

**Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung

**Untersuchungen zur Bedeutung von  
Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae* und zum  
Wirkmechanismus des Fungizids Fludioxonil**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

(*doctor rerum naturalium*, Dr.rer.nat.)

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

eingereicht von

**Stefan Jacob**

geb. am 05.10.1983 in Speyer

Mainz, März 2014

Untersuchungen zur Bedeutung von  
Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae* und zum  
Wirkmechanismus des Fungizids Fludioxonil

Tag der mündlichen Prüfung: 30.09.2014

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht oder eingereicht:

Jacob S., Foster A., Yemelin A., Thines E. (2014) Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *MicrobiologyOpen* 2014; 3(5): 668–687.

Jacob S., Foster A., Yemelin A., Thines E. (2014) High osmolarity glycerol (HOG) signaling in *Magnaporthe oryzae*: Identification of *MoYPD1* and its role in osmoregulation, fungicide action and pathogenicity. In Vorbereitung bzw. eingereicht.

Inhalt

Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pflanzenschutzforschung und <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	1
1.2 Histidinkinasen als Elemente der Signaltransduktion .....	5
1.3 Die Osmoregulation in Pilzen: Der HOG-Signalweg .....	9
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Verwendete Materialien .....</b>	<b>15</b>
3.1 Chemikalien und Medienbestandteile.....	15
3.2 Verbrauchsmaterial.....	17
3.3 Antikörper und Enzyme .....	17
3.4 Reaktionskits.....	18
3.5 Lösungen und Puffer .....	18
3.6 Kulturmedien.....	22
3.7 Plasmide .....	25
3.8 Primer .....	26
3.9 Organismen .....	26
<b>4 Angewandte Methoden.....</b>	<b>28</b>
4.1 Molekularbiologie und Proteinbiochemie .....	28
4.2 Phänotypische Untersuchungen von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	40
4.3 Datenbearbeitung und Ergebnisdokumentation .....	42
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
5.1 Der HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	45
5.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	61
<b>6 Diskussion.....</b>	<b>77</b>
6.1 Der HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	78
6.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	94
<b>7 Ausblick.....</b>	<b>109</b>
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
Anhang I – Sequenzinformationen und Oligonukleotide .....	113
Anhang II – Klonierungsstrategien .....	119
Anhang III – Southern Blot-Analysen .....	124
Anhang IV – Wachstums- und Resistenzversuche .....	129
Literaturverzeichnis .....	132
Lebenslauf .....	142

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Pflanzenschutzforschung und <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	1
1.2 Histidinkinasen als Elemente der Signaltransduktion.....	5
1.3 Die Osmoregulation in Pilzen: Der HOG-Signalweg .....	9
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>14</b>
<b>3 Verwendete Materialien .....</b>	<b>15</b>
3.1 Chemikalien und Medienbestandteile.....	15
3.2 Verbrauchsmaterial.....	17
3.3 Antikörper und Enzyme .....	17
3.4 Reaktionskits.....	18
3.5 Lösungen und Puffer .....	18
3.6 Kulturmedien.....	22
3.7 Plasmide .....	25
3.8 Primer .....	26
3.9 Organismen .....	26
<b>4 Angewandte Methoden.....</b>	<b>28</b>
4.1 Molekularbiologie und Proteinbiochemie.....	28
4.1.1 Manipulation von Genen .....	28
4.1.2 Präparation von Nukleinsäuren.....	28
4.1.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Myzel von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	28
4.1.2.2 Isolierung von RNA aus Myzel von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	28
4.1.2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....	28
4.1.2.4 Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren.....	29
4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
4.1.3.1 Amplifikation genomischer DNA .....	29
4.1.3.2 Amplifikation DIG-markierter DNA-Sonden .....	30
4.1.3.3 Quantitative Real-Time PCR (q-PCR) .....	30
4.1.4 Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese.....	30
4.1.4.1 Restriktion von DNA .....	31
4.1.4.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	31
4.1.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	32
4.1.5 Ligation.....	32

4.1.6	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	32
4.1.6.1	Herstellung elektrokompeter <i>Escherichia coli</i> .....	32
4.1.6.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i> durch Elektroporation .....	33
4.1.7	Transformation von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	33
4.1.7.1	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
4.1.7.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> mittels Heat-Shock .....	33
4.1.7.3	Transformation von <i>Magnaporthe oryzae</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	34
4.1.7.4	Protoplastentransformation von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	34
4.1.8	Southern Blot-Analyse .....	35
4.1.8.1	Isolation, Restriktion und Fällung genomischer DNA .....	35
4.1.8.2	Transfer der Nukleinsäuren auf die Nylonmembran.....	35
4.1.8.3	Hybridisierung mit der DNA-Sonde .....	36
4.1.8.4	Detektion der DNA-Sonde .....	36
4.1.9	Western Blot-Analyse.....	37
4.1.9.1	Kultivierung, Zellaufschluss und Proteinisolierung .....	37
4.1.9.2	SDS-PAGE .....	37
4.1.9.3	Elektroblotting .....	38
4.1.9.4	Detektion der Proteine .....	38
4.1.10	Yeast Two-Hybrid (Y2H)-Analyse .....	38
4.1.10.1	Maxipräparation der Yeast Two-Hybrid-Vektoren .....	39
4.1.10.2	Herstellung kompetenter <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und PEG/LiAc-Transformation.....	39
4.2	Phänotypische Untersuchungen von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	40
4.2.1	Konidiogenese .....	40
4.2.2	Wachstum auf verschiedenen Festmedien.....	40
4.2.3	Appressorienbildung .....	40
4.2.4	Zytorrhisetest zur indirekten Turgorbestimmung im Appressorium .....	41
4.2.5	Protoplastentest zur Ermittlung der Zellwandstabilität.....	41
4.2.6	Pathogenitätstest mit Reispflanzen und Wachstum <i>in planta</i> .....	41
4.3	Datenbearbeitung und Ergebnisdokumentation .....	42
4.3.1	Identifikation und Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen.....	42
4.3.2	Phylogenetische Gruppierung der Sequenzen von Histidinkinasen .....	43
4.3.3	Programme zur Planung und Kontrolle der Klonierungsschritte.....	44
4.3.4	Mikroskopie und Dokumentation.....	44
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
5.1	Der HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	45
5.1.1	Sequenzanalysen zu Proteinen des HOG-Signalwegs in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	46
5.1.2	Habitus, Konidiogenese und Melaninbiosynthese von $\Delta Moypd1$ .....	48
5.1.3	Das Wachstum von $\Delta Moypd1$ und den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stressbedingungen .....	52
5.1.4	Die Unterschiede zwischen $\Delta MosIn1$ und $\Delta Mohik1$ bei Salz- und Zuckerstress .....	55

5.1.5	Die Funktion von MoYpd1p beim Wirkmechanismus von Fludioxonil .....	56
5.1.6	Die Proteininteraktionen von MoYpd1p im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs ..	59
5.2	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	61
5.2.1	Sequenzanalysen zu Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	61
5.2.2	Phylogenetische Analyse von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen aus Pilzen .....	63
5.2.3	Die Konidiogenese in Histidinkinase-Mutanten von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	66
5.2.4	Die Appressoriendifferenzierung in Histidinkinase-Mutanten von <i>Magnaporthe oryzae</i> ..	68
5.2.5	Die Zellwandstabilität in Histidinkinase-Mutanten von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	69
5.2.6	Das Wachstum der Histidinkinase-Mutanten unter Stressbedingungen .....	70
5.2.7	Hypoxie (NaNO <sub>2</sub> ) und der HOG-Signalweg .....	73
5.2.8	Pathogenitätstest mit Reispflanzen und Wachstum <i>in planta</i> .....	75
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>77</b>
6.1	Der HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	78
6.1.1	Sequenzanalysen zu Proteinen des HOG-Signalwegs in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	78
6.1.2	Die Inaktivierung von <i>MoYPD1</i> ist in <i>Magnaporthe oryzae</i> nicht letal .....	80
6.1.3	Die Inaktivierung von <i>MoYPD1</i> führt in <i>Magnaporthe oryzae</i> zum Albino-Phänotyp .....	81
6.1.4	MoYpd1p und der HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	84
6.1.4.1	MoHik1p, MoSln1p und MoYpd1p im Phosphorelaysystem .....	84
6.1.4.2	Der HOG-Signalweg als Vermittler von Umweltstress und Hypoxie .....	89
6.1.4.3	MoYpd1p und der Wirkmechanismus von Fludioxonil .....	90
6.2	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	94
6.2.1	Identifikation von Histidinkinasen und Sequenzanalysen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	94
6.2.2	Phylogenetische Analyse von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen aus Pilzen .....	96
6.2.3	<i>MoHIK5</i> und <i>MoHIK8</i> sind essenziell für die Konidiogenese und die Appressorienbildung .....	98
6.2.4	<i>MoHIK5</i> und <i>MoHIK9</i> sind wichtig für die Zellwandbiogenese .....	101
6.2.5	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen sind wichtig für Signaltransduktion und Anpassung an Umweltveränderungen.....	102
6.2.6	MoHik5p, MoHik9p und Signaltransduktion von Hypoxie im HOG-Signalweg .....	104
6.2.7	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen sind Virulenzfaktoren - MoHik5p und MoHik8p sind Pathogenitätsfaktoren .....	107
<b>7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>111</b>
	Anhang I – Sequenzinformationen und Oligonukleotide .....	113
	Anhang II – Klonierungsstrategien .....	119
	Anhang III – Southern Blot-Analysen .....	124
	Anhang IV – Wachstums- und Resistenzversuche .....	129
	Literaturverzeichnis .....	132
	Lebenslauf .....	142

**Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1:	Das Zweikomponentensystem und das Phosphorelaysystem .....	6
Abb. 2:	Der Sln1-Zweig des "High Osmolarity Glycerol" (HOG)-Signalwegs in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	11
Abb. 3:	Konservierte Domänen in Aminosäuresequenzen von Proteinen des HOG-Signalwegs in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	47
Abb. 4:	Vergleich des N-Terminus der Varianten [A] und [B] der Proteinsequenz von MoYpd1p aus <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	48
Abb. 5:	q-PCR-Analyse der relativen Transkriptmenge von <i>MoYPD1</i> in $\Delta$ <i>Moypd1</i> und in $\Delta$ <i>Moypd1/YPD1</i> .....	49
Abb. 6:	Kulturen des <i>Magnaporthe oryzae</i> -Wildtypstamms, der Mutante $\Delta$ <i>Moypd1</i> und $\Delta$ <i>Moypd1/YPD1</i> .....	50
Abb. 7:	q-PCR-Analyse der relativen Transkriptmenge von <i>MoALB1</i> und <i>MoBUF1</i> in $\Delta$ <i>Moypd1</i> und $\Delta$ <i>Moypd1/YPD1</i> .....	51
Abb. 8:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen CM-Festmedien .....	53
Abb. 9:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen MM-Festmedien .....	54
Abb. 10:	Wachstumsversuche mit $\Delta$ <i>Mosln1</i> , $\Delta$ <i>Mohik1</i> und $\Delta$ <i>Mohik1/\Delta</i> <i>sln1</i> bei NaCl- oder Sorbitstress .....	55
Abb. 11:	Western Blot-Analyse von Phospho-MoHog1p in $\Delta$ <i>Mosln1</i> , $\Delta$ <i>Mohik1</i> und $\Delta$ <i>Mohik1/\Delta</i> <i>sln1</i> bei NaCl- oder Sorbitstress .....	56
Abb. 12:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten zur Fludioxonilresistenz .....	57
Abb. 13:	Western Blot-Analyse von Phospho-MoHog1p in $\Delta$ <i>Moypd1</i> bei Fludioxonilzugabe, NaCl- oder Sorbitstress .....	58
Abb. 14:	Western Blot-Analyse von Phospho-MoHog1p in der komplementierten Mutante $\Delta$ <i>Moypd1/YPD1</i> bei Fludioxonilzugabe, NaCl- oder Sorbitstress .....	58
Abb. 15:	Yeast Two Hybrid (Y2H)-Analyse von Proteinen im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs von <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	60
Abb. 16:	Konservierte Domänen in Proteinsequenzen von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	63
Abb. 17:	Phylogenetischer Baum zur Analyse von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen aus Pilzen .....	65
Abb. 18:	Konidienproduktion von Kulturen der Histidinkinase-Mutanten .....	67
Abb. 19:	Konidienform der Mutantenstämme $\Delta$ <i>Mohik5</i> und $\Delta$ <i>Mohik8</i> .....	67
Abb. 20:	Appressorienbildung der Histidinkinase-Mutanten auf hydrophober Oberfläche oder nach Zugabe von 1,16-HDD .....	68
Abb. 21:	Appressoriendifferenzierung in $\Delta$ <i>Mohik5</i> und $\Delta$ <i>Mohik8</i> auf hydrophober Oberfläche .....	69
Abb. 22:	Test auf Zellwandstabilität in Histidinkinase-Mutanten nach Applikation von lytischen Enzymen aus <i>Trichoderma harzianum</i> .....	70
Abb. 23:	Wachstumsversuche mit den Histidinkinase-Mutanten unter Stress auf verschiedenen CM-Festmedien .....	71
Abb. 24:	Wachstumsversuche mit den Histidinkinase-Mutanten unter Stress auf verschiedenen MM-Festmedien .....	72
Abb. 25:	Wachstumsversuche von Mutanten auf Festmedium mit NaNO <sub>2</sub> .....	74
Abb. 26:	Western Blot-Analyse von MoHog1p in <i>Magnaporthe oryzae</i> bei NaNO <sub>2</sub> -Zugabe .....	74



---

Abb. 27:	Pathogenitätstest mit den Histidinkinase-Mutanten auf Reispflanzen .....	75
Abb. 28:	Pathogenitätstests mit $\Delta Mohik5$ sowie $\Delta Mohik8$ auf Reispflanzen und <i>in planta</i> .....	76
Abb. 29:	Ein vereinfachtes Modell der Signaltransduktion im HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> bei NaCl- oder Sorbitstress .....	85
Abb. 30:	Ein Modell des HOG-Signalwegs in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	88
Abb. 31:	Ein Modell, welches die Auswirkungen einer Geninaktivierung von <i>MoHIK1</i> vergleichend mit der Applikation von Fludioxonil in <i>Magnaporthe oryzae</i> beschreibt.....	93
Abb. 32:	Ein Modell, das die Signaltransduktion von NaCl, von Sorbit und bei Hypoxie mit dem HOG-Signalweg in <i>Magnaporthe oryzae</i> beschreibt .....	106
Abb. 33:	Domänenvisualisierung der zur phylogenetischen Analyse verwendeten Sequenzen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen .....	114
Abb. 34:	Schematische Darstellung der manipulierten Bereiche der genomischen DNA des <i>Magnaporthe oryzae</i> WT und den erzeugten Mutantenstämmen .....	124

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1:	Proteine aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit Funktionen im HOG-Signalweg und deren Homologie zu Proteinen aus <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	46
Tab. 2:	Zugangsnummern und Trivialnamen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen zur phylogenetischen Analyse.....	113
Tab. 3:	Primer zur Untersuchung des HOG-Signalwegs in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	117
Tab. 4:	Primer zur Untersuchung von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in <i>Magnaporthe oryzae</i> .....	118
Tab. 5:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen Festmedien.....	129
Tab. 6:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen Festmedien (normalisiert) .....	129
Tab. 7:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten zur Fludioxonilresistenz .....	130
Tab. 8:	Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten zur Fludioxonilresistenz (normalisiert).....	130
Tab. 9:	Wachstumsversuche mit den HIK-Mutanten auf verschiedenen Festmedien.....	130
Tab. 10:	Wachstumsversuche mit den HIK-Mutanten auf verschiedenen Festmedien (normalisiert).....	131

**Abkürzungsverzeichnis**

Standardabkürzungen wie „etc.“ oder „z.B.“ werden nicht aufgeführt.

1,16-HDD	1,16-Hexadecandiol
AI-Medium	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Induktionsmedium
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Complementary DNA
CM	Komplettmedium
CSPD	Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate
DAG	Diacylglycerol
DE	Deionisiert
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol (Clelands Reagenz)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
gDNA	Genomische DNA
HATPase	Histidin-ATPase-Domäne
HIK	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase
HisKA	Histidinkinase-Domäne
HOG	High Osmolarity Glycerol
<i>hpt</i>	Hygromycin Phosphotransferase Gen
HPt	Histidin-Phosphotransfer-Domäne
IPTG	Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
kb	Kilobasen
LB	Lysogeny broth
MAPK (-K,-KK)	Mitogen activated protein kinase (-kinase, -kinase kinase)
MM	Minimalmedium
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
OTU	Operational taxonomic unit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
q-PCR	quantitative Real-Time PCR
REC	Regulatorische Domäne
RF	RNase-frei
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrink Alkaline Phosphatase
SD	Selective dropout
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

UF	Ultrafiltriert
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtypstamm
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast Two-Hybrid

#### Drei- (Ein-) Buchstabencode der kanonischen Aminosäuren

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

#### IUPAC „ambiguity code“ für Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

#### Anmerkungen zur Nomenklatur:

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen und Schreibweisen für Gene, Proteine und Mutanten exemplarisch aufgelistet:

- *MoYPD1*: das Gen *YPD1* aus *Magnaporthe oryzae*,
- *MoYpd1p*: das korrespondierende Protein zu dem Gen *MoYPD1*,
- $\Delta$ *Moypd1*: die *Magnaporthe oryzae*-Mutante, in der das Gen *MoYPD1* inaktiviert wurde,
- $\Delta$ *Moypd1/YPD1*: das intakte Gen *MoYPD1* wurde in das Genom der Mutante  $\Delta$ *Moypd1* reintegriert.

Wurde in der jeweils verwendeten Literatur eine andere Schreibweise genutzt, so wurde diese übernommen. Lateinische Begriffe sowie Gattungs- und Artnamen sind kursiv geschrieben.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Pflanzenschutzforschung und *Magnaporthe oryzae*

Die Ernährungsgrundlage der Menschheit kann ohne Pflanzenschutzmittel heute und in Zukunft nicht gewährleistet werden. Die ökologische Schädlingsbekämpfung in der Landwirtschaft alleine reicht nicht aus, um in ausreichendem Maße die durch Schadorganismen verursachten Ertragseinbußen zu minimieren. Der Einsatz von Pestiziden ist somit die einzige Möglichkeit, Ernteverluste durch biotische Faktoren effizient zu minimieren und damit die Nahrungsmittelgrundlage für die Weltbevölkerung sicherzustellen (Zhang *et al.*, 2011).

Die Relevanz des Sektors Landwirtschaft steigt kontinuierlich an. Neben dessen ursprüngliche Funktion – die Nahrungsmittelproduktion – hat er durch weitere Aufgaben an Bedeutung gewonnen. Bedingt durch die stetig wachsende Weltbevölkerung erscheint die Versorgung mit Nahrungsmitteln als eine der wichtigsten Herausforderungen für die Zukunft. Die Herausforderung wird noch größer, wenn man bedenkt, dass die erforderlichen Anbauflächen vermehrt in Konkurrenz zu Flächen für Rohstoffe zur Erzeugung von Bioenergie und Biomaterialien stehen. Um Nahrungsquantität bzw. –qualität gewährleisten zu können, müssen Ernteeinbußen durch abiotische Faktoren wie den Klimawandel oder biotische Faktoren wie Schädlinge reduziert werden. Während der Einfluss der abiotischen Faktoren nicht steuerbar ist, erscheint die Bekämpfung von Schädlingen als wichtigste Eingriffsmöglichkeit, um Ertragseinbußen zu verringern (Verreet, 2013). Der integrierte Pflanzenschutz ist deshalb ein entscheidendes Element zur Minimierung von Ernteverlusten.

Phytopathogene Pilze zählen zu den wichtigsten Schädlingen an den für Menschen ökonomisch bedeutsamen Kulturpflanzen. Sie gehören zu den ernsthaftesten Bedrohungen für die Nahrungsressourcen des Menschen (Henningsen, 2003), denn etwa ein Drittel der wirtschaftlich relevanten Pflanzenkrankheiten werden durch Pilze verursacht. Damit bilden Pilze nach Viren die zweitbedeutendste Gruppe von Pflanzenschädlingen (Anderson *et al.*, 2004). Zu den wichtigsten Kulturpflanzen in der Landwirtschaft zählen Reis (*Oryza sativa*), Weizen (*Triticum aestivum* L.) und Mais (*Zea mays*) (Dean *et al.*, 2012). Diese können von den unterschiedlichsten Pathogenen befallen werden, die Schäden von Blattflecken bis hin zu vollständigen Ernteaussfällen auslösen. Bekannte Vertreter solcher Schadpilze sind *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*, anamorph: *Pyricularia oryzae*) bei Reis, *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*) bei Weizen sowie *Ustilago maydis* bei Mais.

*M. oryzae*, der Erreger der Reisbrandkrankheit („rice blast disease“), ist wissenschaftlich und wirtschaftlich möglicherweise der bedeutendste phytopathogene Pilz (Dean *et al.*, 2012). Er ist ein Modellorganismus für die Forschung, der eine enorm hohe ökonomische Relevanz besitzt. Mehrere Aspekte haben dazu geführt, dass *M. oryzae* den Status des Modellorganismus einnimmt. Er ist fakultativ pathogen, was die Kultivierbarkeit auf artifiziellen Medien im Labor und damit einhergehend Untersuchungen der frühen Infektionsphasen wie Konidienkeimung und Appressorienbildung *ex planta* ermöglicht. Das Genom ist vollständig sequenziert, weswegen in Verbindung mit der Verfügbarkeit etablierter Transformationssysteme die Möglichkeit der genetischen Manipulation zur Untersuchung der molekularen Basis von Pflanze-Pathogen-Interaktionen gegeben ist (Dean *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2007). Die ökonomische Bedeutsamkeit von *M. oryzae* ist darauf zurückzuführen, dass der Reisbranderreger jährlich für Verluste von bis zu 30 % der weltweiten Reisernte verantwortlich ist, während Reis für mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung als Grundnahrungsmittel dient (Dean *et al.*, 2012). Die effiziente und nachhaltige Kontrolle dieses Schädling ist deshalb unbedingt in den Fokus des Pflanzenschutzes zu stellen. Der komplexe Infektionszyklus und die damit verbundenen Differenzierungsprozesse von *M. oryzae* bieten eine Reihe von möglichen Ansatzpunkten für die Fungizidforschung.

