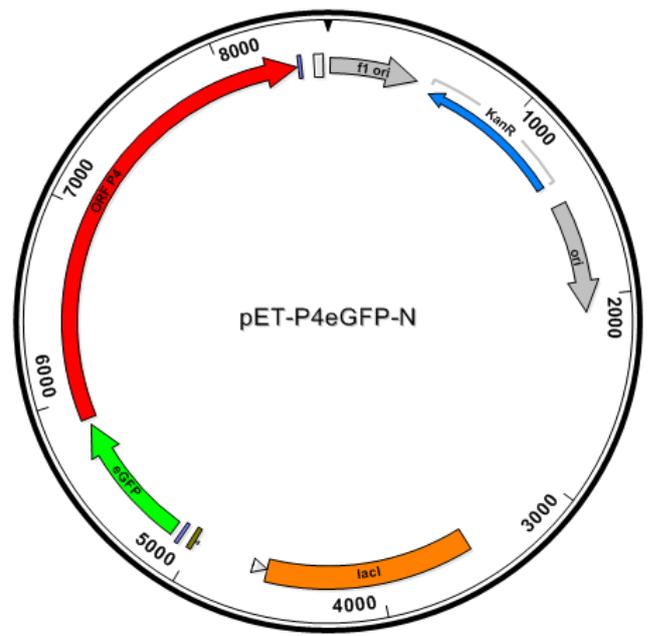
Anhang 2G: pYES-A mit integriertem ORF (Segment 1, 2, 3, 4, 5, 3eGFP-C oder 4eGFP-N)



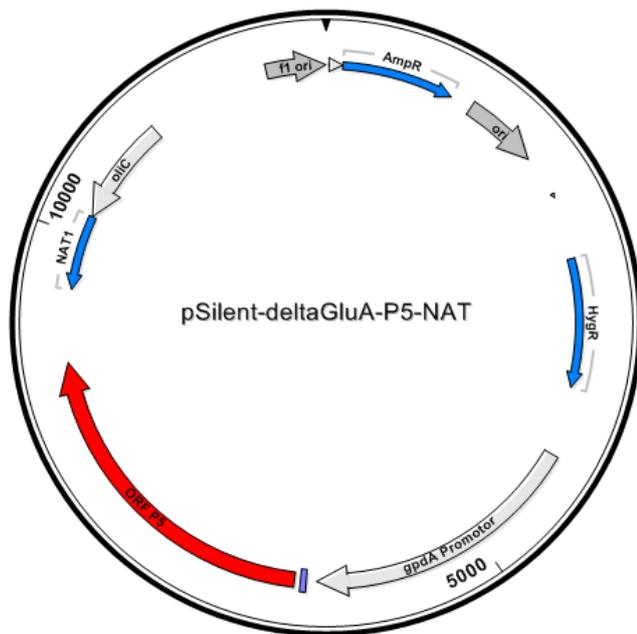
Anhang 2H: p7 35S mit integriertem ORF (Segment 1, 2, 3, 4 oder 5)



Anhang 2I: pET-30a mit integriertem ORF von Segment 3 und C-terminal fusioniertem eGFP



Anhang 2J: pET-30a mit integriertem ORF von Segment 4 und N-terminal fusioniertem eGFP



Anhang 2K: pSilent- Δ GluA mit integriertem ORF von Segment 5 und zusätzlicher NAT-Resistenz

Anhang 3: Zusammenfassung der Molekulargewichte der viralen Proteine von FgV-ch9.

Angegeben sind die berechneten und die im Partikel detektierten sowie die in Gesamtextrakten der Expressionsmutanten von *E. coli*, *S. cerevisiae* und *F. graminearum* mit den spezifischen Peptidantiseren nachgewiesenen Molekulargewichte.

Tabelle Anhang 3: Zusammenfassung der Molekulargewichte der viralen Proteine von FgV-ch9, detektiert mit den spezifischen Peptidantiseren

Protein	berechnet	prozessiert	Fusion mit His-/S-Tag	in <i>E. coli</i>	in <i>S. cerevisiae</i>	in <i>F. graminearum</i>
P1	127 kDa	-	129 kDa	129 kDa 100 kDa	130 kDa 120 kDa 115 kDa 110 kDa 100 kDa 50 kDa	-
P2	94 kDa	62 kDa	102 kDa	85 kDa 68 kDa 57 kDa 50 kDa	85 kDa 70 kDa 60 kDa	110 kDa
P3	93 kDa	70 kDa	101 kDa	110 kDa	120 kDa	110 kDa
P4	91 kDa	-	97 kDa	110 kDa	115 kDa 85 kDa 72 kDa 70 kDa 60 kDa 55 kDa	-
P5	96 kDa	-	102 kDa	130 kDa 128 kDa	130 kDa 128 kDa	130 kDa 115 kDa

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zur erfolgreichen Anfertigung dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Cornelia Heinze, die mich von Anfang an für die Virologie begeistern konnte. Vielen Dank für die Übernahme des Erstgutachtens, aber noch mehr für die kompetente Betreuung, die wissenschaftlichen Diskussionen und die vielen neuen Denkansätze und Ideen.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Wilhelm Schäfer für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, die wissenschaftlichen Ideen und Anregungen und nicht zuletzt für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Technischen Assistentinnen Birgit Haderler, Cathrin Kröger und Petra von Wiegen für die technische Unterstützung und die netten Gespräche zwischendurch.

Ich möchte mich auch bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die Hilfe sowie die fachlichen Diskussionen und Ratschläge bedanken. Ich bin aber auch dankbar für die gemeinsame Zeit jenseits des Labors mit tollen Weihnachtsfeiern und Sommerfesten, schlaflosen Nächten in Pevestorf sowie unterhaltsamen Star Wars-Kinoabenden.

Mein Dank gilt auch den Studierenden Steffi, Arne, Svenja, Elias und Tim, deren Ergebnisse meine Arbeit unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die immer an mich geglaubt haben und mich in jeder Lebenslage unterstützt haben, auch wenn ich nicht immer so viel Zeit mit ihnen verbringen konnte, wie ich eigentlich wollte. Und ich möchte mich bei Michael bedanken, für die fachlichen Diskussionen, auch am Wochenende, aber besonders dafür mein Ruhepol zu sein und die starke Schulter zum Anlehnen. Danke, dass es dich gibt!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium.

Hamburg, den 14. August 2017

Christine Blum