*M. oryzae* ist ein Ascomycet mit haploidem Chromosomensatz, der erstmals 1971 beschrieben wurde (Hebert, 1971). Früher wurde er immer wieder und auch heute wird er zum Teil noch immer fälschlicherweise als *Magnaporthe grisea* (*M. grisea*) bezeichnet. Seit 2002 gibt es jedoch eine klare Trennung zwischen der Spezies *M. oryzae* als Erreger der Reisbrandkrankheit auf *O. sativa* und *M. grisea* als Pathogen auf Fingerhirsen (*Digitaria*) (Couch und Kohn, 2002). Molekularbiologische Untersuchungen mit Hilfe gezielter genetischer Manipulation von *M. oryzae* werden genutzt, um die einzelnen Schritte des Lebenszyklus, z.B. die Anheftung der Konidien auf der Blattoberfläche, die Penetration der pflanzlichen Kutikula oder das invasive Wachstum innerhalb der Wirtspflanze, besser zu verstehen (Chumley und Valent, 1990; Jeon *et al.*, 2007). Etablierte Methoden zur genetischen Manipulation sind die klassische Protoplastentransformation, die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation oder „gene-silencing“ mittels RNA-Interferenz (RNAi) (Kück und Hoff, 2010).

Die Verbreitung von *M. oryzae* erfolgt anemochor oder hydrochor mittels Konidien und ist so sehr effizient und schnell. Dieser asexuelle Teil des Lebenszyklus bietet aber nicht nur Vorteile für das Pathogen, sondern hat auch diverse Schwachstellen, die zu dessen Bekämpfung genutzt werden können. Beispielsweise sind zelluläre Differenzierungsprozesse, wie das Auskeimen der Konidien für die nachfolgende Kolonisierung der Wirtspflanze essenziell. Nachdem sich die Konidien auf der hydrophoben Blattoberfläche von *O. sativa*

durch Sekretion eines präformierten Schleims anheften (Howard und Valent, 1996) beginnt die erste Differenzierungsphase. Bei einer ausreichend hohen Luftfeuchtigkeit von 80-90 % und Temperaturen von 26-28°C bildet sich ein Keimschlauch aus der apikalen Zelle der meist dreizelligen Konidien (Talbot, 2003). Wenn es zu feucht ist und die Konidien in Wasser schwimmen, wird dieser essenzielle Differenzierungsvorgang unterdrückt bis die optimale Luftfeuchtigkeit erreicht ist (Lee und Dean, 1993). Etwa vier Stunden später, wenn bestimmte Stimuli wie die hydrophobe Oberfläche, wachsartige Kutinmonomere (1,16-Hexadecandiol; Gilbert und Dean, 1996), Botenstoffe („second messenger“) wie cAMP oder Diacylglycerol (DAG) vorhanden sind, beginnt sich eine Infektionsstruktur zu formen - das Appressorium (Thines *et al.*, 1997). Die Entwicklung des Appressoriums ist ein für die Infektion der Pflanze notwendiger Differenzierungsschritt und für das Eindringen des Pathogens in die Pflanzenzelle unverzichtbar. Dabei formt sich im Zentrum des Appressoriums zunächst eine sich stark vergrößernde Vakuole. Lipidtröpfchen, die aus den Konidienzellen in den Keimschlauch gewandert sind (Thines *et al.*, 2000), akkumulieren anschließend im Appressorium und gelangen durch Mikroautophagozytose in die Vakuole, wo sie degradiert werden (Weber *et al.*, 2001). Durch diesen Prozess werden vermutlich die für die folgende Penetration benötigte Energie und Osmolyte wie Glycerin gewonnen. Während der Differenzierung des Appressoriums bildet sich dann ein Septum an der Grenze zwischen dem Keimschlauch und dem Appressorium. Während der Appressorienreifung bildet sich eine Melaninschicht in der inneren Appressorienzellwand (Talbot, 2003). Die Infektionsstruktur ist funktionell, wenn nach der Synthese von kompatiblen Soluten durch die semipermeable Melaninschicht in der Zellwand Wasser einströmt. Durch Osmose baut sich ein Turgordruck von etwa 80 MPa auf (de Jong *et al.*, 1997). Dieser hohe Turgor ermöglicht es *M. oryzae*, eine Penetrationshypho rein mechanisch durch die pflanzliche Kutikula zu pressen und dadurch die erste Schutzbarriere der Wirtspflanze zu überwinden (Howard *et al.*, 1991). Die Penetration erfolgt etwa 24 Stunden nach der Konidienkeimung (Tucker, 2001). Dabei wird die Penetrationshypho durch eine unmelanisierte Pore an der Basalplatte des Appressoriums freigesetzt (Bourett und Howard, 1992). Im Lumen der pflanzlichen Zelle beginnt die Penetrations- oder auch Primärhypho invasiv zu wachsen und sich zu dünneren Sekundärhyphen zu verzweigen. *M. oryzae* wächst zunächst biotroph im Intermembranraum ohne ins Zytoplasma der Wirtszellen vorzudringen. Das Kolonisieren der benachbarten Zellen erfolgt vermutlich über Plasmodesmata ohne die Zellwände zu beschädigen (Kankanala *et al.*, 2007). Beim Eindringen in die nächsten Zellen wird die nekrotrophe Phase in der zuvor kolonisierten Zelle ausgelöst, welche folglich abstirbt. *M. oryzae* wird somit als hemibiotrophes Pflanzenpathogen bezeichnet (Marcel *et al.*, 2010). 3-5 Tage nach der Penetration werden erste rautenförmige Läsionen in Form von abgestorbenem Gewebe auf der Blattoberfläche der Wirtspflanze

sichtbar (Webster und Weber, 2007). Durch die Stomata dringen nach weiteren 2-3 Tagen die Konidiophore nach außen, die dann Konidien zur Verbreitung freisetzen (Talbot, 2003).

Die Verbreitung der Konidien sowie die Besiedelung der Wirtspflanze und der Infektionsprozess stellen in der Pflanzenschutzforschung die wichtigsten Ansatzpunkte bei der Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung von Reisbrand dar. Zwar gibt es die klassischen Wirkorte wie die pilzliche Zellmembran (hier greifen Polyene wie Amphotericin B und Nystatin an, Odds *et al.*, 2003), die  $\beta$ -1,3-Glucan Biosynthese der pilzlichen Zellwand (Echinocandine wie Caspofungin, Bartizal *et al.*, 1997), die Ergosterol Biosynthese (Triazole wie Epoxiconazol, Ankers *et al.*, 1990), die RNA-Synthese (z.B. Flucytosin, Odds *et al.*, 2003) oder die mitochondriale Atmungskette (Strobilurine, Becker *et al.*, 1981). Diese Targets sind Ziele zur schnellen kurativen Kontrolle der Pathogene. Ein schnelles Absterben der Schädlinge ist die Folge, jedoch bereitet gerade deshalb die durch den enorm hohen Selektionsdruck geförderte Resistenzbildung ernsthafte Probleme (Hewitt, 2000).

Die infektionsrelevanten Differenzierungsprozesse hingegen sind aus der Sicht des Resistenzmanagements sehr interessante Fungizidtargets. Die Signaltransduktionsprozesse und Proteine, die in diesen Differenzierungsprozessen eine entscheidende Rolle spielen und auch für die erfolgreiche Infektion sowie die folgende Besiedelung des Wirts essenziell sind, werden als Pathogenitätsfaktoren bezeichnet. Die Inaktivierung dieser Faktoren hat meist kein Absterben des Pathogens zur Folge, sondern lediglich eine Unterbrechung des Infektionsprozesses (Howard, 1994). Fungizide, die nicht fungitoxisch wirken, haben oftmals sehr spezifische Wirkorte in verschiedenen Pathogenen und sind meist umweltschonender als unspezifisch wirkende Toxine (Thines *et al.*, 2004). Des Weiteren sinkt der Selektionsdruck und ein geringeres Resistenzrisiko ist vorhanden (Hewitt, 2000). Nachteilig ist, dass solche Fungizide oftmals nicht kurativ eingesetzt werden können, sondern nur protektiv. Zum einen wird im Pflanzenschutz bei der Bekämpfung von Schädlingsbefall eine effiziente, schnelle Tötung der Schaderreger erwartet. Zum anderen rückt aber die oftmals umweltschonendere Variante der protektiven Schädlingsbekämpfung in den Fokus der Forschung, da sich deren Attraktivität durch hohe Selektivität und ein gutes Resistenzmanagement wesentlich erhöht hat. Je nach Applikationsmethode werden weitere Eigenschaften für die Formulierung des Wirkstoffs wichtig, z.B. eine hohe Regenfestigkeit auf der Pflanze, die Fähigkeit in die Pflanze einzudringen oder sich systemisch zu verteilen, sowie die Stabilität inner- und außerhalb der Pflanze. Da keine einzelne Verbindung all diese Kriterien vereint, müssen für ein hoch effizientes Präparat Kompromisse oder Kombinationsmöglichkeiten gefunden werden (Henningesen, 2003).



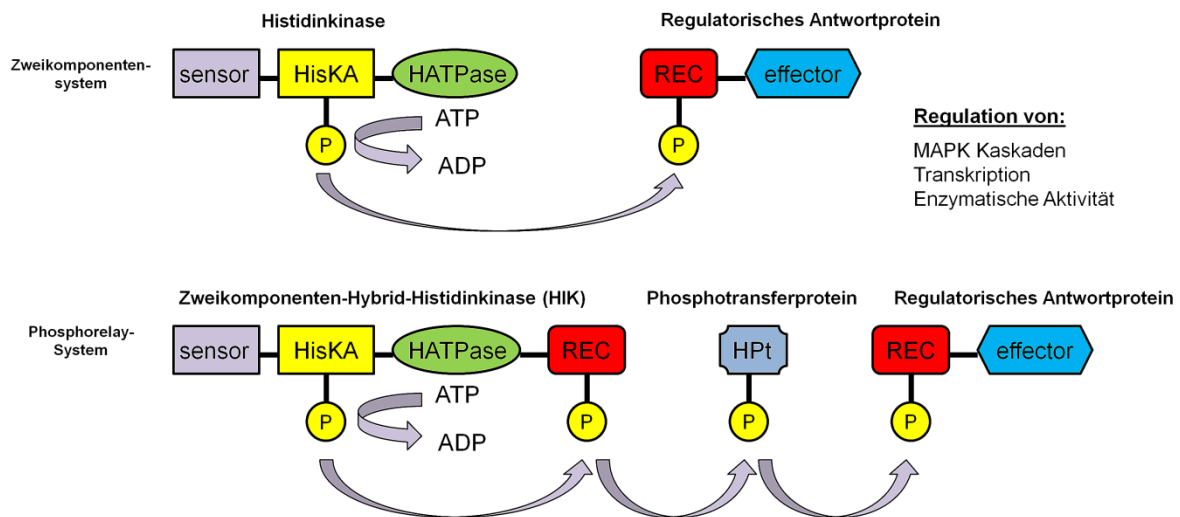
Im Fokus der modernen Pflanzenschutzforschung stehen Signaltransduktions- und Differenzierungsprozesse bei phytopathogenen Pilzen, da hier sowohl fungitoxische (z.B. Fludioxonil) als auch nicht-fungitoxische Wirkstoffe (z.B. Carpropamid) hoher Spezifität als Effektoren beschrieben sind und erfolgreich eingesetzt werden. Das Phenylpyrrol Fludioxonil greift in die Osmoregulation ein und bewirkt eine Hyperaktivierung der mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK) Kaskade des „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalwegs, was in Letalität resultiert (Kojima *et al.*, 2004). Carpropamid stört die Melaninbiosynthese durch Inhibition der Dehydroxylierungen von Scytalon zu 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalene und von Vermelone zu 1,3-Dihydroxynaphthalene (Thieron *et al.*, 1998). Folglich ist die Funktionalität der Appressorien nicht mehr gegeben. Deshalb bieten Untersuchungen von Signaltransduktionskaskaden die einzigartige Möglichkeit, Targets sowohl für protektiv als auch kurativ einsetzbare Fungizide zu finden.

## 1.2 Histidinkinasen als Elemente der Signaltransduktion

Für Zellen und Organismen ist es essenziell, Signale aus ihrer Umwelt zu detektieren und eine entsprechende Antwortreaktion auszulösen (Hoch, 2000). Das Identifizieren von Veränderungen in Temperatur, Licht, Sauerstoff, Osmolarität sowie dem Nährstoffangebot muss schnell und mit hoher Sensitivität erfolgen. Um solche Veränderungen zu erkennen und in transportable, intrazelluläre Ereignisse umzuwandeln, haben Lebewesen sensible Mechanismen zur Signalerkennung und deren Verarbeitung entwickelt.

Die Detektion externer Signale wird neben ionotropen Rezeptoren durch metabotrope Sensorproteine wie G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Histidinkinasen ermöglicht. Externe Stimuli führen zur Modifikation spezifischer Domänen von Sensorproteinen, z.B. durch Phosphorylierung. Dies ist neben kompetitiver und allosterischer Hemmung der wichtigste intrazelluläre Regulationsmechanismus für physiologische Prozesse (Johnson und Barford, 1993). Der intrazelluläre Phosphattransport wird entweder durch Phosphotransfer- oder regulatorische Proteine ermöglicht oder erfolgt über MAPK-Kaskaden. MAPK-Kaskaden sind ubiquitär in eukaryotischen Organismen und ermöglichen durch ihren hintereinandergeschalteten Aufbau die Verkettung diverser Regulations- und Kontrollmechanismen. Die MAPK-Kinase-Kinase phosphoryliert die MAPK-Kinase, welche ihrerseits ein Phosphorylierungssignal auf die MAPK überträgt und diese damit aktiviert. Die Regulation der MAPK-Kaskaden ist variabel und kann durch extrazelluläre Ereignisse und Rezeptorproteine sowie durch Phosphorelaysysteme erfolgen (Cobb und Goldsmith, 1995; Catlett *et al.*, 2003). Die Phosphorylierung spezifischer Substrate, Veränderungen von enzymatischer Aktivität, die Modulation von Transkriptionsfaktoren und damit einhergehend

eine Veränderung des Genexpressionsprofils sind physiologische Konsequenzen der Signaltransduktion (Bahn *et al.*, 2007). In Lebewesen hat sich die Signaltransduktion in unterschiedlicher Weise entwickelt. Beispiele sind das verhältnismäßig einfach konstruierte und deshalb gut untersuchte bakterielle Zweikomponentensystem sowie das komplexer aufgebaute Phosphorelaysystem (Abb. 1).



**Abb. 1: Das Zweikomponentensystem und das Phosphorelaysystem.** Das Zweikomponentensystem besteht aus einer Histidinkinase und einem regulatorischen Antwortprotein (oben). Das Phosphorelaysystem ist aus einer Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase, einem Phosphotransferprotein und einem regulatorischen Antwortprotein aufgebaut (unten). Bei beiden Systemen moduliert die Effektordomäne MAPK-Kaskaden, Transkriptionsfaktoren oder enzymatische Aktivität. sensor = Sensordomäne, HisKA = Histidinkinase Domäne, HATPase = Histidin-ATPase-Domäne, REC = regulatorische Domäne, HPt = Histidin-Phosphotransfer-Domäne, effector = Effektordomäne, P = Phosphatgruppe (modifiziert nach Catlett *et al.*, 2003).

Diese Systeme erfassen Signale durch Auslösung oder Inhibition von Phosphorylierungen an oftmals membranassoziierten Histidinkinasen und vermitteln den Signaltransport zu regulatorischen Antwortproteinen. Elektrostatische Veränderungen aufgrund der Bindung einer Phosphatgruppe resultieren in einer Konformationsänderung des phosphorylierten Proteins (Johnson und Barford, 1993). Das bewirkt eine einsetzende Proteinaktivität, einen Aktivitätsverlust oder eine Aktivitätsveränderung. Proteinphosphorylierung kann Oligomerisierung (Weiss *et al.*, 1992; Webber und Kadner, 1997), Dimerisierung (Cobb und Goldsmith, 2000), Interaktion mit anderen Proteinen (Blat und Eisenbach, 1994; Newton, 2001) oder mit DNA (Aiba *et al.*, 1989) sowie eine Kombination dieser Ereignisse bewirken (Harlocker *et al.*, 1995; Anand *et al.*, 1998). Klassische Zweikomponentensysteme und komplexe Phosphorelaysysteme regulieren Differenzierungsprozesse, Chemotaxis sowie Primär- und Sekundärmetabolismus in Bakterien und Pilzen und werden oft als Virulenzfaktoren beschrieben (Grebe und Stock, 1999; Wolanin *et al.*, 2002).

Der Phosphattransfer in einfachen Zweikomponentensystemen ist durch drei Reaktionen gekennzeichnet: Autophosphorylierung, Phosphattransfer und Dephosphorylierung durch Hydrolyse. Dabei dient der universelle Energieträger ATP als Phosphatdonor und bindet an die Histidin-ATPase-Domäne (HATPase) des Histidinkinase-Proteins. Die Familie der Histidinkinasen ist durch bis zu 200 Aminosäuren große Bereiche konservierter Histidinkinase-Domänen (HisKA) charakterisiert, die in unmittelbarer Nähe dieser HATPase lokalisiert sind. Die  $\gamma$ -Phosphatgruppe des ATP wird auf den Histidinrest der HisKA übertragen, woraufhin der Transfer der Phosphatgruppe zu dem Aspartatrest der regulatorischen Domäne („receiver domain“, REC) eines zweiten Proteins, dem regulatorischen Antwortprotein, folgt. Dessen Effektordomäne initiiert die physiologische Regulation (Abb. 1 oben). Nach der abschließenden Hydrolyse des Phosphats kann das regulatorische Antwortprotein erneut moduliert werden.

Die Architektur des Phosphorelaysystems besteht aus modifizierten Histidinkinasen, den Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HIKs) und zusätzlichen regulatorischen Elementen wie Phosphotransferproteinen. Sequenzanalysen belegen, dass etwa 25 % der bekannten Histidinkinasen zu den HIKs gehören (Capra und Laub, 2012). Diese Hybride haben neben der HisKA und der HATPase eine regulatorische REC als zusätzliche Domäne (Abb. 1 unten). Analog zum klassischen Zweikomponentensystem findet die Übertragung der Phosphatgruppe vom Histidinrest der HisKA auf den Aspartatrest der REC statt, jedoch noch innerhalb ein und desselben Proteins. Das Phosphat wird nun auf die Histidin-Phosphotransfer-Domäne (HPt) des Phosphotransferproteins übertragen und es erfolgt der Transfer zu dem Aspartatrest der REC des regulatorischen Antwortproteins (Appleby *et al.*, 1996). Dies resultiert wiederum in der Modulation der Effektordomäne und einer physiologischen Regulation (Abb. 1 unten). Die regulatorische Zwischenstufe innerhalb der Hybrid-Histidinkinase und das zusätzliche Phosphotransferprotein ermöglichen eine weitaus variabelere Signaltransduktion als ein klassisches Zweikomponentensystem. Phosphorelaysysteme dieser Art sind im Tierreich nicht zu finden, was die Attraktivität als potentielles Wirkstofftarget deutlich erhöht (Lander *et al.*, 2001; Wolanin *et al.*, 2002; Zhang und Hendrickson, 2010). Zwar gibt es Histidinkinasen in Säugern, wie der *Ras*-assoziierte Tumorsuppressor Nm23p, die Histon-H4-Histidinkinase oder die Histidinkinase- $\beta$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine. Es sind aber keine Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HIKs) bekannt, die in Säugern als Sensorproteine in Zweikomponentensystemen beteiligt sind (Steeg *et al.*, 2003).

Durch die Variabilität ihrer Sensordomänen erlangen HIKs hohe Diversität und HIKs von Pilzen werden unter anderem aufgrund dieser Unterschiede in elf Gruppen eingeordnet (Catlett *et al.*, 2003). Sie vermitteln Reaktionen auf Umwelteinflüsse und Stress, sind beteiligt an pathogenitätsrelevanten, zellulären Differenzierungsprozessen, wie Hyphen- und

Konidiendifferenzierung (Li *et al.*, 1998; Hohmann, 2002; Viaud *et al.*, 2006; Nemecek *et al.*, 2006; Islas-Flores *et al.*, 2011). Mitglieder der Gruppe III HIKs wurden als Targets der antifungischen Verbindungen Fludioxonil, Iprodion sowie des Naturstoffs Ambruticin identifiziert (Motoyama *et al.*, 2005a; Dongo *et al.*, 2009; Fillinger *et al.*, 2012). Sensor HIKs sind strukturell verwandt zu Ser/Thr/Tyr Kinasen, jedoch unterscheiden sie sich im Mechanismus der Phosphorylierungsreaktion. Ser/Thr/Tyr Kinasen formen Phosphoesterverbindungen, während HIKs die Phosphatgruppen zu Phosphoramidaten verknüpfen (Islas-Flores *et al.*, 2011). Die Hydrolyse von Phosphoramidaten setzt signifikant höhere Energie frei als die Hydrolyse von Phosphoesterverbindungen, was deren Einsatzmöglichkeiten und somit deren Nutzen für die Modulation physiologischer Prozesse in biologischen Systemen effizienter macht (Stock *et al.*, 2000).

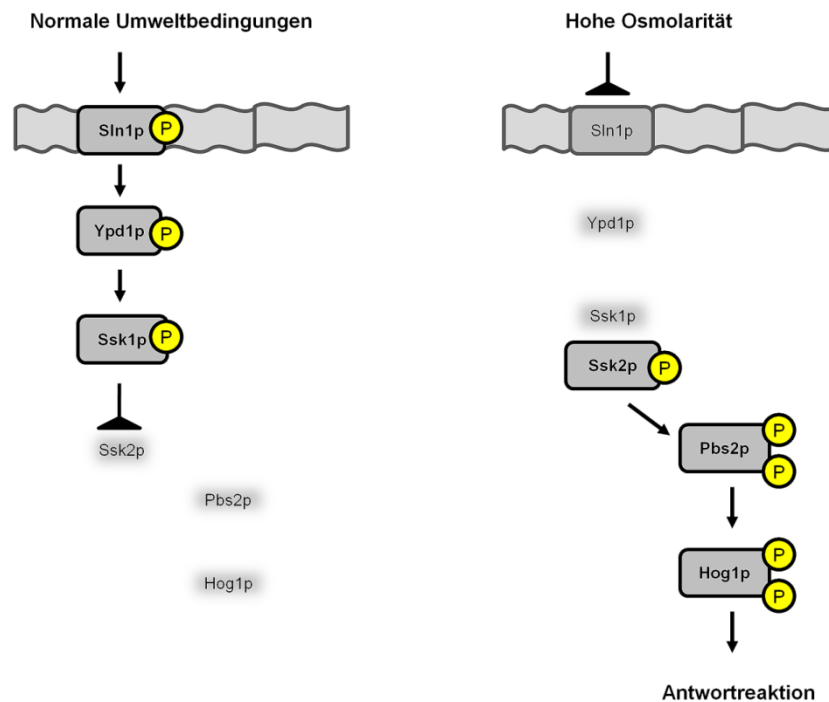
Der Ursprung von HIKs und Phosphorelaysystemen wird in Prokaryoten vermutet. Zweikomponentensysteme sind in nahezu allen bakteriellen Spezies zu finden und phylogenetische Analysen bestärken die Annahme des von Pro- zu Eukaryoten vermittelten horizontalen Gentransfers dieser Signaltransduktionssysteme (Brinkman *et al.*, 2001). Die Anzahl der codierenden Gene für solche Systeme korreliert mit der Komplexität der ökologischen Nischen der Organismen (Alm *et al.*, 2006; Galperin, 2005; Galperin *et al.*, 2010; Koretke *et al.*, 2000). Bakterien, welche vornehmlich in konstanten ökologischen Nischen vorkommen, haben nur eine geringe Anzahl an Genen, die für Signalsysteme wie Zweikomponentensysteme codieren. Genome mancher obligat pathogener Erreger oder Endosymbionten beinhalten nur wenige oder gar keine solcher Gene (z.B. *Mycoplasma genitalium*) (Ulrich und Zhulin, 2010). Im Gegensatz dazu wurde in Genomen von Bakterien, die komplexe ökologische Nischen mit sich rasch verändernden Umwelteinflüssen besiedeln, eine große Zahl an Genen mit Relevanz für Zweikomponentensysteme identifiziert. Beispiele sind *Myxococcus xanthus* (136 Histidinkinasen und 127 regulatorische Antwortproteine) und *Nostoc punctiforme* (160 Histidinkinasen und 98 regulatorische Antwortproteine) (Ulrich und Zhulin, 2010). Das deutet darauf hin, dass die Anpassung von Organismen an schwierige ökologische Verhältnisse im Verlaufe der Evolution mit der Aneignung eines komplexeren Repertoires an Signaltransduktionssystemen einhergeht. Lange wurde vermutet, dass Zweikomponentensysteme auf Prokaryoten limitiert sind, doch seit Anfang der 90er Jahre sind, wenn auch in weitaus geringerer Anzahl, auch Histidinkinasen in Eukaryoten beschrieben worden (Parkinson, 1993). Unter den ersten in Eukaryoten identifizierten Histidinkinasen waren Signalproteine in *Arabidopsis thaliana* oder HIKs in *Saccharomyces cerevisiae* (Urao *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 1993; Chang und Meyerowitz, 1994; Maeda *et al.*, 1994). Während es im Genom von *S. cerevisiae* nur ein einziges Gen gibt, das für die HIK Sln1p kodiert, sind in den Genomen von pathogenen Pilzen etliche HIK-codierende Gene vorhanden. In *Candida albicans* sind drei HIKs (Hk1p, Sln1p, Os1p/Nik1p) mit Funktionen in Osmoregula-

tion, Hyphenwachstum und Virulenz beschrieben (Nagahashi *et al.*, 1998; Catlett *et al.*, 2003). Sequenzanalysen identifizierten zehn HIK-codierende Gene im Genom von *M. oryzae*, elf in *Neurospora crassa* (anamorph: *Crysolinia crassa*), 16 in *Gibberella moniliformis* (anamorph: *Fusarium verticillioides*), 17 in *Botryotinia fuckeliana* (anamorph: *Botrytis cinerea*) und 21 in *Cochliobolus heterostrophus* (anamorph: *Bipolaris maydis*) (Catlett *et al.*, 2003; Tanaka und Izumitsu, 2010). Besondere Relevanz haben Histidinkinasen für fakultativ pathogene Organismen (Tanaka und Izumitsu, 2010). Gerade fakultativ pathogene Erreger sind im Rahmen ihres Lebenszyklus vielen sich schnell und stark verändernden Umwelteinflüssen inner- und außerhalb ihrer Wirtsorganismen ausgesetzt und müssen für eine erfolgreiche Besiedelung und Infektion sensible Mechanismen zur Signalerkennung und -verarbeitung haben. Die Relevanz von HIKs und Phosphorelaysystemen ist in diesen regulatorischen Netzwerken von enormer Bedeutung. Zudem wird durch Abwesenheit dieser Signalsysteme in Säugetieren die Attraktivität als Wirkstofftarget drastisch erhöht (Gotoh *et al.*, 2010). Somit ist die Erforschung dieser Systeme für das Verständnis von pathogenitätsrelevanten Differenzierungsvorgängen von pathogenen Pilzen von großer Relevanz.

### 1.3 Die Osmoregulation in Pilzen: Der HOG-Signalweg

Die Osmoregulation in Pilzen, vermittelt durch ein regulatorisches Netzwerk, ist ein biologischer Prozess, der sowohl durch Signalerkennung und -weiterleitung als auch durch eine direkte physiologische Antwort gekennzeichnet ist. Bei sich ändernden Umweltbedingungen wie Regen oder Trockenheit wird durch die unterschiedliche Konzentration von intra- und extrazellulären osmotisch aktiven Teilchen ein osmotischer Gradient über der semipermeablen Zellmembran erzeugt. Wasser fließt immer zu dem niedrigeren chemischen Potential (z.B. aus der Zelle heraus bei Trockenstress), um einen Konzentrationsausgleich der gelösten Teilchen zu erreichen bzw. die freie Enthalpie des Gesamtsystems zu minimieren (Kramer und Myers, 2010). Die Zelle kann durch Osmoregulation aktiv ihren Turgor verändern und die Homöostase aufrecht erhalten. Das ist während der invasiven Lebensphase bei pathogenen Organismen von hoher Relevanz. Der phytopathogene Pilz *M. oryzae* ist innerhalb der Pflanze mehreren, sich schnell verändernden Umwelteinflüssen und pflanzlichen Abwehrmechanismen ausgesetzt. So hat das Pathogen neben Abwehrreaktionen, wie der hypersensitiven Reaktion durch Bildung von  $H_2O_2$  (ROS, reactive oxygen species; Wojtaszek, 1997), vor allem mit steigenden Konzentrationen an Salzen und anderen Osmolyten, die durch ein Degradieren des Pflanzengewebes entstehen, umzugehen. Um eine erfolgreiche Infektion und die Kolonisierung der Wirtspflanze zu gewährleisten, ist eine geeignete physiologische Reaktion gegenüber diesen Einflüssen notwendig. Die Strategie

von Mikroorganismen, sich mit solchen erhöhten Konzentrationen an Osmolyten zu arrangieren, ist die intrazelluläre Akkumulation von kompatiblen Soluten wie Glycerin (Kempf und Bremer, 1998; Burg und Ferraris, 2008). Die Osmoregulation in Pilzen wird durch den HOG-Signalweg moduliert und ist z.B. in dem Modellorganismus *S. cerevisiae* sehr gut untersucht (Furukawa und Hohmann, 2013). Neben der Akkumulation von kompatiblen Soluten werden in *S. cerevisiae* auch Veränderungen in der Komposition des Zytoskeletts (Chowdhury *et al.*, 1992), der Zellwand (Hughes *et al.*, 1993), der Ionenverteilung (Niu *et al.*, 1995), des Zellzyklus und des Metaboloms festgestellt (Nordlander *et al.*, 2008). Weiterhin sind starke Auswirkungen osmotischer Veränderungen auf das Transkriptom beschrieben (Hohmann, 2002). Der HOG-Signalweg in *S. cerevisiae* besteht aus zwei unabhängigen Signalkaskaden, dem Sln1-Zweig und dem Sho1-Zweig, die ab der MAPKK Pbs2p downstream die gleichen Komponenten modulieren. Der Sln1-Zweig ist bezüglich der Osmoregulation und der Vitalität von höherer Relevanz als der Sho1-Zweig (O'Rourke *et al.*, 2002). Dem Sho1-Zweig mit den Elementen Ste11p und Ste50p werden Funktionen im Aufbau und bei der Stabilität der Zellwand zugeschrieben (Garcia *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu dem Sln1-Zweig ist er jedoch unter Normalbedingungen nicht unabdingbar für das Überleben des Organismus. Die Inaktivierung des Gens *SLN1* ist in *S. cerevisiae* letal, was dessen wichtige Rolle in der Zellphysiologie verdeutlicht (Maeda *et al.*, 1994). Der Sln1-Zweig besteht aus einem Phosphorelaysystem mit den Proteinen Sln1p-Ypd1p-Ssk1p und einem nachgeschalteten MAPK Kaskade System mit den Proteinen Ssk2p-Pbs2p-Hog1p (Abb. 2). Das Phosphorelaysystem ist unter isoosmotischen Bedingungen konstitutiv aktiv (autophosphoryliert) und die nachgeschaltete MAPK Kaskade ist inaktiv. Durch hohe Osmolarität wird das Phosphorelaysystem inaktiviert, wodurch die MAPK Kaskade aktiv wird (Abb. 2). Somit ist das Phosphorelaysystem ein negativer Regulator des HOG-Signalwegs.



**Abb. 2: Der Sln1-Zweig des “High Osmolarity Glycerol” (HOG)-Signalwegs in *Saccharomyces cerevisiae*.** Der Sln1-Zweig besteht aus einem Phosphorelaysystem mit den Proteinen Sln1p-Ypd1p-Ssk1p und einer MAPK Kaskade mit den Proteinen Ssk2p-Pbs2p-Hog1p. Das Phosphorelaysystem ist unter isoosmotischen Bedingungen konstitutiv aktiv (autophosphoryliert) und die nachgeschaltete MAPK Kaskade ist inaktiv. Durch hohe Osmolarität wird das Phosphorelaysystem inaktiviert, dadurch wird die MAPK Kaskade aktiv und eine Antwortreaktion erfolgt.

Die Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase Sln1p („synthetic lethal of N-end rule“) ist ein membranständiger Osmosensor mit zwei Transmembrandomänen, einer Histidinkinase-Domäne (HisKA), einer regulatorischen Domäne („receiver domain“, REC) und der Histidin-ATPase-Domäne (HATPase). Unter isoosmotischen Bedingungen ist der Histidinrest der Histidinkinase-Domäne autophosphoryliert und das Phosphat wird auf den Aspartatrest der regulatorischen Domäne innerhalb des Proteins übertragen. Durch das Phosphotransferprotein Ypd1p („tyrosine (y) phosphatase dependent“) wird das Phosphorylierungssignal zu dem Aspartatrest des regulatorischen Proteins Ssk1p („suppressor of sensor kinase“) transferiert. Diese drei Proteine bilden das Phosphorelaysystem (Miermont *et al.*, 2011). Die Phosphorylierung von Ssk1p hindert das Protein daran, eine Bindung mit der MAPK Kinase Kinase Ssk2p („suppressor of sensor kinase“) einzugehen und die MAPK Kaskade bleibt inaktiv (Abb. 2 links). Hohe Osmolarität führt über noch unbekannte Mechanismen zu einer Dephosphorylierung von Sln1p und somit zu einer Inaktivierung des Phosphorelaysystems. Als Mechanismus der Inaktivierung des Phosphorelaysystems wird die Dephosphorylierung von Sln1p durch dessen Sensitivität gegen Membrantensionen bei sich verändernder Osmolarität diskutiert (Reiser *et al.*, 2003). Die Menge an phosphoryliertem Ssk1p nimmt ab und dephosphoryliertes Ssk1p kann mit der MAPKKK Ssk2p interagieren. Durch diese Interaktion wird die Phosphorylierung von Ssk2p initialisiert und das Signal über die Ser514

und Thr518 Reste der MAPK Kinase Pbs2p („polymyxin B sensitivity“) zu den Thr174 und Tyr176 Resten der MAPK Hog1p („high osmolarity glycerol response“) übertragen. Hog1p wandert in den Zellkern und die entsprechenden Antwortreaktionen werden ausgelöst (Miermont *et al.*, 2011). Das sind die Aktivierung der Kinasen Rck1p, Rck2p (Bisland-Marchesan *et al.*, 2000; Bisland *et al.*, 2004) und Pfk2p (Dihazi *et al.*, 2004) oder die Veränderung der Funktion des Aquaglyceroporins Fps1p (Mollapour und Piper, 2007). Durch Fps1p wird Influx und Efflux von Glycerin gesteuert und der Transportkanal schließt sich bei hyperosmotischen Bedingungen, um die intrazelluläre Akkumulation von Glycerin zu ermöglichen (Beese *et al.*, 2009). Nach einigen Minuten unter hyperosmotischem Stress wird durch Hog1p die Expression von über 600 Genen moduliert (de Nadal *et al.*, 2011). Modulatoren sind bekannte Transkriptionsfaktoren wie Hot1p, Sko1p, Smp1p und Msn2p (Alepuz *et al.*, 2003; Proft *et al.*, 2001; de Nadal *et al.*, 2003; Rep *et al.*, 2000). Hog1p wird durch die Serin/Threoninphosphatasen Ptc1p, Ptc2p und Ptc3p, welche auch die Dephosphorylierung von Pbs2p beeinflussen, und durch die Tyrosin Phosphatasen Ptp2p und Ptp3p dephosphoryliert und somit inaktiviert (Miermont *et al.*, 2011; Saito und Tatebayashi, 2004). Die Dephosphorylierung von Hog1p ist unter physiologischen Bedingungen essenziell, da dauerhafte Aktivität von Hog1p einer konstitutiven Stressantwort gleicht und letal ist (Hohmann, 2009). Der HOG-Signalweg in pathogenen Pilzen ist ähnlich zu dem System in *S. cerevisiae*, jedoch sind dessen Architektur sowie die Mechanismen der Signalerkennung und -verarbeitung komplexer. In *M. oryzae* sind der HOG-Signalweg sowie die Osmoregulation bisher unzureichend untersucht. Im Vergleich zur Signalkaskade in Hefe werden in *M. oryzae* mehr Komponenten vermutet, z.B. ist im Phosphorelaysystem neben MoSln1p mindestens eine zweite Histidinkinase MoHik1p an der Regulation beteiligt. Im Genom von *M. oryzae* sind 10 HIK-codierende Gene zu finden. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* führt die Inaktivierung des Gens *Mosln1* nicht zu Letalität (Zhang *et al.*, 2010). Diese Tatsache könnte in dem Vorhandensein von mehreren Histidinkinasen begründet sein, die ähnliche Funktionen im Phosphorelaysystem haben können. Die genauen Interaktionen der Signalproteine im Phosphorelaysystem von *M. oryzae* sowie die Mechanismen des Phosphattransfers sind noch nicht untersucht. Bekannt sind nur Studien zu Interaktionen zwischen MoHik1p und dem Phosphotransferprotein Ypd1p aus *S. cerevisiae*; Untersuchungen zu MoYpd1p aus *M. oryzae* sind jedoch nicht beschrieben (Motoyama *et al.*, 2005a). Dies ist erstaunlich, da dieser Signaltransduktionsweg in pathogenen Pilzen ein anerkanntes Fungizidtarget ist und kommerzielle Fungizide, deren fungizide Wirkung auf die Modulation und die Störung dieser Signalkaskade beruht, wie Phenylpyrrole (z.B. Fludioxonil) und Dicarboximide (z.B. Iprodione), weltweit umfangreich Anwendung finden (Furukawa *et al.*, 2012). Trotz des erfolgreichen Einsatzes als Agrarfungizid ist der genaue Wirkmechanismus (mode of action) dieser Verbindungen noch unklar (Tanaka und Izumitsu,



2010). Es wird lediglich eine, für filamentöse Pilze spezifische Histidinkinase im HOG-Signalweg als Angriffspunkt diskutiert (in *M. oryzae* MoHik1p). Es ist eine Verbindung von der Applikation von Fludioxonil und Iprodion zu einer konstitutiven Aktivierung der MAPK MoHog1p über die Histidinkinase MoHik1p beschrieben. Diese unkontrollierte Aktivierung von MoHog1p resultiert in Letalität (Motoyama *et al.*, 2005a). Des Weiteren wird über die Beteiligung von MoHik1p abhängigen Faktoren wie Phosphotransferproteinen oder regulatorische Antwortproteinen spekuliert (Tanaka und Izumitsu, 2010).

## 2 ZIELSETZUNG

Das Ziel dieser Arbeit war, Untersuchungen zum Verständnis der Signaltransduktion bei der Stressantwort in phytopathogenen Pilzen durchzuführen. Als Modellorganismus wurde der Erreger der Reisbrandkrankheit *M. oryzae* gewählt - ein phytopathogener Pilz, von hoher wissenschaftlicher und ökonomischer Relevanz.

Zum einen sollte das spezifische Regulationssystem der Osmoregulation, der „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg sowie der noch unbekannte Wirkmechanismus des kommerziellen Agrarfungizids Fludioxonil näher untersucht werden. Dazu galt es, noch nicht bekannte Komponenten des Phosphorelaysystems des HOG-Signalwegs von *M. oryzae* zu identifizieren und diese durch molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden zu charakterisieren.

Zum anderen sollten umfassende physiologische und molekularbiologische Untersuchungen zu spezifischen Signalproteinen, den Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HIKs), in *M. oryzae* erfolgen. Ziel war es hierbei, alle HIK-codierenden Gene des phytopathogenen Pilzes zu inaktivieren und anhand der Analyse der generierten Mutantenstämme mögliche Funktionen der inaktivierten Gene bzw. deren Genprodukte zu beschreiben. Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung einer möglichen Beteiligung der HIKs an morphologischen und pathogenitätsrelevanten Differenzierungsprozessen sowie deren physiologischer Relevanz unter verschiedenen Umwelteinflüssen.

## 3 VERWENDETE MATERIALIEN

### 3.1 Chemikalien und Medienbestandteile

Alle Chemikalien und Reagenzien, die hier nicht aufgelistet sind, wurden analyserein von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) bezogen.

APS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bacto™ Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Nutrient Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biozym Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloroform	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
CSPD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Difco™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Difco™ Potato Dextrose Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Digoxigenin-11-dUTP (alkali lable)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker III	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker VII	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dNTP's	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glukose	SHS, Gesellschaft für Klinische Ernährung GmbH, Heilbronn
Glyzin	MP Biomedicals, Solon, USA
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt Typ 695	Hartge Ingredients GmbH & Co. KG, Hamburg
Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne AS)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
IPTG	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Magermilchpulver Bio	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell
Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
NaCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Riedel-de Haën, Seelze
Orange Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Rotiphorese® - 40 (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Scytalon	IBWF, Kaiserslautern
SDS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sorbit	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
X-Gal	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Wasser

Das Ansetzen der Medien und Lösungen erfolgte mit deionisiertem Wasser  $H_2O_{DE}$  (Seradest SD 2000, SERAL-Reinstwasser-Systeme GmbH, Ransbach-Baumbach). Die für molekularbiologische Arbeiten benötigten Puffer und Lösungen wurden mit autoklaviertem ultrafiltriertem Reinstwasser  $H_2O_{UF}$  (Milli-Q<sup>®</sup> Synthesis, Quantum<sup>®</sup> EX, Q-Gard<sup>®</sup> 2, Millipore GmbH, Schwalbach) hergestellt. Für die Isolierung von RNA wurde RNase-freies Wasser eingesetzt ( $H_2O_{RF}$ , Invitrogen GmbH, Darmstadt).

Lösungsmittel

Acetonitril	Scharlau Chemie, Barcelona, Spanien
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	LGC Promochem GmbH, Wesel

Säuren und Laugen

Ameisensäure	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
KOH	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Merck KGaA, Darmstadt

Antibiotika

Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Cefotaxim-Natrium	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Fludioxonil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glufosinatammonium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glufosinatammonium (Basta <sup>®</sup> )	Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld
Hygromycin B	Invivogen, San Diego, USA
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptomycinsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Tetracyclinhydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Die Antibiotika wurden, sofern nicht anders angegeben, in  $H_2O_{UF}$  gelöst, sterilfiltriert und die Stammlösungen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.2 Verbrauchsmaterial

Standardmaterialien, deren unterschiedliche Hersteller für die in dieser Arbeit verwendeten Methoden irrelevant sind, wurden hier nicht separat aufgelistet (Bsp.: Petrischalen).

Bonater <sup>®</sup> Einheitserde Typ ED-73	Balster Einheitserdewerk GmbH, Fröndenberg
Elektroporationsküvetten (1 mm)	PeqLab, Erlangen
Expositionskassette (X-Ray-Cassette)	Rego X-Ray GmbH, Augsburg
Filtrierpapiere (MN615)	Macherey-Nagel, Düren
Gasperlen (Ø 0,75-1 mm, 1,7-2 mm)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hydrophobe Deckgläser 76x51mm (Nr. 653081)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Kordelzugbeutel Rotilabo <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Myracloth	Calbiochem, San Diego, USA
Nitrozellulose-Filter NC45ST, Ø 47 mm, 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Röntgenfilm Amersham Hyperfilm <sup>™</sup> ECL	GE Healthcare Limited, München
Röntgenfilm CL-X Posure <sup>™</sup>	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Schleifpapier (Körnung 240)	Wolcraft GmbH, Kempenich
Sprühflasche HDPE	H. Hermann Rotert GmbH & Co. KG, Bad Iburg
Sterilfilter (Syringe Filter 0,2 µm)	VWR International GmbH, Darmstadt
Transfermembran Roti <sup>®</sup> -NC (0,2 µm)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Transfermembran Roti <sup>®</sup> Nylon Plus	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

### 3.3 Antikörper und Enzyme

Die nachfolgend aufgelisteten Antikörper und Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

#### Antikörper

Anti-biotin, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
Anti-Digoxigenin AP, Fab Fragments	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
Phospho-p38 MAPK <sup>(Thr180/Tyr182)</sup> (D3F9) XP <sup>™</sup>	Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA

## Enzyme

DreamTaq™ DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Long-PCR-Enzyme-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysing Enzymes von <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phusion® Hot Start High Fidelity DNA Pol	Finnzymes, Vantaa, Finnland
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen	NEB (New England Biolabs Inc.), Beverly, USA
RNase A	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase-free DNase-Set	Qiagen, Hilden
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

## 3.4 Reaktionskits

Nachfolgend aufgelistete Reaktionskits wurden, falls nicht anders angegeben, nach Angaben des Herstellers verwendet.

CloneJET™ PCR Cloning Kit	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iScript™ One-Step RT-PCR Kit SYBR® Green	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
pGEM®-T Easy Vector System	Promega, Mannheim
Phototope®-HRP Western Blot Detection System	Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies, Böblingen
RNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden

## 3.5 Lösungen und Puffer

Alle Angaben der Lösungen und Puffer beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf ein Endvolumen von 1,0 l H<sub>2</sub>O<sub>DE</sub>. Der jeweils angegebene pH-Wert wurde mit HCl oder NaOH eingestellt. Bei reinen Stammlösungen, die hier nicht explizit aufgeführt sind, wurden die Lösungen entsprechend der Konzentrationsangabe in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> gelöst und bei Zugabe zu bereits keimfreien Ansätzen vorher sterilfiltriert.

LösungenAminosäurelösung:

Arginin	1,0 % (w/v)
Aspartat	0,5 % (w/v)
Isoleucin	0,5 % (w/v)
Lysin	1,0 % (w/v)
Methionin	0,5 % (w/v)
Phenylalanin	0,5 % (w/v)
Serin	0,5 % (w/v)
Threonin	1,0 % (w/v)
Uracil	0,2 % (w/v)
Valin	0,5 % (w/v)

Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP):

Anti-Digoxigenin-AP	1,5 µl
Blockpuffer	ad 20 ml

Denaturierungslösung (Southern Blot):

NaCl	0,8 M
NaOH	0,4 M

Denhardt's-Lösung (100x):

BSA, Fraktion V	2,0 % (w/v)
Ficoll® 400	2,0 % (w/v)
PVP	2,0 % (w/v)

Mg<sup>2+</sup>-Lösung (pH 7,0):

MgCl <sub>2</sub>	1,0 M
MgSO <sub>4</sub>	1,0 M

Nitratsalzlösung:

KCl	140 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	220 mM
MgSO <sub>4</sub>	40 mM
NaNO <sub>3</sub>	1,4 M

PEG-Lösung:

PEG 3350	40 % (w/v)
KCl	0,6 M
CaCl <sub>2</sub>	50 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM

SOL 1-Lösung (Lagerung bei 4°C):

Glukose	50 mM
Na <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0)	10 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM

SOL 2-Lösung:

NaOH	200 mM
SDS	1,0 % (w/v)

SOL 3-Lösung (Lagerung bei 4°C):

Essigsäure	2,0 M
Kaliumacetat	3,0 M

Spurenelementlösung 1 (pH 6,5):

CoCl <sub>2</sub>	7,0 mM
CuSO <sub>4</sub>	6,0 mM
FeSO <sub>4</sub>	18 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	180 mM
MnCl <sub>2</sub>	25 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	135 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	6,0 mM
ZnSO <sub>4</sub>	80 mM

Die Komponenten lösen sich erst bei Erwärmung auf >50°C. Der pH-Wert von 6,5 wurde mit KOH eingestellt.

Spurenelementlösung 2:

CuSO <sub>4</sub>	0,40 mM
FeSO <sub>4</sub>	0,35 mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,60 mM
MnSO <sub>4</sub>	0,60 mM
ZnSO <sub>4</sub>	0,35 mM

Zellaufschlusslösung (Western Blot):

Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
DTT	0,1 M
Glyzerin	5,0 % (v/v)
SDS	2,0 % (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	10 mM

PufferBlockpuffer (Southern Blot):

Magermilchpulver	1,5 g
Maleinsäurepuffer	100 ml

Detektionspuffer (Southern Blot, pH 9,5):

NaCl	100 mM
Tris	100 mM



Hybridisierungspuffer (Southern Blot):

Denhardt's-Lösung	50 ml
SDS	0,5 % (w/v)
SSPE-Puffer (20x)	300 ml

K-Puffer:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,15 M
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,15 M

LiAc/TE-Puffer (Y2H, pH 7,5):

Lithiumacetat	100 mM
Na <sub>2</sub> EDTA	0,5 mM
Tris	5,0 mM

LiAc/TE-Puffer+PEG (Y2H, pH 7,5):

Lithiumacetat	100 mM
PEG 3350	40 % (w/v)
Na <sub>2</sub> EDTA	0,5 mM
Tris	5,0 mM

Die Komponenten lösen sich erst beim Autoklavieren.

Maleinsäurepuffer (pH 7,5):

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

MN-Puffer:

MgSO <sub>4</sub>	120 mM
NaCl	255 mM

Neutralisierungspuffer (Southern Blot, pH 7,6):

NaCl	1,5 M
Tris	0,5 M

SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE, pH 8,3):

Glyzin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Tris	25 mM

SSPE-Puffer (20x, pH 7,4):

Na <sub>2</sub> EDTA	20 mM
NaCl	3,6 M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM

STC-Puffer (pH 8,0):

Sorbit	1,0 M
Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	1,0 M

TAE-Puffer 50x (pH 8,0):

EDTA	110 mM
Tris	2,0 M

Der pH-Wert von 8,0 wurde mit Essigsäure eingestellt.

TE-Puffer (pH 8,0):

Na <sub>2</sub> EDTA	1,0 mM
Tris	10 mM

Transferpuffer (Western Blot, pH 8,3):

Glyzin	192 mM
MeOH	200 ml
Tris	25 mM

Waschpuffer (Southern Blot):

Maleinsäurepuffer	100 ml
Tween <sup>®</sup> 20	0,5 % (v/v)

### 3.6 Kulturmedien

Die Fest- und Flüssigmedien zur Anzucht der in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen wurden vor Gebrauch 30 min bei einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 1,8 bar autoklaviert. Der jeweils benötigte pH-Wert wurde falls nicht anders angegeben mit HCl und NaOH eingestellt. Zu den Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2 % granulierter Difco™ Agar zugesetzt. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich alle Angaben auf ein Gesamtvolumen von 1 l H<sub>2</sub>O<sub>DE</sub>. Waren die Medien mit Aminosäuren, Antibiotika oder anderen Stammlösungen versetzt, wurden diese nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf < 50°C steril zugegeben.

AI-Medium (*Agrobacterium tumefaciens* Induktionsmedium):

Acetosyringonlösung (100 mM in DMSO)	100 µM (nur bei Festmedium benötigt)
Biotinlösung (0,01 % (w/v))	1,0 ml
CaCl <sub>2</sub> -Lösung (1 % (w/v))	1,0 ml
FeSO <sub>4</sub> -Lösung (0,01 % (w/v))	10 ml
Glukoselösung (20 % (w/v))	5,0 ml
Glyzerinlösung (50 % (w/v))	10 ml
K-Puffer	0,8 ml
MES-Lösung (1 M)	40 ml
MN-Puffer	20 ml
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> -Lösung (20 % (w/v))	2,5 ml
Spurenelementlösung 2	5,0 ml

Komplettmedium (CM, pH 6,5):

Bacto™ Casamino Acids	0,1 % (w/v)
Bacto™ Pepton	0,2 % (w/v)
Glukose	1,0 % (w/v)
Hefeextrakt Typ 695	0,1 % (w/v)
Nitratsalzlösung	50 ml
Spurenelementlösung 1	1,0 ml

LB-Medium (pH 7,4):

Bacto™ Trypton	1,0 % (w/v)
Bacto™ Yeast Extract	0,5 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)

LB+AIX:

Ampicillin	100 mg/l
IPTG	0,5 mM
X-Gal (in DMSO)	80 mg/l

LB+Amp:

Ampicillin	100 mg/l
------------	----------

LB+Kana:

Kanamycin	60 mg/l
-----------	---------

LB+Rif:

Rifampicin (in MeOH)	60 mg/l
----------------------	---------

LB+Kana+Rif:

Kanamycin	60 mg/l
Rifampicin (in MeOH)	60 mg/l

LB+Tet:

Tetracyclin (in EtOH)	50 mg/l
-----------------------	---------

Minimalmedium (MM, pH 6,5):

Biotinlösung (0,01 % (w/v))	250 µl
Glukose	0,1 % (w/v)
Nitratsalzlösung	50 ml
Spurenelementlösung 1	1,0 ml
Thiamindichloridlösung (1 % (w/v))	1,0 ml

MM+Cefo+GA+Strep:

Cefotaxim-Natrium	350 mg/l
Glufosinatammonium (Basta®)	50 mg/l
Streptomycin	200 mg/l

Das MM-Medium wurde mit 1 % (w/v) Glukose angesetzt.

PD-Medium:

Difco™ Potatoe Dextrose Broth	2,4 % (w/v)
-------------------------------	-------------

PD+Cefo+Hyg+Strep:

Cefotaxim-Natrium	350 mg/l
Hygromycin B	400 mg/l
Streptomycin	200 mg/l

REG-Medium:

Saccharose	1,0 M
Bacto™ Yeast Extract	0,1 % (w/v)
Casein	0,1 % (w/v)

SD ("selective dropout")-Medium (pH 5.8):

Hefe-Stickstoff-Basismedium (ohne AS)	1,0 % (w/v)
Glukose	2,0 % (w/v)

SD-Medium (ohne Leu):

Adenin-Hemisulfat	0,001 % (w/v)
Aminosäurelösung	10 ml
Histidin	0,005 % (w/v)
Tryptophan	0,01 % (w/v)

SD-Medium (ohne Trp):

Adenin-Hemisulfat	0,001 % (w/v)
Aminosäurelösung	10 ml
Histidin	0,005 % (w/v)
Leucin	0,01 % (w/v)

SD-Medium LS (ohne Leu, Trp):

Adenin-Hemisulfat	0,001 % (w/v)
Aminosäurelösung	10 ml
Histidin	0,005 % (w/v)

SD-Medium MS (ohne Leu, Trp, His):

Adenin-Hemisulfat	0,001 % (w/v)
Aminosäurelösung	10 ml

SD-Medium HS (ohne Leu, Trp, His, Ade):

Aminosäurelösung	10 ml
------------------	-------

SOB-Medium:

Bacto™ Yeast Extract	0,5 % (w/v)
KCl	2,5 mM
Mg <sup>2+</sup> -Lösung	10 ml
NaCl	10 mM
Trypton	2,0 % (w/v)

SOC-Medium (SOB-Medium):

Glukose	20 mM
SOB-Medium	ad 1,0 l

YPDA-Medium (pH 6,5):

Adenin-Hemisulfat	0,001 % (w/v)
Bacto™ Pepton	2,0 % (w/v)
Bacto™ Yeast Extract	1,0 % (w/v)
Glukose	2,0 % (w/v)

### 3.7 Plasmide

Nachfolgend aufgelistete Plasmide wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet. Die jeweiligen Sequenzen und weitere Informationen sind, falls nicht in dieser Arbeit angegeben, den Herstellern bzw. den Literaturverweisen zu entnehmen.

<i>pCAMB+BAR (SalI)</i>	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>pCAMB+HPT (HindIII)</i>	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>pCAMB+HPT (HpaI)</i>	Odenbach <i>et al.</i> , 2007
<i>pCAMB+HPT (SalI)</i>	Kramer <i>et al.</i> , 2009
<i>pCAMBIA0380</i>	CAMBIA, Canberra, Australien
<i>pCB1636</i>	Sweigard <i>et al.</i> , 1997
<i>pGADT7</i>	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<i>pGBKT7</i>	Takara Bio Europe/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
<i>pGEM®-T Easy</i>	Promega, Mannheim
<i>pJET1.2/blunt</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 3.8 Primer

Die in dieser Arbeit entworfenen Primer wurden mit dem Programm EditSeq überprüft und gegebenenfalls modifiziert. Zur Erhöhung der Effizienz der homologen Rekombination im Verlauf der Transformation von *M. oryzae* wurden die Primerpaare so gewählt, dass wenn möglich Bereiche von 500-1000 bp amplifiziert wurden, die den entsprechenden manipulierten Bereich im Genom flankieren. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine dem zu inaktivierenden Gen benachbarte Gensequenz durch das Rekombinationsereignis verändert wurde.

Die Primerpaare zur Herstellung der DNA-Sonden für die Southern Blot-Analysen wurden so entworfen, dass die amplifizierten DNA-Sonden eine Größe von 250 bp bis 400 bp haben und wenn möglich auf einem Abschnitt der codierenden Sequenz des zu inaktivierenden Gens hybridisierten. Die Primerpaare wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Auflistung der Primersequenzen ist in Anhang I zu finden.

### 3.9 Organismen

#### *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)

Stamm: *A. tumefaciens* AGL1, (ATCC, Manassas, USA)  
 Genotyp: AGL0recA::bla pTIPo542deltaT Mop+CbR (Lazo et al., 1991)

#### *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm: *E. coli* XL1-Blue (Stratagene®, La Jolla, USA)  
 Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]

#### *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*, anamorph: *Pyricularia oryzae*)

Stamm: *M. oryzae* 70-15 (Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, USA)

Der *M. oryzae* Wildtypstamm 70-15 (in dieser Arbeit als WT bzw. *MoWT* bezeichnet) wurde für die molekularbiologischen Arbeiten eingesetzt. Er war die Grundlage für die Isolierung genomischer DNA zur Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente und diente als Ausgangsstamm für die Transformationsversuche. *M. oryzae* wurde bei 26°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden auf CM kultiviert.

Falls nicht anders angegeben, wurden die Konidien immer von 11 Tage alten, bei 26°C auf CM gewachsenen *M. oryzae* Kulturen gewonnen, indem sie mit H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> mit Hilfe eines

Glasspatels dispergiert und über zweilagiges Miracloth filtriert wurden. Die Konidiensuspension wurde gegebenenfalls für 5 min bei RT mit 2900 x g zentrifugiert, um die Konidiendichte zu erhöhen.

Das Myzel wurde, falls nicht anders angegeben, mit Hilfe einer Vakuumflasche durch Filterpapiere über einen Büchnertrichter abfiltriert und so von der Kulturbrühe separiert.

## 4 ANGEWANDTE METHODEN

### 4.1 Molekularbiologie und Proteinbiochemie

#### 4.1.1 Manipulation von Genen

Bei der Inaktivierung von Genen wurde entweder ein Teil oder die ganze codierende Gensequenz (basierend auf genomischer DNA) durch ein Resistenzgen ersetzt (Deletionsmutagenese) oder die codierende Gensequenz durch Insertion eines Resistenzgens unterbrochen (Insertionsmutagenese). Die Daten zur Amplifikation der Fragmente aus genomischer DNA sowie die Strategien zur genetischen Manipulation für die Inaktivierung der Gene sind in Anhang I und II zu finden.

#### 4.1.2 Präparation von Nukleinsäuren

##### 4.1.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Myzel von *Magnaporthe oryzae*

Genomische DNA aus dem Myzel von *M. oryzae* Flüssigkulturen wurde mit Hilfe des „DNeasy® Plant Mini Kit“ nach Angaben des Herstellers präpariert. Die Kulturen wurden in 50 ml CM bei 26°C und 120 Upm für 4 Tage in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurde das Myzel von der Kulturbrühe separiert, lyophilisiert und in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert.

##### 4.1.2.2 Isolierung von RNA aus Myzel von *Magnaporthe oryzae*

Die Isolierung von RNA aus dem Myzel von *M. oryzae* erfolgte analog zu der Isolierung genomischer DNA. Nach Anzucht der Kulturen wurde das Myzel nach der Separation von der Kulturbrühe sofort in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und die RNA-Isolierung mittels des „RNeasy® Plant Mini Kit“ gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde mit 35 µl H<sub>2</sub>O<sub>RF</sub> eluiert.

##### 4.1.2.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *Escherichia coli*

Plasmid DNA aus *E. coli* wurde mit Hilfe des „GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit“ nach Angaben des Herstellers präpariert. Zuvor wurde eine Schüttelkultur von 5 ml in dem entsprechenden Selektionsmedium für 16 h bei 37°C und 220 Upm in einem Rundschtüttler inkubiert.



#### 4.1.2.4 Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten Nukleinsäuren wurde das NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Rocky River, USA) genutzt. Die Messung erfolgte durch UV/VIS Spektroskopie gemäß den Herstellerangaben mit einem Probenvolumen von 1,25 µl.

Der Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Böblingen) wurde genutzt, um die Qualität und Reinheit der isolierte Gesamt-RNA aus *M. oryzae* zu bestimmen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des „RNA 6000 Pico Kit“ nach Angaben des Herstellers. Es wurden nur Proben weiterverwendet, die keine im Chromatogramm sichtbaren Verunreinigungen beinhalten und deren „rRNA Ratio“ (28S/18S) zwischen 2,0 und 3,0 lag.

#### 4.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### 4.1.3.1 Amplifikation genomischer DNA

Die PCR wurde genutzt, um die Amplifikate der gewünschten Gensequenzen von genomischer DNA aus *M. oryzae* herzustellen. In Standard PCR Reaktionsansätzen wurde die DreamTaq™ DNA Polymerase sowie das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) verwendet. Für die Amplifikation von Produkten, die eine Größe von 5000 bp überschreiten, wurde der Long-PCR-Enzyme-Mix und für die Amplifikationen der Y2H-Studien sowie für die Komplementationsexperimente wurde die Phusion® Hot Start High Fidelity DNA Polymerase nach Angaben der Hersteller genutzt. Nach den Reaktionen wurden die Proben mit Orange Loading Dye versetzt, um eine Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese zu ermöglichen.

##### Standard PCR-Reaktionsansatz

dNTP's (10 mM)	1,0 µl
DreamTaq™ DNA Polymerase	1,0 µl
PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (10x)	5,0 µl
Primer forward (5 µM)	2,5 µl
Primer reverse (5 µM)	2,5 µl
Template-DNA	x µl (ca. 100 ng)
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50 µl

Zu Beginn wurde die genomische Template-DNA einmalig für 5 min bei 94°C denaturiert. Danach folgten 35 Zyklen der Abfolge Denaturierung (30 s), Anlagerung (30 s) und Elongation (x s, variiert je nach Amplifikatslänge und verwendeter Polymerase). Die Anlagerungstemperatur T<sub>A</sub> wurde für jeden Reaktionsansatz jeweils etwa 2°C unter der vom

Hersteller angegebenen Schmelztemperatur des Primerpaares gewählt. Nach 35 Zyklen erfolgte eine terminale Elongationsphase von 7 min.

#### 4.1.3.2 Amplifikation DIG-markierter DNA-Sonden

Die klonierten *pCAMBIA*-(Gen)-Inaktivierungsvektoren dienten als Template-DNA für die Amplifikation DIG-markierter DNA-Sonden zu den Hybridisierungsexperimenten des Southern Blot. Die DNA-Sonde wurde in einer PCR durch den Einbau DIG-markierter Nukleotide markiert. Diese Markierung ließ sich bei der Detektion im Verlauf der Southern Blot-Analyse mittels spezifischer Antikörper nachweisen.

#### PCR-Ansatz zur Herstellung von DIG-markierter DNA-Sonden

Digoxigenin-11-dUTP alkali lable	1,5 µl
dNTP's (10 mM)	1,0 µl
DreamTaq™ DNA Polymerase	1,0 µl
PCR-Puffer mit MgCl <sub>2</sub> (25 mM) (10x)	5,0 µl
Primer forward (5 µM)	2,5 µl
Primer reverse (5 µM)	2,5 µl
Template-DNA	x µl (ca. 10 ng/µl)
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50 µl

#### 4.1.3.3 Quantitative Real-Time PCR (q-PCR)

Die Expressionsanalysen mittels quantitativer „Real-Time PCR“ (q-PCR) wurden mit dem „iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green“ gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template für die cDNA-Synthese fungierte RNA, die aus dem Myzel von *M. oryzae*-Kulturen isoliert wurde, die synchron als Flüssigkulturen in CM bei 26°C mit 120 rpm inkubiert wurden, bis die freie Glukose im Medium verbraucht war. Die Experimente wurden am C1000™ Thermal Cycler (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt, die Quantifizierung erfolgte mit dem mathematischen Modell für die „relative Quantifizierung in real-time RT-PCR Experimenten“ (Pfaffl, 2001). Für die Effizienz der PCR wurde ein Wert von  $E = 1,85$  angenommen. Der in *M. oryzae* konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor EF1 $\alpha$  (MGG\_03641) wurde als Referenzgen für die relative Quantifizierung verwendet. Alle zur Amplifikation für die q-PCR Experimente benutzten Primer sind in Anhang I aufgelistet.

#### 4.1.4 Restriktion von Nukleinsäuren und Gelelektrophorese

Die folgenden Methoden der Restriktion und Gelelektrophorese bakterieller und pilzlicher DNA wurden in Anlehnung zu den allgemeinen Vorschriften von Green und Sambrook (2012) durchgeführt.

#### 4.1.4.1 Restriktion von DNA

Die Inkubationsdauer betrug 1,5 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Bei Nutzung von „FastDigest<sup>®</sup>“-Restriktionsenzymen wurde der Ansatz für 15 min bei der optimalen Temperatur für das jeweilige Enzym inkubiert.

##### Restriktionsansatz zu Analyse Zwecken

DNA	x µl (250-500 ng)
Enzypuffer (10x)	2,0 µl
Restriktionsenzym	1,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 20 µl

##### Restriktionsansatz zu Klonierungszwecken

DNA	x µl (1,0-1,5 µg)
Enzypuffer (10x)	10 µl
Restriktionsenzym	3,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 100 µl

##### Restriktionsansatz zur Vorbereitung auf Southern Blot-Analysen

DNA	x µl (5-10 µg)
Enzypuffer (10x)	20 µl
Restriktionsenzym	5,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 200 µl

Im Verlauf von Southern Blot-Analysen wurden bei der Restriktion 5-10 µg genomischer DNA von *M. oryzae* und den zu untersuchenden Transformanten eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

##### Dephosphorylierung von Schnittstellen

Nach der Restriktionsreaktion zu Klonierungszwecken wurden 3 µl SAP zu dem 100 µl Ansatz hinzugegeben und für 10 min bei 37°C dephosphoryliert, um unerwünschte Religationen der Vektorfragmente, die nur durch ein einziges Restriktionsenzym geöffnet wurden, zu vermeiden. Eine Denaturierung der Enzyme folgte für 15 min bei 65°C.

#### 4.1.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe von Agarosegelen (1 % Agarose in 1 x TAE-Puffer) in einer Standard Gelkammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Um die Fragmentgrößen abschätzen zu können, diente jeweils der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder als Referenz. Durch eine kurze Färbung von etwa 5 s in einer

Ethidiumbromidlösung (5 µg/ml) und eine Entfärbung von ca. 25 min im Wasserbad konnte die DNA unter UV-Licht (365 nm) dargestellt werden.

#### 4.1.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente, die aus PCR-Ansätzen oder Restriktionen entstanden sind, wurden nach der Agarose-Gelelektrophorese aus den Agarosegelen mit einem Skalpell entnommen und mit Hilfe des „NucleoSpin® Extract II“ nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit auf 70°C temperiertem H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>.

#### 4.1.5 Ligation

Die Ligationen erfolgten unter Verwendung der T4-DNA-Ligase gemäß den Angaben des Herstellers.

##### Standardligationsansatz

Vektor	x µl (ca. 50 ng)
Insert-DNA-Fragment	x µl (3- bis 6-fache Anzahl an Insert-Fragmenten)
Ligasepuffer (10x)	2,0 µl
T4-DNA-Ligase	1,0 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 20 µl

#### 4.1.6 Transformation von *Escherichia coli*

##### 4.1.6.1 Herstellung elektrokompeter *Escherichia coli*

Zur Präparation elektrokompeter Zellen wurde von einer Glycerinkultur des Stammes *E. coli* XL1-Blue ein Verdünnungsausstrich auf LB+Tet angefertigt und 48 h bei 37°C inkubiert. Gewachsene Kolonien wurden in 10 ml-Röhrchen mit 5 ml Flüssigmedium LB+Tet überführt und für 16-18 h bei 37°C in einem Rundschüttler mit 220 Upm inkubiert. Von dieser Kultur wurden 2 ml als Inokulum für 500 ml LB-Medium, welches mit 20 mM Glukose versetzt war, in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen genutzt. Dieser Ansatz wurde dann bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> = 0,6-0,8 erreicht war. Anschließend erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis sowie eine 15-minütige Zentrifugation bei 4°C und 2700 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> resuspendiert. Sowohl die Zentrifugation als auch das Resuspendieren in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> wurden einmal wiederholt. Nun wurde das Zellpellet mit 50 ml eiskalter 10 % (v/v) Glycerin-Lösung resuspendiert und bei 4°C für 10 min bei 2900 x g zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in 2 ml eiskalter 10 % (v/v) Glycerinlösung resuspendiert und

Aliquots von 80 µl Volumen in eiskalten 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt, welche direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### **4.1.6.2 Transformation von *Escherichia coli* durch Elektroporation**

Für die Transformation durch Elektroporation (Fiedler und Wirth, 1988) wurden die 80 µl Aliquots elektrokompenter *E. coli* XL1-Blue Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2,5 µl des Ligationsproduktes vermischt. Der Transformationsansatz wurde in eisgekühlte 1 mm-Elektroporationsküvetten übertragen und mit Hilfe des Gene Pulser II (Biorad, München) durch einen elektrischen Impuls behandelt. Hierbei wurde eine Feldstärke von 12,5 kV/cm eingestellt und Zeitkonstanten von 4-4,5 ms gemessen. Die Einstellung des Gene Pulser II betrug 1,3 kV, 25 µF und 200 Ω. Anschließend wurden die *E. coli* XL1-Blue Zellen vorsichtig in 300 µl SOC-Medium aufgenommen, in 10 ml-Röhrchen überführt und eine Stunde bei 37°C und 220 Upm auf dem Rundschtüttler inkubiert. Die Kultur wurde je nach eingebrachter Resistenz auf Selektionsplatten mit Antibiotikum überführt und für 16-18 h bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Analyse der Transformanten wurde von einzelnen Kolonien Plasmid DNA isoliert und durch Restriktionsanalysen überprüft.

#### **4.1.7 Transformation von *Magnaporthe oryzae***

##### **4.1.7.1 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens***

Von einer Glyzerinkultur des Stamms *A. tumefaciens* AGL1 wurde ein Verdünnungsausstrich auf LB+Rif Festmedium angefertigt und 2-4 Tage bei 28°C in Dunkelheit inkubiert. Folgend wurden mehrere Kolonien in 5 ml LB+Rif Flüssigmedium überführt. Diese wurden bei 28°C für 16 h und 225 Upm inkubiert. Die Kultur wurde als Inokulum für 500 ml LB-Medium in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen verwendet. Der so entstandene Ansatz wurde bei 28°C und 220 Upm im Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Danach wurde er bei 4°C und 2700 x g 15 min zentrifugiert und das Pellet einmal in 100 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen. Nach einem weiteren zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 4°C und 2900 x g wurde das Zellpellet in 2,5 ml einer 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und Aliquots von 100 µl in eiskalten 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt, die direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

##### **4.1.7.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* mittels Heat-Shock**

Zur Transformation der kompetenten *A. tumefaciens* AGL1-Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und 500 ng des entsprechenden *pCAMBIA*-(Gen)-Inaktivierungsvektors zugege-

ben. Anschließend folgte für 5 min eine Inkubation im 37°C warmen Wasserbad und eine erneute Lagerung auf Eis. Danach wurden 400 µl LB-Flüssigmedium zugegeben und der Ansatz 4 h bei 28°C in dem Schüttelinkubator mit 225 Upm inkubiert. Schließlich wurden 150 µl der Zellsuspension auf LB+Kana+Rif Selektionsmedium überführt und in Dunkelheit bei 28°C für 3 Tage inkubiert.

#### **4.1.7.3 Transformation von *Magnaporthe oryzae* mittels *Agrobacterium tumefaciens***

Die transformierten und auf dem Selektionsmedium gewachsenen *A. tumefaciens* AGL1 Zellen wurden als Inokulum für eine 5°ml LB+Kana+Rif Flüssigkultur genutzt. Die Inkubation erfolgte 16 h bei 28°C und 225 Upm in dem Schüttelinkubator. Danach wurden 1,5 ml der Kultur bei 2300 x g für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 750 µl AI-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 10 ml Zentrifugenröhrchen mit 4 ml AI-Medium verdünnt und bei 28°C sowie 225 Upm für 6 h in dem Schüttelinkubator inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden Konidien von *M. oryzae* auf eine Konzentration von 10<sup>5</sup> Konidien/ml in H<sub>2</sub>O eingestellt. Diese Konidiensuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit der transformierten *A. tumefaciens* AGL1 Zellsuspension vermischt. Von dem Ansatz wurden 400 µl auf den Rand eines sterilen Nitrozellulose-Filters auf AI-Festmedium gegeben und nach dem Trocknen 48 h bei 28°C in Dunkelheit inkubiert. Es folgte der Transfer der Nitrozellulose-Filter auf Selektionsmedium (MM+Cefo+GA+Strep oder PD+Cefo+Hyg+Strep) und eine erneute Inkubation für 4-12 Tage bei 28°C. Danach wurden Einzelkolonien der Transformanten vom Filterrand auf Selektionsplatten übertragen und bei 28°C inkubiert. Gut gewachsene Kolonien wurden auf CM überführt. Von diesen Transformanten wurde abschließend genomische DNA isoliert sowie eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

#### **4.1.7.4 Protoplastentransformation von *Magnaporthe oryzae***

*M. oryzae* wurde 4 Tage lang als Flüssigkultur in 50 ml CM bei 26°C und 120 Upm inkubiert. Dieser Ansatz wurde steril in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 2900 x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands wurde die Lyse der Zellwände mit lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum* (3 mg/ml Endkonzentration) in 20 ml einer 20 % (w/v) Saccharoselösung 60 min lang auf einem Kippschüttler durchgeführt. Daraufhin wurden die Ansätze mikroskopisch überprüft, nach erfolgter Protoplastierung durch zweilagiges Miracloth filtriert und für 10 min mit 1500 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und das Pellet in 20 ml STC-Puffer resuspendiert. Anschließend folgte eine 15-minütige Zentrifugation mit 1500 x g bei 4°C und das Protoplastenpellet wurde schließlich in 1 ml STC-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurden je 100 µl in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 1,5 µg linearisierter

Plasmid-DNA zugegeben und 30 min bei 4°C auf einem Kippschüttler gemischt. Hiernach wurde 1 ml PEG-Lösung zugesetzt und abermals für 20 min bei RT auf dem Kippschüttler inkubiert. Nach dem Zufügen von 10 ml von auf 45°C temperiertem REG-Medium, wurde das Gemisch auf REG-Festmedium (inklusive 100 µg/ml Glufosinatammonium) gegeben und 14 Tage bei 26°C inkubiert.

Danach wurden Einzelkolonien der Transformanten auf entsprechende Selektionsplatten übertragen. Kolonien der so gewachsenen Transformanten wurden auf CM überführt. Abschließend wurde genomische DNA isoliert sowie eine Southern Blot-Analyse durchgeführt.

#### **4.1.8 Southern Blot-Analyse**

Mit der Southern Blot-Analyse nach Green und Sambrook (2012) wurde die korrekte Manipulation der ausgewählten Gene im Genom der Transformanten von *M. oryzae* überprüft. Nachfolgend beschriebene Abweichungen wurden im Vergleich zur Standardmethode vorgenommen.

##### **4.1.8.1 Isolation, Restriktion und Fällung genomischer DNA**

Genomische DNA von *M. oryzae* wurde, wie zuvor beschrieben, isoliert und ein Restriktionsansatz zur Vorbereitung auf Southern Blot-Analysen durchgeführt. Danach wurden zur Fällung der DNA 10 % (v/v) einer 3 M Natriumacetatlösung und 200 % (v/v) EtOH *p.a.* zugegeben. Der Ansatz wurde bei -20°C für 1 h inkubiert und anschließend für 30 min bei 4°C und 11500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete Pellet in 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> aufgenommen.

##### **4.1.8.2 Transfer der Nukleinsäuren auf die Nylonmembran**

Die gefällte genomische DNA aus *M. oryzae* wurde in einem 1 % Agarosegel bei konstanter Spannung von 90 V aufgetrennt. Als Größenstandard wurde dabei der entsprechende DIG-markierte DNA Molecular Weight Marker verwendet. Nach der Auftrennung wurde das Agarosegel zur Depurinierung der DNA für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Anschließend wurde die DNA zur Trennung der Doppelstränge je zweimal für 15 min in Southern Blot-Denaturierungspuffer und darauffolgend in Southern Blot-Neutralisierungspuffer geschwenkt. Zwischen jedem Pufferwechsel wurde das Agarosegel kurz in H<sub>2</sub>O<sub>DE</sub> gewaschen.

Der Southern Blot wurde als Kapillar-Blot nach der Standardvorschrift (Green und Sambrook, 2012) aufgebaut. Über Nacht wurden beim Ansaugen des SSPE-Puffers die denaturierten

DNA-Fragmente durch die Kapillarkräfte von dem Agarosegel auf die Transfermembran Roti® Nylon Plus übertragen. Am nächsten Tag wurde die übertragene DNA mit einem UV-Crosslinker (FLX-20M, Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) mit der Nylonmembran quervernetzt. Dazu wurde ein 40-sekündiger kontinuierlicher Gradient der Energiedichte von  $0,120 \text{ J/cm}^2$  gegen  $0 \text{ J/cm}^2$  eingestellt.

#### 4.1.8.3 Hybridisierung mit der DNA-Sonde

Die Nylonmembran mit der gebundenen DNA wurde für 1,5 h bei  $65^\circ\text{C}$  in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungssofen (Shake'n'Stack, Hybaid GmbH) in 20 ml Hybridisierungspuffer mit  $40 \mu\text{l}$  Salmon Sperm DNA ( $10 \text{ mg/ml}$  in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}}$ ) inkubiert. Die Doppelstränge der Salmon Sperm DNA wurden zuvor 5 min lang bei  $95^\circ\text{C}$  getrennt und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Puffer durch 20 ml Hybridisierungspuffer, welcher mit  $500 \text{ ng}$  der entsprechenden DNA-Sonde versetzt wurde, ausgetauscht. Die DNA-Proben von *M. oryzae* und den Transformanten wurden mit einer identischen DNA-Sonde behandelt. Zuvor wurde die DNA-Sonde 5 min lang bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Im Hybridisierungssofen folgte über Nacht die Hybridisierungsreaktion bei  $65^\circ\text{C}$ . Bei Raumtemperatur wurde am nächsten Tag die Nylonmembran zweimal für 15 min in  $25 \text{ ml } 2 \times \text{SSPE} + 0,1 \% \text{ (w/v) SDS}$  und anschließend zweimal für 15 min in  $0,2 \times \text{SSPE} + 0,1 \% \text{ (w/v) SDS}$  bei  $65^\circ\text{C}$  gewaschen.

#### 4.1.8.4 Detektion der DNA-Sonde

Die Detektion der gebundenen DNA-Sonde erfolgte bei RT. Die Nylonmembran wurde im Hybridisierungssofen für 1 min in  $50 \text{ ml}$  Waschpuffer inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Nylonmembran für mindestens 30 min in  $100 \text{ ml}$  Blockpuffer inkubiert, der anschließend mit  $20 \text{ ml}$  Antikörperlösung ausgetauscht wurde. Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase, in welcher durch die am Antikörper gebundenen Fab-Fragmente die Bindung an die DIG-markierte DNA-Sonde erfolgt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch zwei Waschschrte von 15 min in  $50 \text{ ml}$  Waschpuffer entfernt und es folgte eine abschließende Inkubation für 3 min in  $20 \text{ ml}$  Detektionspuffer. Nach dem Abschütten des Detektionspuffers wurde die Nylonmembran in eine Kunststoffolie gelegt,  $1,5 \text{ ml}$  CSPD-Lösung gleichmäßig zugegeben und diese in der Kunststoffolie eingeschweißt. Daraufhin wurde eine 15-minütige Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt, wobei die am Antikörper gebundene alkalische Phosphatase das CSPD unter Freisetzen eines Chemolumineszenzsignals dephosphoryliert. Die verschweißte Folie wurde wieder geöffnet, die CSPD-Lösung komplett ausgestrichen und die Membran wieder eingeschweißt. Anschließend wurde die Nylonmembran unter Rotlicht in einer Expositionskassette befestigt und ein Röntgenfilm eingelegt. Je nach Signalintensität der



Chemolumineszenzreaktion wurde 0,5-1 h bei Raumtemperatur belichtet. Die Entwicklung des Filmes erfolgte im AGFA CP-1000 (AGFA Healthcare GmbH, Bonn).

#### 4.1.9 Western Blot-Analyse

Mit der Western Blot-Analyse (Burnette, 1981) wurde die Aktivierung des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* überprüft. Die Phosphorylierung der MAPK MoHog1p wurde mit Hilfe des „Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP™ Rabbit mAB“ und des „Phototope®-HRP Western Blot Detection Systems“ untersucht.

##### 4.1.9.1 Kultivierung, Zellaufschluss und Proteinisolierung

*M. oryzae* wurde als Flüssigkultur in CM inkubiert. Jeweils 5 ml CM wurden mit der gleichen Menge an Konidien ( $10^3$  Konidien/ml im Testansatz) oder Myzel (jeweils 3 Rondelle, Ø 4 mm) inokuliert und bei 26°C und 120 Upm für 4 Tage in 6-Loch-Zellkulturplatten inkubiert. Nach 65 h wurden die synchron gewachsenen Kulturen in 15 ml Röhrchen überführt und für 10 min mit den zu analysierenden Reagenzien auf einer Schwenkplattform inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen bei 4°C und 2900 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellett wurde mit 300 µl Zellaufschlusslösung versetzt, in Ribulizer Tubes überführt und für 10 min bei 99°C erhitzt. Diese Ribulizer Tubes sind 2 ml Reaktionsgefäße (mit Schraubverschluss), die zu 1/3 mit Glasperlen (Ø 0,75-1 mm sowie Ø 1,7-2 mm) gefüllt wurden. Um die Zellwände vollständig aufzubrechen, wurden die Ansätze 30 s lang bei 6,0 Hz mit dem Fast Prep FP120 (Thermo Savant, Illkirch, France) behandelt. Abschließend wurde der Ansatz bei 4°C und 11500 x g für 5 min zentrifugiert. Gleiche Mengen des Überstands wurden für die SDS-PAGE verwendet.

##### 4.1.9.2 SDS-PAGE

Die Proteinseparation nach Proteingröße erfolgte mit Hilfe der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970). Das Sammel- und das Trenngel wurden in der folgenden Zusammensetzung verwendet:

###### Sammelgel

APS-Lösung (10 % (w/v))	50 µl (0,05 % (w/v))
Rotiphorese®-Gel 40 (29:1)	1,0 ml (4 % (v/v))
SDS-Lösung (10 % (w/v))	0,1 ml (0,1 % (w/v))
TEMED	10 µl (0,1 % (v/v))
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	1,25 ml (125 mM)
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 10,0 ml

Trenngel

APS-Lösung (10 % (w/v))	50 µl (0,05 % (w/v))
Rotiphorese®-Gel 40 (29:1)	3,0 ml (12 % (v/v))
SDS-Lösung (10 % (w/v))	0,1 ml (0,1 % (w/v))
TEMED	10 µl (0,1 % (v/v))
Tris-HCl (1 M, pH 8,8)	3,75 ml (375 mM)
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 10,0 ml

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in SDS-Laufpuffer in einer Mini PROTEAN™-Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA/Gel (maximale Spannung 200 V). Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder sowie der im „Phototope®-HRP Western Blot Detection System“ enthaltene Biotinylated Protein Ladder verwendet.

**4.1.9.3 Elektroblothing**

Der Transfer der Proteine wurde nach der Auftrennung mittels SDS-PAGE auf die Transfermembran Roti®-NC (0,2 µm) in Transferpuffer durch Elektroblothing durchgeführt. Die Mini Trans-Blot® Electrophoretic Cell (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurde nach Angaben des Herstellers verwendet und der Elektrotransfer für 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V durchgeführt.

**4.1.9.4 Detektion der Proteine**

Nach dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte die Inkubation der Proteine mit dem primären Antikörper Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP™ Rabbit mAB und den sekundären Antikörpern (HRP-linked anti-rabbit IgG und HRP-linked anti-biotin) sowie die Detektion mittels des „Phototope®-HRP Western Blot Detection System“ nach Angaben der Hersteller. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran unter Rotlicht in einer Expositionskassette befestigt und ein Röntgenfilm eingelegt. Je nach Signalintensität der Chemolumineszenzreaktion wurde 5-15 min bei Raumtemperatur belichtet. Die Entwicklung des Filmes erfolgte im AGFA CP-1000 (AGFA Healthcare GmbH, Bonn).

**4.1.10 Yeast Two-Hybrid (Y2H)-Analyse**

Mit dem Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 konnten *in vivo* Proteininteraktionen der Komponenten des Phosphorelaysystems im HOG-Signalweg von *M. oryzae* untersucht werden. Die Klonierungsstrategien und Primer zur Konstruktion der „bait“ und „prey“ Yeast Two-Hybrid-Vektoren für die Expression von MoYpd1p, MoHik1p, MoSln1p und MoSsk1p sind in Anhang II zu finden. Mit cDNA bzw. gDNA der codierenden Sequenzen aller zu untersuchen-

den Proteine wurden sowohl „bait“- als auch „prey“-Expressionsvektoren generiert. Restriktionsschnittstellen wurden in die Sequenzen der Primer integriert, welche die Fusion der amplifizierten Fragmente „in frame“ in den ORF (open reading frame) der DNA-Binde- oder Aktivierungsdomäne von Gal4p in den Vektoren *pGBKT7* und *pGADT7* ermöglichen. Die cDNA-Synthese wurde mit dem „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template diente dabei RNA aus dem Myzel von *M. oryzae*-Kulturen.

#### 4.1.10.1 Maxipräparation der Yeast Two-Hybrid-Vektoren

Kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen wurden durch Elektroporation mit den generierten Yeast Two-Hybrid-Vektoren transformiert und auf den entsprechenden LB-Selektionsmedien inkubiert. Die Transformanten wurden in 10 ml-Röhrchen mit 5 ml des entsprechenden LB-Selektionsmediums überführt und auf dem Schüttelinkubator bei 37°C und 220 Upm für 16-18 h inkubiert. Von dieser Kultur wurden 2 ml als Inokulum für 50 ml LB-Medium+Antibiotikum in 100 ml Erlenmeyerkolben verwendet und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei RT für 10 min bei 2900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml SOL 1-Lösung resuspendiert, um die Zellen zu lysieren. Anschließend wurden 10 ml SOL 2-Lösung zur Denaturierung der DNA zugegeben und die Reaktion nach 5 min mit 7,5 ml SOL 3-Lösung neutralisiert. Der Ansatz wurde bei RT für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert, der Überstand mit einem Volumen Isopropanol versetzt und bei RT für 10 min inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 min Dauer bei 12500 x g wurde das Zellpellet in 1 ml TE-Puffer (+40 µg/ml RNase A) resuspendiert und in einem 2 ml Reaktionsgefäß für 20 min bei 37°C inkubiert. Auf die Zugabe von 1 ml Chloroform folgte ein erneutes Zentrifugieren für 5 min bei 6600 x g. Die obere Phase wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, im Vakuumkonzentrator eingedampft und das Plasmidpellet in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> resuspendiert. Anschließend wurde in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> die gewünschte Konzentration eingestellt.

#### 4.1.10.2 Herstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae* und PEG/LiAc-Transformation

Die Herstellung von kompetenten *S. cerevisiae*-Zellen erfolgte ebenso wie die PEG/LiAc-vermittelte Transformation von *S. cerevisiae* nach modifizierten Protokollen (Ito *et al.*, 1983; Schiestl und Gietz, 1989; Hill *et al.*, 1991; Gietz *et al.*, 1992) des Herstellers. Der mit dem Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid System 3 mitgelieferte Stamm AH109 wurde für die Studien verwendet. Um falsch positive Ergebnisse zu minimieren, wurden sowohl die Doppeltransformationen von „bait“- und „prey“-Vektoren zur Untersuchung von

Proteininteraktionen als auch eine Einzeltransformation für jedes Konstrukt durchgeführt. Des Weiteren wurden die Positiv- und Negativkontrollen gemäß der Herstellerangaben ausgeführt.

## **4.2 Phänotypische Untersuchungen von *Magnaporthe oryzae***

### **4.2.1 Konidiogenese**

Die Konidiogenese der Mutantenstämme wurde mit der des WTs verglichen. Die Konidien von einer 25 cm<sup>2</sup> Fläche 11 Tage alter Kulturen wurden mit 15 ml H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> dispergiert und über zweilagiges Miracloth filtriert. Dreimal wurde die Konidienzahl pro Kultur auf einer Agarplatte von je 5 Replikaten mit einer Zählkammer (Neubauer improved, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) ermittelt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Form der Konidien wurde mikroskopisch untersucht und dokumentiert.

### **4.2.2 Wachstum auf verschiedenen Festmedien**

Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde im Vergleich zu dem Wachstum von Kulturen von *M. oryzae* untersucht, um erste Anhaltspunkte für mögliche Funktionen der inaktivierten Gene bzw. deren Genprodukte zu erhalten. Ausgangsmaterial für die Wachstumstests waren Rondelle (Ø 5 mm) der zu untersuchenden Stämme. Die Inkubation erfolgte auf CM oder MM unter der Zugabe von den zu untersuchenden Reagenzien in für den WT subletalen Mengen für 10 Tage bei 26°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h (oder bei Bedarf in kompletter Dunkelheit). Abschließend wurde der Koloniedurchmesser von jeweils fünf Replikaten vermessen. Dieser Test wurde dreimal wiederholt.

Bei den Tests zur Wirkung von Fludioxonil (gelöst in EtOH) wurde das Phenylpyrrol in das Kulturmedium gegeben und die Kulturen für 7 Tage bei 26°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h inkubiert.

### **4.2.3 Appressorienbildung**

Die Bildung der Infektionsstrukturen während des Keimungsprozesses wurde sowohl auf hydrophiler als auch auf hydrophober Oberfläche untersucht. Konidien von *M. oryzae*-Kulturen wurden auf eine Konidiendichte von 5 x 10<sup>4</sup> Konidien/ml in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> eingestellt. 100 µl Tropfen dieser Konidien suspension wurden auf hydrophobe Deckgläser aufgebracht und in

einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Nach 16 h wurde die Anzahl an Appressorien der gekeimten Konidien bestimmt. Auf hydrophilen Objektträgern wurden ebenfalls 100 µl dieser Konidien suspensionen ausgebracht. Als chemischer Induktor für Appressorienbildung wurde 500 ng/ml 1,16-HDD (gelöst in MeOH) appliziert und die Konidien für 16 h bei RT inkubiert. Es wurden drei Wiederholungen mit je fünf Replikaten ausgewertet.

#### 4.2.4 Zytorrhysetest zur indirekten Turgorbestimmung im Appressorium

Zur indirekten Turgorbestimmung in den Appressorien wurden Konidien von *M. oryzae*-Kulturen auf eine Konidiendichte von  $5 \times 10^4$  Konidien/ml in  $H_2O_{UF}$  eingestellt. Von dieser Konidien suspension wurde 1 ml in die Vertiefungen einer 24-Loch Platte überführt, die Appressorienbildung wurde mit 500 ng/ml 1,16-HDD (gelöst in MeOH) induziert. Anschließend wurden die Ansätze für 16 h bei RT inkubiert, wobei sich die Konidien absetzten und der Keimungsprozess ebenso wie die Appressorienbildung erfolgte. Das  $H_2O_{UF}$  wurde danach durch 500 µl verschiedener Glycerinlösungen (1 M - 4 M) ersetzt, woraufhin nach 3 min die kollabierten Appressorien unter dem Mikroskop bestimmt werden konnten. Insgesamt wurden drei Wiederholungen mit je fünf Replikaten ausgewertet.

#### 4.2.5 Protoplastentest zur Ermittlung der Zellwandstabilität

Untersuchungen zur Stabilität der Zellwand von *M. oryzae* wurden mit Kulturen durchgeführt, die zuvor in 50 ml CM bei 26°C und 120 Upm für vier Tage in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert wurden. Nach dem Separieren von der Kulturbrühe wurden 2 g Myzel in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Myzel wurde zweimal mit 20 ml einer 20 % (w/v) Saccharoselösung gewaschen und dazwischen bei RT für 10 min mit 2900 x g zentrifugiert. Die Lyse der Zellwände wurde mit lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum* (3 mg/ml Endkonzentration) in 20 ml einer 20 % (w/v) Saccharoselösung für 60 min auf einem Kippschüttler durchgeführt. Danach wurden die Lysate durch zweilagiges Miracloth filtriert und für 10 min mit 2900 x g zentrifugiert. Die Protoplastenpellets wurden schließlich vorsichtig in 1 ml einer 20 % (w/v) Saccharoselösung resuspendiert und die Anzahl der Protoplasten unter dem Mikroskop bestimmt. Drei Wiederholungen mit je fünf Replikaten wurden ausgewertet.

#### 4.2.6 Pathogenitätstest mit Reispflanzen und Wachstum *in planta*

Die Infektionsfähigkeit der *M. oryzae*-Kulturen wurde mit Pflanzentests auf Reispflanzen überprüft. Mit einer Sprühflasche wurde eine 5 ml- Konidien suspension mit  $5 \times 10^4$  Konidien/ml in  $H_2O_{UF}$  + 0,2 % (w/v) Gelatine auf 21 Tage alte Reispflanzen (Kultivar

CO39) gesprüht. Danach wurden die infizierten Pflanzen in verschließbaren Kordelzugbeuteln für 72 h bei 28°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h in einer Pflanzentestkammer (Versatile Environmental Test Chamber MLR-350H, Sanyo Electric Co., München) inkubiert. Darauffolgend wurden die Läsionen pro Blatt bei den fünf am stärksten infizierten Blättern ausgezählt und dokumentiert. Dreimal wurden je fünf Replikate ausgewertet.

Das Wachstum *in planta* wurde auf verwundeten Blättern von Reis überprüft. Dazu wurde die Kutikula von Blattsegmenten 21 Tage alter Reispflanzen (Kultivar CO39) mit feinem Sandpapier verwundet und 10 µl einer Konidiensuspension mit  $5 \times 10^4$  Konidien/ml in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{UF}} + 0,2 \%$  (w/v) Gelatine appliziert. Die Blattsegmente wurden auf 2 % (w/v) Wasseragar bei 28°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h in der Pflanzentestkammer inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach 72 h.

## 4.3 Datenbearbeitung und Ergebnisdokumentation

### 4.3.1 Identifikation und Analyse von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Der „*Magnaporthe* comparative Database“ des Broad Instituts wurden die Informationen zu den Nukleotid- sowie Aminosäuresequenzen der zu bearbeitenden Gene und Proteine von *M. oryzae* entnommen (*Magnaporthe* comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT, <http://www.broadinstitute.org/>, Annotation *M. oryzae* 70-15 MG8).

Der „*S. cerevisiae* WU-BLAST2 Search“ Algorithmus der „*Saccharomyces* Genome Database“ (SGD, <http://www.yeastgenome.org/>) und die Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information) unter Verwendung des Tools „blastp“ (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool) wurden für die Identifikation der Aminosäuresequenzen und Domänen eingesetzt. Homologien zwischen den Proteinen von *M. oryzae* und *S. cerevisiae* wurden über die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz mit „blastp suite“ von der NCBI Datenbank berechnet. Bei den „Scoring parameters“ wurde mit der Matrix „BLOSUM62“ gearbeitet.

Die „CDD database“ des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) und die Database „InterProScan Sequence Search“ (EMBL-European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) wurden verwendet, um Proteinsequenzen bzw. Proteindomänen zu vergleichen und zu klassifizieren. Die Angabe der Domänen-IDs

(Zugangsnummern) bezieht sich auf die Klassifikation mit der „Pfam 27.0 database“ (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) oder der „CDD database“.

Der „TMHMM Server v 2.0“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) und der „DAS (dense alignment surface) transmembrane prediction server“ (Czerzo *et al.*, 1997) ermöglichten die Suche nach Transmembrandomänen.

### 4.3.2 Phylogenetische Gruppierung der Sequenzen von Histidinkinasen

Zur phylogenetischen Analyse der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen wurde nur mit den Proteinsequenzen aus den ausgewählten Organismen gearbeitet, die nach Berechnungen der „Pfam 27.0 database“ je eine Histidinkinase-Domäne (HisKA-Domäne, PF00512), eine Histidin-ATPase-Domäne (HATPase, PF02518) und eine regulatorische Domäne (REC Domäne, PF00072) haben.

Die phylogenetische Analyse wurde mit dem Programm MEGA 5.2 durchgeführt (Tamura *et al.*, 2011). Die gefundenen Proteinsequenzen wurden einem "multiple sequence alignment" mittels des ClustalW-Programms unterzogen (Larkin *et al.*, 2007), wobei folgende Parameter eingestellt wurden. Als „cost matrix“ wurde „BLOSUM“ verwendet, mit „gap open cost“: 10 und „gap extend cost“: 0.1. Die Konstruktion des phylogenetischen Baums erfolgte mittels des „neighbor-joining“-Algorithmus mit Standardeinstellungen unter Verwendung des Jones-Taylor-Thornton (JTT)-Modells für die Berechnung einer Distanzmatrix (Saitou und Nei, 1987; Jones *et al.*, 1992). Für die Evaluierung der Güte der berechneten phylogenetischen Inferenz und um Konfidenzwerte für die Baumtopologie zu erhalten, wurde eine Bootstrap-Analyse mit 1000 Replikaten durchgeführt. Der auf diese Weise gefundene Konsensusbaum wurde dazu verwendet, um die evolutionäre Verwandtschaft der analysierten „operational taxonomic units“ (OTUs) zu repräsentieren (Felsenstein, 1985). Die Visualisierung des resultierenden Dendogramms erfolgte ebenfalls mit Hilfe von MEGA 5.2.

Insgesamt wurden 113 Proteinsequenzen zur Datenanalyse eingesetzt. Die Sequenzen der verschiedenen Proteine wurden – wenn möglich – mit der Zugangsnummer der verwendeten Datenbank und dem in der Literatur verwendeten Trivialnamen benannt. Falls die Sequenz noch nicht näher beschrieben bzw. kein Trivialname zu finden war, wurde nur die jeweilige Zugangsnummer angegeben. In jedem Fall wurde der erste Buchstabe von Gattung und Art vor jede Bezeichnung gesetzt, um die Zuordnung zu erleichtern. Zum Beispiel ist Sln1p aus *S. cerevisiae*: Sc (YIL147C) [Sln1p]. Eine Tabelle mit den Zugangsnummern und verwendeten Datenbanken aller für die Analysen verwendeter Sequenzen sowie die Domänenvisualisierungen sind in Anhang I zu finden. Eine Außengruppe zur Kontrolle in

Form der Proteinsequenz einer Sensor-HIK aus dem Bakterium *E. coli* vervollständigte die zu analysierenden Sequenzen (NCBI Protein-ID: WP\_00120580). Die Visualisierung der Daten erfolgte mit dem Programm Geneious 6.1.7. Die integrierte Suche nach den Domänen erfolgte in der „InterPro-Datenbank“ mittels „InterProScan“ bzw. in den „PFAM-, SMART und PRINTS-Datenbanken“, wobei letztere Bestandteile der „InterPro-Datenbank“ sind. Diese bioinformatischen Methoden und Visualisierungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dipl.-Biol. Alexander Yemelin durchgeführt.

#### **4.3.3 Programme zur Planung und Kontrolle der Klonierungsschritte**

„EditSeq“ (Software-Paket Lasergene<sup>®</sup>, DNASTAR, Madison, USA) wurde zur Überprüfung und gegebenenfalls zur Modifikation der entworfenen Primer verwendet. Auch bei der Planung und Kontrolle der einzelnen Klonierungsschritte der Inaktivierungs- und Expressionsvektoren kam EditSeq zum Einsatz.

„pDRAW32“ (Kjeld Olesen, AcaClone Software) diente zur Darstellung und Bearbeitung von DNA-Sequenzen sowie zur Auswahl geeigneter Restriktionsenzyme der einzelnen Klonierungsschritte.

Mit „Quantum ST4“ (Vilber Lourmat, Eberhardzell) wurden die am „Peqlab Quantum 1100“ (Peqlab, Erlangen) dokumentierten Agarosegele ausgewertet.

„CFX Manager™ 2.1“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurde genutzt, um die Rohdaten der quantitativen RT-PCR Experimente umzurechnen.

#### **4.3.4 Mikroskopie und Dokumentation**

Mit Hilfe des „Peqlab Quantum 1100“ (Peqlab, Erlangen) Geldokumentationssystems wurden die Agarosegele dokumentiert und ausgewertet.

Das Mikroskop „Zeiss Axio Imager.M2“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) sowie das Stereo-Mikroskop „Stemi 2000-C“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) kamen für die mikroskopischen Untersuchungen zum Einsatz.

Fotografische Dokumentationen wurden mit der Digitalkamera „Canon PowerShot G2“ (Canon Inc., Japan) durchgeführt.



## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Der HOG-Signalweg in *Magnaporthe oryzae*

Der erste Teil dieser Untersuchungen adressiert den „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg in *M. oryzae*. Obwohl dieser als Target kommerzieller Fungizide wie Fludioxonil oder Iprodion gilt (Motoyama *et al.*, 2005a) ist die bisherige Beschreibung des Signalwegs in *M. oryzae* und dabei insbesondere die des Phosphorelaysystems unzureichend. Der genaue Wirkmechanismus der Fungizide innerhalb des Phosphorelaysystems ist deshalb noch nicht verstanden. Wissenschaftliche Arbeiten zu dem putativen Phosphotransferprotein MoYpd1p und dessen Funktion in *M. oryzae* sind bisher in der Literatur nicht dokumentiert, könnten aber einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis des fungiziden Wirkmechanismus leisten.

Verglichen mit dem sehr gut beschriebenen HOG-Signalweg in *S. cerevisiae* hat das Phosphorelaysystem in *M. oryzae* eine größere Anzahl an Komponenten und damit einhergehend eine höhere Komplexität. Während es in Hefe nur eine einzige HIK Sln1p gibt, sind in *M. oryzae* mindestens die beiden HIKs MoSln1p und MoHik1p bei den Signalprozessen im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs beteiligt. Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass die Signalkaskade in *M. oryzae* funktionell anders aufgebaut ist als in *S. cerevisiae*.

Anhand der relevanten Literatur wurden Informationen über bereits bekannte Proteine des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* zusammengetragen. Die Mutante  $\Delta$ Mosk1 wurde als vermindert virulent beschrieben (Motoyama *et al.*, 2008) und  $\Delta$ Mosln1 als apathogen (Zhang *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu haben die Mutanten  $\Delta$ Mohog1 (auch als  $\Delta$ osm1 bekannt, Dixon *et al.*, 1999) sowie  $\Delta$ Mohik1 die Fähigkeit zur Infektion der Wirtspflanze nicht verloren (Motoyama *et al.*, 2005b). Angaben über die Mutantenstämme  $\Delta$ Moypd1,  $\Delta$ Mosk2 und  $\Delta$ Mopbs2 waren in der Literatur nicht zu finden.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Mutanten des HOG-Signalwegs wurden am Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF) generiert und charakterisiert. Die Klonierungsstrategien zur genetischen Manipulation und die Southern Blot-Analysen zur Bestätigung der korrekten Inaktivierung der Gensequenzen im Genom von *M. oryzae* sind in Anhang II und III zu finden.

### 5.1.1 Sequenzanalysen zu Proteinen des HOG-Signalwegs in *Magnaporthe oryzae*

Die beschriebenen Proteine des Sln1-Zweiges im HOG-Signalweg von *S. cerevisiae* sind:

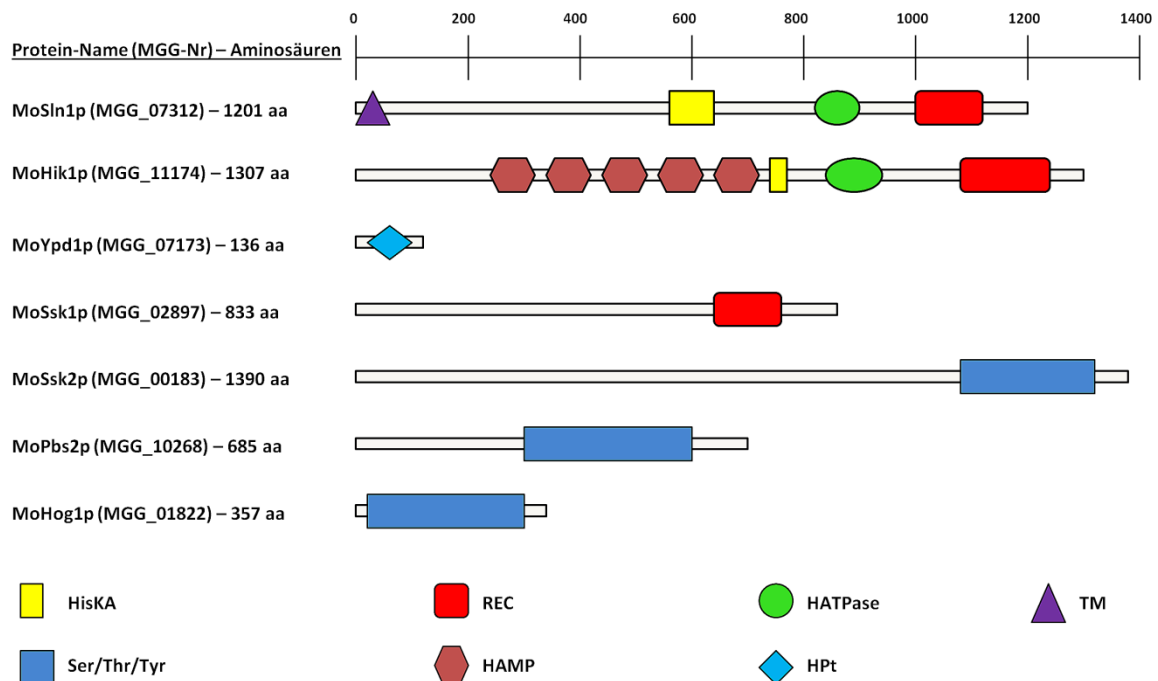
- Sln1p (“**s**ynthetic **l**ethal of **N**-end rule”; YIL147C),
- Ypd1p (“**t**yrosine (**Y**) **p**hosphatase **d**ependent”; YDL235C),
- Ssk1p (“**s**uppressor of **s**ensor **k**inase”; YLR006C),
- Ssk2p (“**s**uppressor of **s**ensor **k**inase”; YNR031C),
- Pbs2p (“**p**olymyxin **B** **s**ensitivity”; YJL128C) und
- Hog1p (“**h**igh **o**smolarity **g**lycerol **r**esponse”; YLR113W).

Die Proteinsequenzen des *Magnaporthe oryzae*-Genoms konnten aus der Datenbank des Broad Instituts identifiziert und analysiert werden. Allen untersuchten Proteinsequenzen aus *S. cerevisiae* konnten homologe Sequenzen aus *M. oryzae* zugeordnet werden (Tab. 1). Diese wurden ausgewählt, um die Untersuchungen zum Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs sowie zum Wirkmechanismus von Fludioxonil in *M. oryzae* durchzuführen. Erste Informationen über die Proteinnamen, Identifikationsnummern, Proteingrößen und Homologien zu den Sequenzen aus *S. cerevisiae* wurden zusammengefasst (Tab. 1). Bei dem Vergleich der Proteinsequenzen aus *M. oryzae* und *S. cerevisiae* mittels Algorithmen von „blastp suite“ (NCBI) werden als Ähnlichkeitsmaß E-value-Werte berechnet. Es konnten sehr kleine E-value-Werte für MoHog1p (mit einem E-value von 0.0), für MoSsk2p (E-value von 9e-154) und für MoPbs2p (E-value von 5e-126) ermittelt werden. Für die restlichen verglichenen Proteinsequenzen wurden E-value-Werte von 1.6e-98 für MoSln1p bis hin zu 2e-18 für MoHik1p errechnet (Tab. 1).

**Tab. 1: Proteine aus *Saccharomyces cerevisiae* mit Funktionen im HOG-Signalweg und deren Homologie zu Proteinen aus *Magnaporthe oryzae*.** Die MGG-Nummern ermöglichen die Zuordnung des Proteins zu den bekannten Sequenzinformationen der „*Magnaporthe* comparative database“. Die YIL-Nummern ermöglichen die Zuordnung des Proteins auf der „*Saccharomyces* genome database“. ID = Identifikationsnummer, aa = Aminosäuren.

<i>Magnaporthe oryzae</i> -Protein (Größe, ID)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Protein (Größe, ID)	Homologie (E-value)
MoSln1p (1201aa, MGG_07312)	Sln1p (1220aa, YIL147C)	1.6e-98
MoHik1p (1307aa, MGG_11174)	Sln1p (1220aa, YIL147C)	2e-18
MoYpd1p (136aa, MGG_07173)	Ypd1p (167aa, YDL235C)	6e-23
MoSsk1p (833aa, MGG_02897)	Ssk1p (712aa, YLR006C)	3e-55
MoSsk2p (1390aa, MGG_00183)	Ssk2p (1579aa, YNR031C)	9e-154
MoPbs2p (685aa, MGG_10268)	Pbs2p (668aa, YJL128C)	5e-126
MoHog1p (357aa, MGG_01822)	Hog1p (435aa, YLR113W)	0.0

Die Ergebnisse der Homologievergleiche wurden durch die Untersuchungen mit der „CDD database“ und des „InterProScan Sequence Search“ sowie den Analysen zu Transmembrandomänen mit dem „TMHMM Server v 2.0“ und dem „DAS transmembrane prediction server“ verifiziert. Für alle untersuchten Proteine des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* konnte eine schematische Darstellung der konservierten Proteindomänen erstellt werden (Abb. 3). Die ermittelten Domänen verdeutlichen die jeweilige Funktion der Proteine im HOG-Signalweg.



**Abb. 3: Konservierte Domänen in Aminosäuresequenzen von Proteinen des HOG-Signalwegs in *Magnaporthe oryzae*.** HisKA = Histidinkinase-Domäne, REC = regulatorische Domäne, HATPase = Histidin-ATPase-Domäne, Ser/Thr/Tyr = Serin-/Threonin-/Tyrosinkinase-Domäne, HAMP = HAMP-Domäne, HPt = Histidin-Phosphotransfer-Domäne, TM = Transmembrandomäne.

Die Sequenzen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen MoSln1p und MoHik1p beinhalten je eine Histidinkinase-Domäne (HisKA-Domäne, PF00512), eine Histidin-ATPase-Domäne (HATPase, PF02518) und eine regulatorische Domäne (REC Domäne, PF00072).

In der Proteinsequenz von MoSln1p konnte mit dem „TMHMM-server 2.0“ nur eine N-terminale Transmembrandomäne (Aminosäuren 9-31) identifiziert werden (Abb. 3). Unter Verwendung des „DAS transmembrane prediction server“ war neben dieser noch eine zweite Transmembrandomäne (Aminosäuren 394-416) vorherzusagen, welche auch in der Literatur bereits beschrieben wurde (Zhang *et al.*, 2010). Unter Berücksichtigung beider Algorithmen war jedoch die Signifikanz der ermittelten Wahrscheinlichkeiten für eine Vorhersage dieser zweiten Transmembrandomäne nicht hoch genug. Während die Sequenz von MoHik1p keine Hinweise auf Transmembrandomänen enthält, sind fünf HAMP-Domänen (Histidine kinase,

Adenylyl cyclase, Methyl-accepting protein Phosphatase, PF00672) berechnet worden (Abb. 3).

Für die Proteinsequenz von MoYpd1p sind zwei unterschiedlich große Varianten von den Algorithmen der „*Magnaporthe comparative database*“ bei ein und derselben genomischen Sequenz abrufbar (Variante [A] mit 153 Aminosäuren und Variante [B] mit 136 Aminosäuren). Ein zusätzlicher Unterschied ist die Position des Startcodons, welches für Variante [A] weiter im „Upstreambereich“ der genomischen Sequenz lokalisiert ist. Für Variante [A] wird ein um 18 Aminosäuren größerer Sequenzabschnitt berechnet als für Variante [B]. Die restliche Proteinsequenz wird als kongruent vorhergesagt (Abb. 4). Bei der Analyse von beiden Sequenzen wurden identische Histidin-Phosphotransfer-Domänen (HPT, PF01627) detektiert (Abb. 3). Bei einem Vergleich des zusätzlichen N-terminalen Teils der Variante [A] mit den annotierten Sequenzen homologer Phosphotransferproteine anderer pilzlicher Organismen in den Datenbanken des NCBI konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Nahezu alle annotierten homologen Sequenzen zu MoYpd1p beginnen mit dem Startcodon von Variante [B]. Zusätzlich gaben q-PCR-Experimente weitere Hinweise auf die Richtigkeit von Variante [B] (Daten nicht gezeigt). Für die Experimente der Y2H-Analysen im Rahmen dieser Arbeit bildete Variante [B] die Grundlage für die Expressionsstudien.

[A] MYSVKDSEKSDSEENADKMPDFGAHV DSTT FEQILEMDEDEAERDFSKPLVMGFFEQAEETFEKMDK...  
 [B] MPDFGAHV DSTT FEQILEMDEDEAERDFSKPLVMGFFEQAEETFEKMDK...

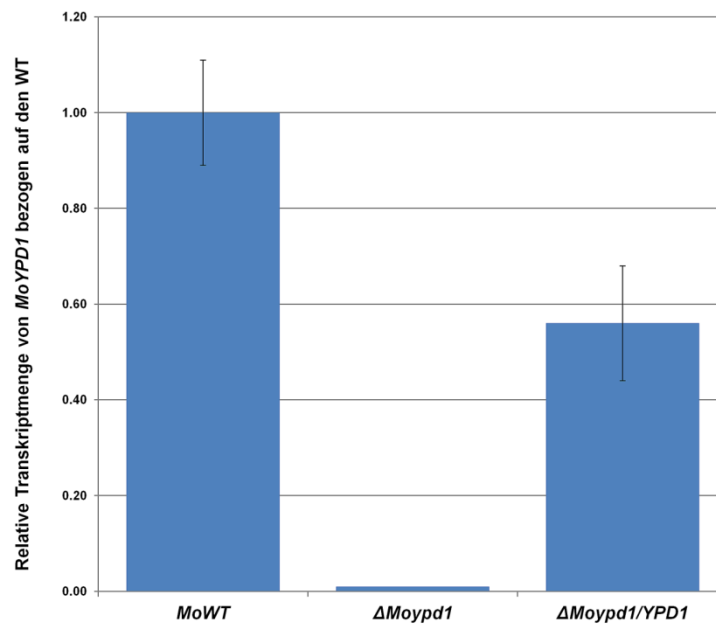
**Abb. 4: Vergleich des N-Terminus der Varianten [A] und [B] der Proteinsequenz von MoYpd1p aus *Magnaporthe oryzae*.** Die N-terminalen Bereiche der Aminosäuresequenz von zwei Varianten [A] und [B] der Proteinsequenz von MoYpd1p sind dargestellt. Beide Varianten wurden mit Hilfe von Algorithmen der *Magnaporthe comparative database* des Broad Instituts vorhergesagt. Die Buchstaben geben die Aminosäuren an, der bei Variante [A] zusätzlich N-terminal lokalisierte Sequenzabschnitt ist grau hinterlegt.

Die Sequenzanalysen von MoSsk1p resultierten in einer C-terminalen REC-Domäne (PF00072). Bei den Sequenzen von MoSsk2p, MoPbs2p und MoHog1p konnte jeweils eine Serin-/Threonin-/Tyrosinkinase-Domäne (Ser/Thr/Tyr, PF00069) identifiziert werden (Abb. 3).

### 5.1.2 Habitus, Konidiogenese und Melaninbiosynthese von $\Delta$ Moypd1

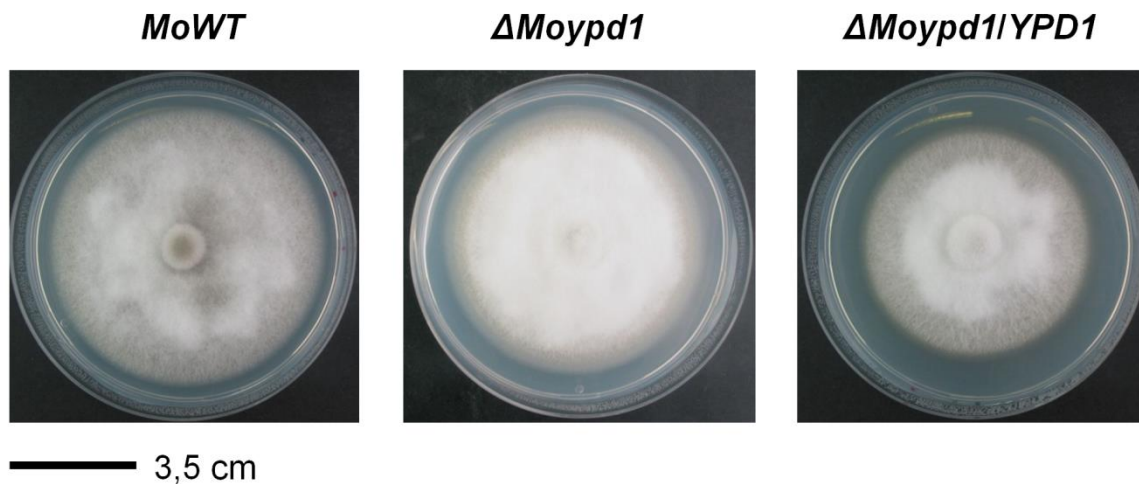
Im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, in der die Inaktivierung des Gens *YPD1* letal ist, war es möglich, das homologe Gen *MoYPD1* (MGG\_07173) in *M. oryzae* zu deletieren und eine entsprechende Mutante  $\Delta$ Moypd1 zu generieren. Eine Reintegration des intakten WT-Gens *MoYPD1* im Locus MGG\_07173 des Genoms der Mutante  $\Delta$ Moypd1 konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden. Die Klonierungsstrategien und Southern Blot-Analysen sind in

Anhang II und III zu finden. Der Nachweis der vollständigen Inaktivierung von *MoYPD1* in der Mutante  $\Delta Moypd1$  und die erneute Expression nach einer Reintegration dieses Gens in das Genom der Mutante  $\Delta Moypd1$  wurde zusätzlich zu den Southern Blot-Analysen mittels q-PCR erbracht. Die relative Transkriptmenge des Gens *MoYPD1* war verglichen mit dem WT in der Mutante  $\Delta Moypd1$  vollständig reduziert. Indes machte die Transkriptmenge des entsprechenden Gens in der komplementierten Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  etwa 60 % der Menge des WTs aus (Abb. 5).



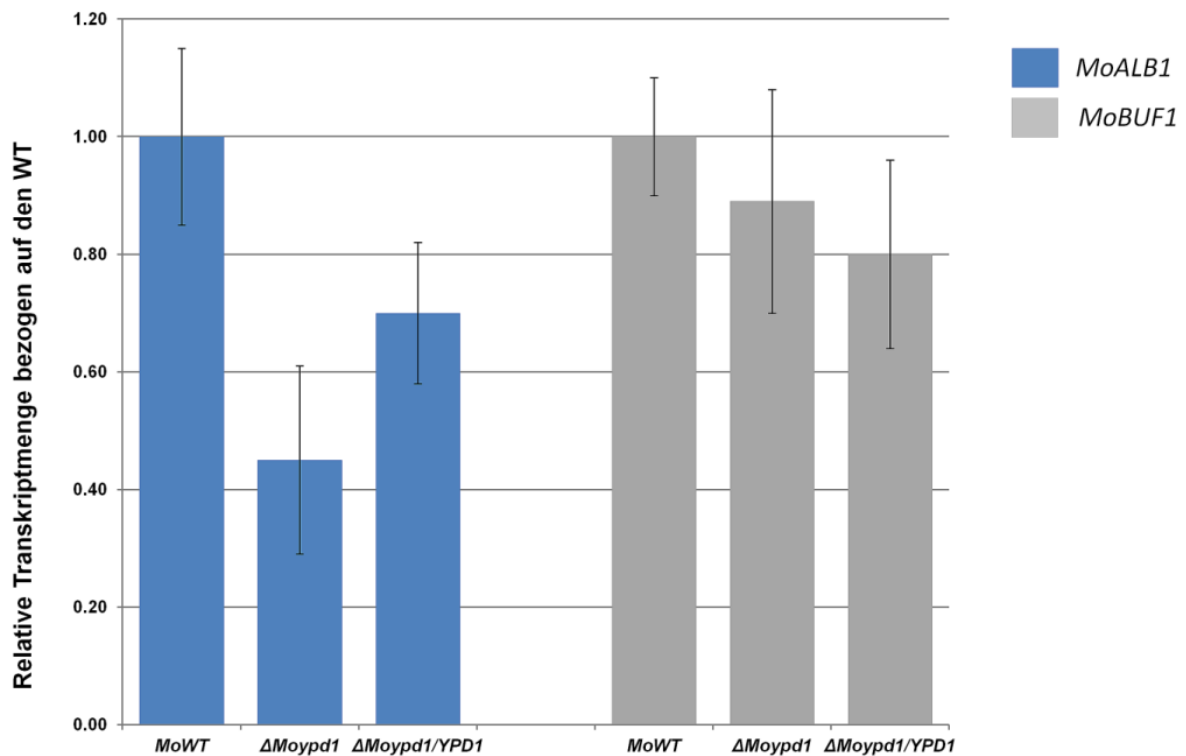
**Abb. 5:** q-PCR-Analyse der relativen Transkriptmenge von *MoYPD1* in  $\Delta Moypd1$  und in  $\Delta Moypd1/YPD1$ . Die Balken repräsentieren die normalisierten Transkriptmengen des Gens *MoYPD1* (MGG\_07173) aus Myzelproben des *M. oryzae*-WTs,  $\Delta Moypd1$  und  $\Delta Moypd1/YPD1$ .

Die typische dunkelgraue Pigmentierung von *M. oryzae* war nach der Inaktivierung des Gens *MoYPD1* nicht mehr zu beobachten. Stattdessen war das vegetative Wachstum charakterisiert von weißem Luftmyzel. Die Mutante  $\Delta Moypd1$  ist somit ein Albino. Durch die Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom der Mutante  $\Delta Moypd1$  konnte der Phänotyp des WTs rekonstituiert werden. Lediglich der Koloniedurchmesser war nach 10 Tagen Wachstum auf CM im Vergleich zum WT geringer (Abb. 6).



**Abb. 6:** Kulturen des *Magnaporthe oryzae*-Wildtypstamms, der Mutante  $\Delta Moypd1$  und  $\Delta Moypd1/YPD1$ . Die Kulturen des WTs, der Mutante  $\Delta Moypd1$  und der komplementierten Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  wurden auf CM 10 Tage bei 26°C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden kultiviert.

Um den möglichen Einfluss der Inaktivierung des Gens *MoYPD1* auf die Melaninbiosynthese zu überprüfen, wurden q-PCR-Analysen zur relativen Transkriptmenge der Gene *MoALB1* (MGG\_07219) und *MoBUF1* (MGG\_02252) durchgeführt, deren Produkte zur Melaninbiosynthese beitragen. Die relative Transkriptmenge des Polyketidsynthasegens *MoALB1* war zum Untersuchungszeitpunkt in den Myzelproben der Mutante  $\Delta Moypd1$  verglichen mit dem WT um etwas mehr als 50 % reduziert. Indes waren die Transkriptmengen des Hydroxynaphthalenereduktasegens *MoBUF1* in beiden Stämmen gleich (Abb. 7). Nach der Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom der Mutante  $\Delta Moypd1$  war in den Myzelproben der komplementierten Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  die relative Transkriptmenge von *MoALB1* verglichen mit dem WT noch um etwa 30 % reduziert (Abb. 7).



**Abb. 7:** q-PCR-Analyse der relativen Transkriptmenge von *MoALB1* und *MoBUF1* in  $\Delta Moypd1$  und  $\Delta Moypd1/YPD1$ . Die blauen Balken repräsentieren die normalisierten Transkriptmengen von *MoALB1* (MGG\_07219) aus Myzelproben des *M. oryzae*-WTs,  $\Delta Moypd1$  und  $\Delta Moypd1/YPD1$ , während die grauen Balken die der Gene von *MoBUF1* (MGG\_02252) darstellen.

Aus den Arbeiten mit einer apathogenen *M. oryzae*-Albinomutante  $\Delta Moalb1$  ist bekannt, dass die Bildung von Melanin wieder stattfindet, wenn Scytalon (ein Zwischenprodukt in der Melaninbiosynthese) in das Kulturmedium appliziert wird. Daraufhin ist  $\Delta Moalb1$  wieder in der Lage die Wirtspflanze zu infizieren (Chumley und Valent, 1990). Dieser Versuch wurde analog mit  $\Delta Moypd1$  durchgeführt. Dabei war während des Wachstums von  $\Delta Moypd1$  auch nach der Zugabe von Scytalon bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  keine dunkle Färbung des Myzels zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Die Bildung der Konidien in allen Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg, mit Ausnahme von  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Moypd1$ , war im Vergleich zum WT reduziert. Während bei  $\Delta Mohik1$  eine Steigerung der Konidienzahl beobachtet werden konnte, waren bei  $\Delta Moypd1$  überhaupt keine Konidien zu erkennen. Die Abwesenheit von Konidien wurde durch die mikroskopische Untersuchung der Konidiophoren bestätigt. Nach einer Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom der Mutante  $\Delta Moypd1$  wurden wieder Konidien gebildet. Die Komplementationsmutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  differenziert wieder Appressorien und es waren in den Pflanzentests mit dem WT vergleichbare Läsionen auf den Reispflanzen zu beobachten, die den Symptomen entsprachen, die der WT hervorruft (Daten nicht gezeigt).

### 5.1.3 Das Wachstum von $\Delta Moypd1$ und den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stressbedingungen

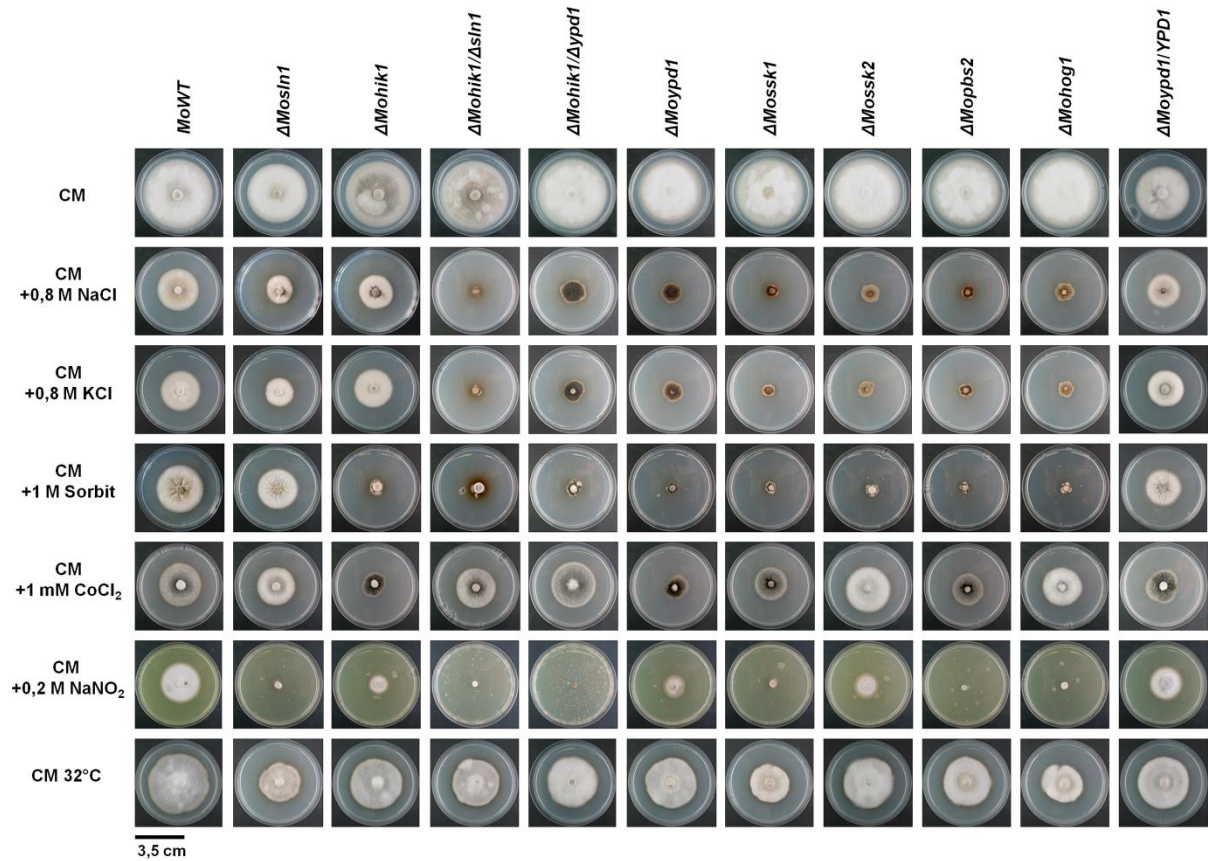
Die phänotypischen Untersuchungen wurden mit dem *M. oryzae*-WT und den Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg auf Festmedium durchgeführt, wobei das Wachstum der Mutantenstämme mit dem Wachstum des WTs unter Zugabe verschiedener physiologisch aktiver Substanzen verglichen wurde.

Bei den Wachstumsversuchen waren bei der Mutante  $\Delta Moypd1$  die stärksten Veränderungen im Vergleich zum WT zu beobachten. Die Zugabe der verschiedenen Reagenzien in das Kulturmedium in den für WT-Stämme subletalen Mengen resultierte bei allen dargestellten Versuchen in einer starken Verminderung bis hin zur vollkommenen Unterdrückung des Wachstums von  $\Delta Moypd1$ . Diese phänotypischen Effekte waren nach Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* bei der komplementierten Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  in dieser Ausprägung nicht zu sehen. Der Habitus von  $\Delta Moypd1/YPD1$  entsprach unter allen Testbedingungen dem des WTs, nur der Koloniedurchmesser und damit die Wachstumsgeschwindigkeit war stets geringer (Abb. 8, Abb. 9).

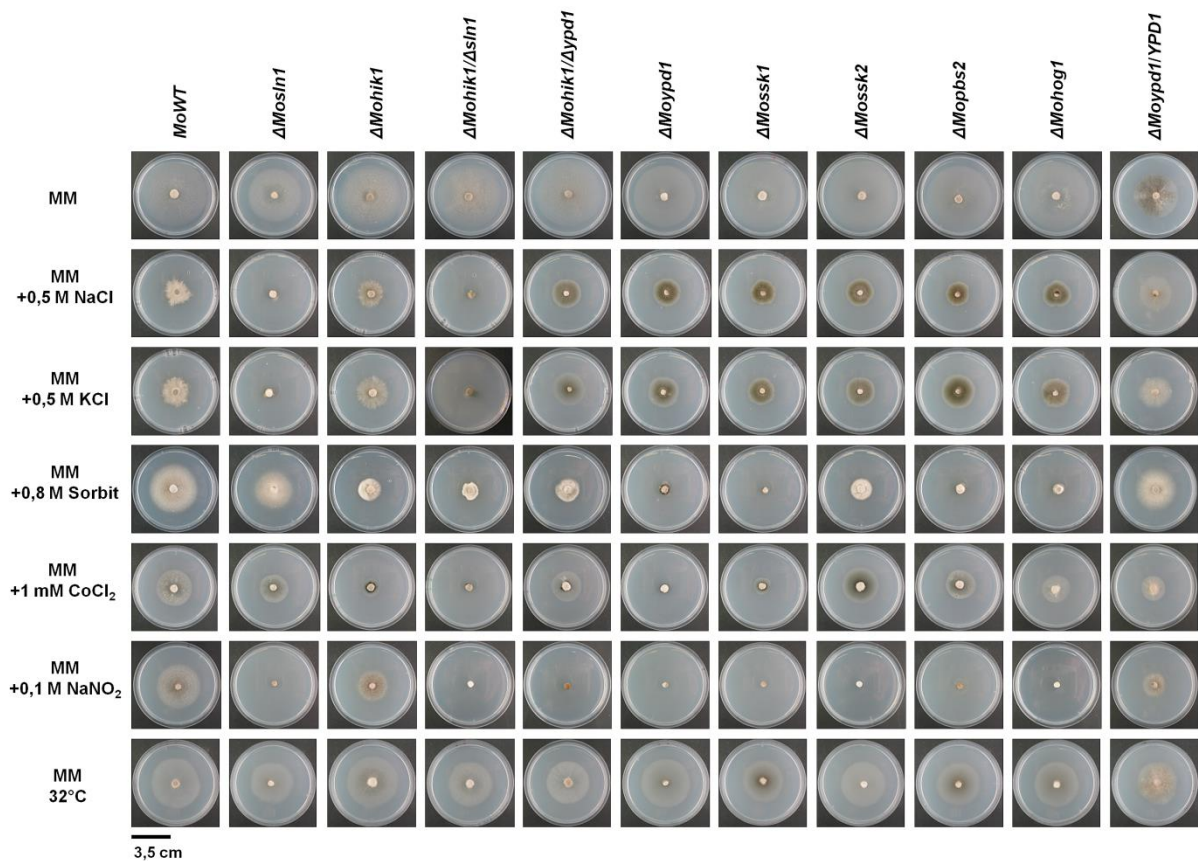
Die bereits beschriebene Sensitivität der Mutanten  $\Delta Mosln1$  (Zhang *et al.*, 2010),  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mossk1$  (Motoyama *et al.*, 2008) sowie  $\Delta Mohog1$  ( $\Delta osm1$ , Dixon *et al.*, 1999) gegen Osmolyte wie NaCl, KCl oder Sorbit bestätigte sich im Rahmen dieser Arbeit. Zusätzlich wurde eine starke Sensitivität von  $\Delta Mopbs2$ ,  $\Delta Mossk2$  und  $\Delta Moypd1$  gegen diese Osmolyte beobachtet. Ebenfalls konnte eine Sensitivität aller Mutanten bei Zugabe von Glycerin beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die Mutantenstämme waren nicht oder nur vermindert in der Lage unter den getesteten Bedingungen zu wachsen. Auffällig war, dass die entsprechenden Mutanten nach der Inaktivierung der Gene *MoSLN1* und *MoHIK1* bei Wachstumsversuchen mit Salzstress zwar langsameres vegetatives Wachstum hatten als der WT, aber größere Wachstumszonen im Vergleich zu den Mutanten mit den inaktivierten Genen *MoSSK1*, *MoSSK2*, *MoPBS2* und *MoHOG1* (Abb. 8, Abb. 9).

Die gleichzeitige Inaktivierung beider HIK-codierender Gene (*MoHIK1* und *MoSLN1*) resultierte in der Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$ , deren Wachstumsverhalten durch Salze oder Sorbit noch stärker beeinflusst wurde als das der Einzelmutanten  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mosln1$ . Nach Zugabe von NaCl, KCl oder  $\text{NaNO}_2$  in für den WT-Stamm subletalen Mengen ins Testmedium war bei  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  kein Wachstum mehr zu beobachten (Abb. 8, Abb. 9). Auch die Zugabe von  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  oder Glycerin bewirkt, dass die Stämme nicht mehr wachsen können (Daten nicht gezeigt). Für die Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta ypd1$  wurden ähnliche Wachstumsdefizite wie für  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  beobachtet (Abb. 8, Abb. 9).





**Abb. 8: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen CM-Festmedien.** Die Kulturen wurden auf CM mit NaCl, KCl, Sorbit, CoCl<sub>2</sub> oder NaNO<sub>2</sub> 10 Tage bei 26°C kultiviert. Die Koloniedurchmesser sowie die entsprechenden Normalisierungen sind in Anhang IV aufgelistet (Tab. 5, Tab. 6).



**Abb. 9: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen MM-Festmedien.** Die Kulturen wurden auf MM mit NaCl, KCl, Sorbit, CoCl<sub>2</sub> oder NaNO<sub>2</sub> 10 Tage bei 26°C kultiviert. Die Koloniedurchmesser sowie die entsprechenden Normalisierungen sind in Anhang IV aufgelistet (Tab. 5, Tab. 6).

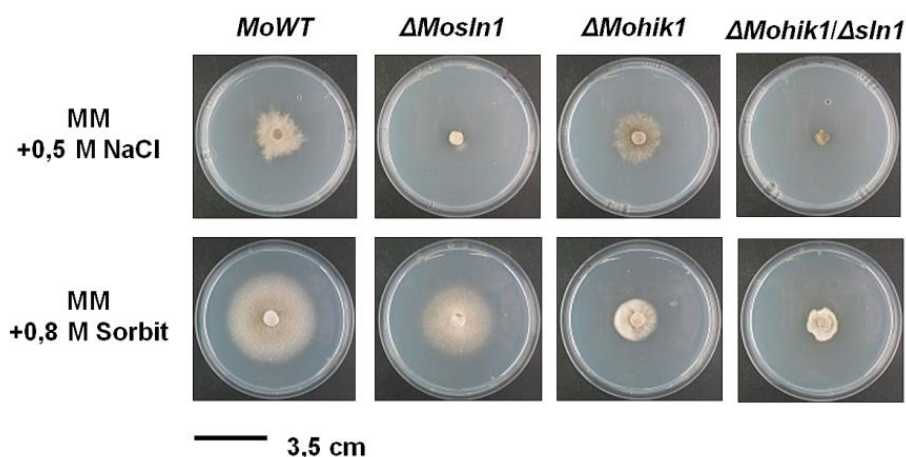
Der Zusatz von CoCl<sub>2</sub> in das Testmedium CM hatte auf das Wachstum von  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Moypd1$ ,  $\Delta Mossk1$  und  $\Delta Mopbs2$  deutlichen Einfluss. Der Koloniedurchmesser dieser Mutanten war im Vergleich zum WT deutlich kleiner und eine dunkle Färbung des Myzels war festzustellen (Abb. 8). Auf MM mit CoCl<sub>2</sub> waren diese Beobachtungen ebenfalls zu sehen. Die Wachstumsgeschwindigkeit der restlichen HOG-Signalweg-Mutanten war etwas kleiner als die des WT (Abb. 9).

Die Zugabe von NaNO<sub>2</sub> zu beiden Testmedien führte zu einer vollkommenen Unterdrückung des Wachstums aller Mutantenstämme mit Ausnahme von  $\Delta Mohik1$ ,  $\Delta Moypd1$  und  $\Delta Mossk2$  auf CM. Jedoch war auch bei diesen drei Stämmen eine deutlich kleinere Wachstumszone im Vergleich zum WT zu erkennen (Abb. 8, Abb. 9).

Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur verlangsamte das Wachstum aller Mutanten stärker als das Wachstum des WT. Dabei waren die Wachstumszonen von  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mossk1$  und  $\Delta Mohog1$  am kleinsten (Abb. 8, Abb. 9). Bei einer Inkubationstemperatur von 20°C waren keine Unterschiede bezüglich des Koloniedurchmessers der Mutantenstämme und des WT festzustellen (Daten nicht gezeigt).

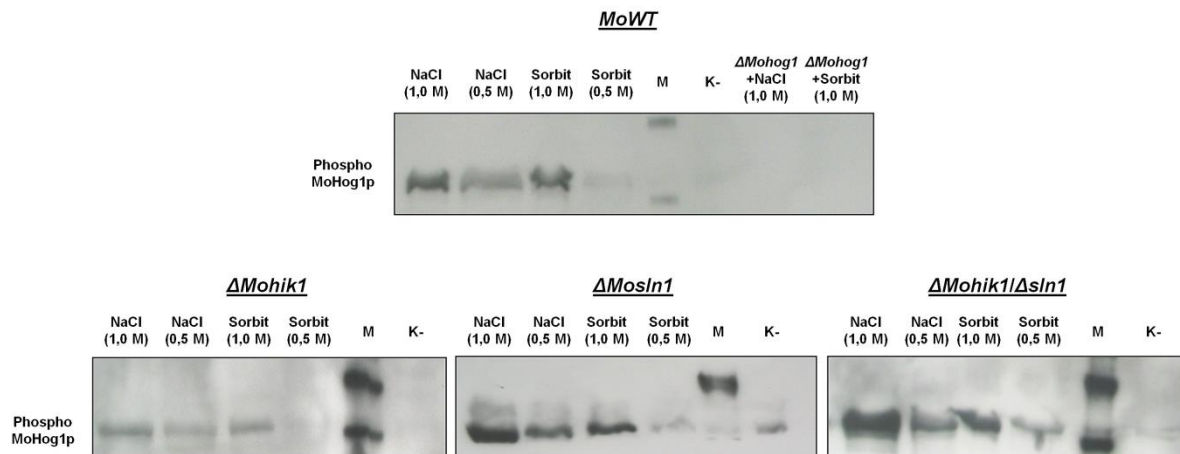
#### 5.1.4 Die Unterschiede zwischen $\Delta Mos1n1$ und $\Delta Mohik1$ bei Salz- und Zuckerstress

Untersuchungen zu Salz- und Zuckerstress mit den Mutanten  $\Delta Mos1n1$  und  $\Delta Mohik1$  ergaben, dass diese Stämme unterschiedlich auf NaCl und Sorbit reagieren. Während das Wachstum von  $\Delta Mos1n1$  durch die Salze NaCl, KCl oder NaNO<sub>2</sub> sehr viel stärker beeinträchtigt wurde als das von  $\Delta Mohik1$ , verhielt es sich bei Zugabe von Sorbit entgegengesetzt. Der Koloniedurchmesser von  $\Delta Mohik1$  war bei gleicher Inkubationszeit nach Applikation von Sorbit wesentlich kleiner als die Wachstumszone von  $\Delta Mos1n1$  (Abb. 10).



**Abb. 10:** Wachstumsversuche mit  $\Delta Mos1n1$ ,  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  bei NaCl- oder Sorbitstress. Die Kulturen wurden 10 Tage bei 26°C auf MM mit 0,5 M NaCl oder 0,8 M Sorbit kultiviert.

Bei den Western Blot-Analysen unter Verwendung eines phospho-MoHog1p-spezifischen Antikörpers konnten nach Applikation von NaCl und Sorbit klare Chemolumineszenzsignale von MoHog1p in den Proben der Proteinextrakte des WTs, von  $\Delta Mos1n1$ ,  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  auf dem Röntgenfilm detektiert werden. Diese Chemolumineszenzsignale konnten durch den Vergleich mit dem Marker Proteinen einer Größe von etwas über 40 kDA (MoHog1p hat 42 kDA) zugeordnet werden (Abb. 11). Bei den gleichen Ansätzen mit Proteinextrakten aus  $\Delta Moypd1$ ,  $\Delta Mossk1$ ,  $\Delta Mossk2$ ,  $\Delta Mopbs2$  und  $\Delta Mohog1$  waren keine Chemolumineszenzsignale zu erkennen (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 11: Western Blot-Analyse von Phospho-MoHog1p in  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mohik1\Delta sln1$  bei NaCl- oder Sorbitstress.** Die Phosphorylierung von MoHog1p wurde in Proteinextrakten des *M. oryzae* WT und den Mutanten untersucht. Die Kulturen wurden mit NaCl oder Sorbit inkubiert. K- = Negativkontrolle ohne Wirkstoffzugabe, M = biotinylierter Proteinmarker.

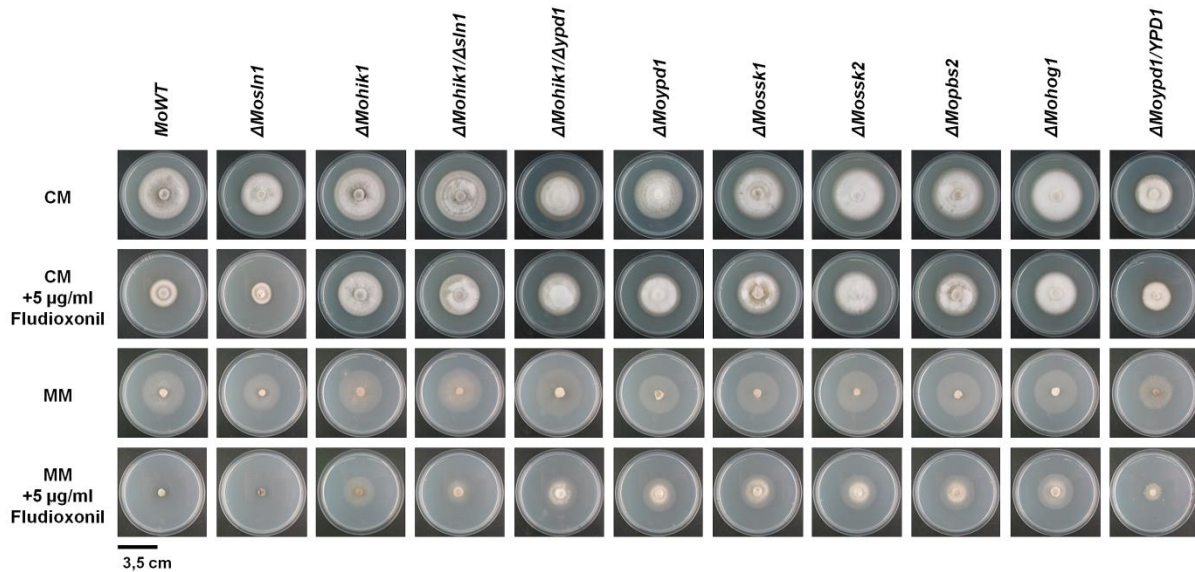
### 5.1.5 Die Funktion von MoYpd1p beim Wirkmechanismus von Fludioxonil

Die Funktion des Phosphotransferproteins MoYpd1p im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* sowie dessen Beteiligung am Wirkmechanismus des Fungizids Fludioxonil wurde mit Resistenzversuchen und Western Blot-Analysen untersucht.

Es wird angenommen, dass Fludioxonil durch Wirkung an der Histidinkinase MoHik1p (Motoyama *et al.*, 2005a) oder durch andere Faktoren, die mit MoHik1p in Verbindung stehen (wie Phosphotransferproteine oder regulatorische Antwortproteine), eine unkontrollierte Aktivierung des HOG-Signalwegs auslöst. Dies führt zum Zelltod (Tanaka und Izumitsu, 2010).

Um diese Spekulationen zu überprüfen, wurden die Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg auf Kulturmedien unter Zugabe von Fludioxonil kultiviert und deren Wachstum beobachtet. Mit Ausnahme von  $\Delta Mosln1$  waren für alle Mutantenstämme deutliches Wachstum festzustellen. Bei dem WT konnte auf CM mit Fludioxonil ein sehr kleiner Koloniedurchmesser beobachtet werden, während der Stamm auf MM-Medium mit Fludioxonil nicht in der Lage war zu wachsen. Der Phänotyp des Stamms  $\Delta Mosln1$  entspricht in Wachstumsgeschwindigkeit und Pigmentierung dem des WTs. Nach einer Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom der Mutante  $\Delta Moypd1$  war für die komplementierten Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  auf CM mit Fludioxonil ein mit dem WT vergleichbarer Koloniedurchmesser zu beobachten, während auf MM mit dem Fungizid nur der Ansatz einer Wachstumszone festzustellen war (Abb. 12).

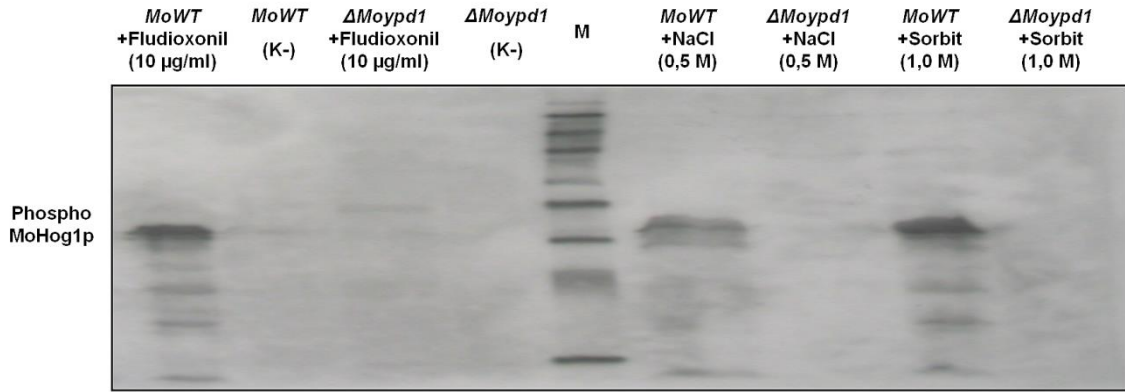




**Abb. 12: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten zur Fludioxonilresistenz.** Die Kolonien wurden 7 Tage auf CM oder MM mit 5 µg/ml Fludioxonil bei 26°C kultiviert. Die Koloniedurchmesser sowie die entsprechenden Normalisierungen sind in Anhang IV aufgelistet (Tab. 7, Tab. 8).

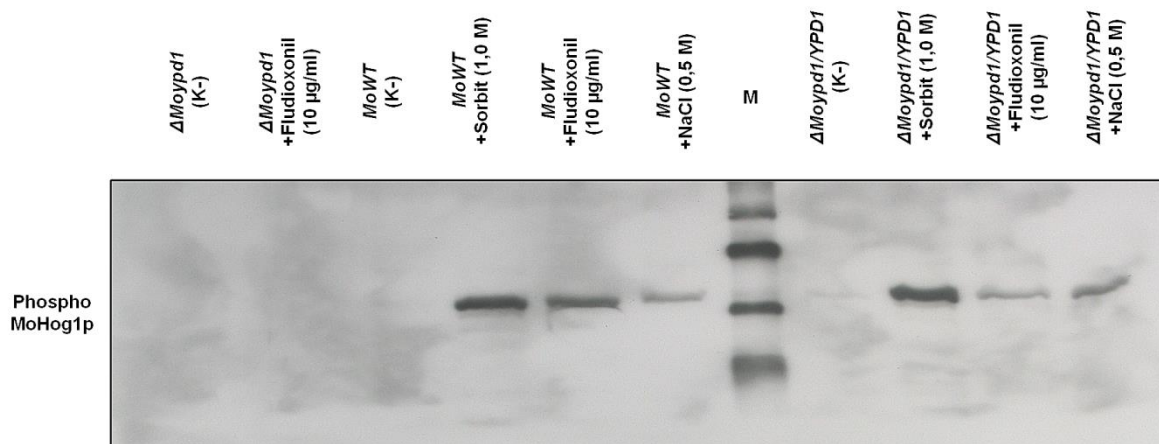
Fungizidzugabe zu Konidien des WT resultierte bereits ab einer Fludioxonilkonzentration von 7,5 µg/ml in H<sub>2</sub>O in vollständigem Unterbleiben des Keimungsprozesses. Abgesehen von *ΔMosln1* war für alle HOG-Signalweg-Mutanten auch bei einer Konzentration von 150 µg/ml Fludioxonil in H<sub>2</sub>O noch eine mit der unbehandelten Kontrolle vergleichbare Differenzierung eines Keimschlauches zu beobachten. In einer Untersuchung der komplementierten Mutante *ΔMoypd1/YPD1* war vergleichbares Wachstum analog zu dem der HOG-Signalweg-Mutanten zu sehen (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis der Aktivierung des HOG-Signalwegs wurde mittels Western Blot-Analysen unter Verwendung eines phospho-MoHog1p-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Dazu fand eine Untersuchung der Proteinextrakte des WTs und aller HOG-Signalweg-Mutanten statt. Nach Applikation von Fludioxonil, NaCl oder Sorbit waren eindeutige Chemolumineszenzsignale von den Proben des WTs auf dem Röntgenfilm zu beobachten. Indes waren bei den Proben von *ΔMoypd1* keine solchen Signale zu sehen (Abb. 13). Diese Signale konnten durch den Vergleich mit dem Marker Proteinen einer Größe von etwas über 40 kDa (MoHog1p hat 42 kDa) zugeordnet werden. Unter identischen Bedingungen waren auch bei den Proben der restlichen HOG-Signalweg-Mutanten keine entsprechenden Chemolumineszenzsignale zu erkennen. Nur bei den Proben von *ΔMosln1* waren identische Signale zu den Proben des WTs zu beobachten (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 13: Western Blot-Analyse von Phospho-MoHog1p in  $\Delta$ *Moypd1* bei Fludioxonilzugabe, NaCl- oder Sorbitstress.** Die Phosphorylierung von MoHog1p wurde in Proteinextrakten des WTs und  $\Delta$ *Moypd1* untersucht. Die Kulturen wurden mit Fludioxonil, NaCl oder Sorbit inkubiert. K- = Negativkontrolle ohne Wirkstoffzugabe, M = biotinylierter Proteinmarker.

Nach einer Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom der Mutante  $\Delta$ *Moypd1* waren bei den Proben von  $\Delta$ *Moypd1*/*YPD1* deutliche Chemolumineszenzsignale auf dem Röntgenfilm zu beobachten. Die Signalintensität war vergleichbar mit den Proben des WTs. Einzig das Signal in der Probe des Ansatzes von  $\Delta$ *Moypd1*/*YPD1* mit Fludioxonil war schwächer als in der Probe des WTs (Abb. 14).



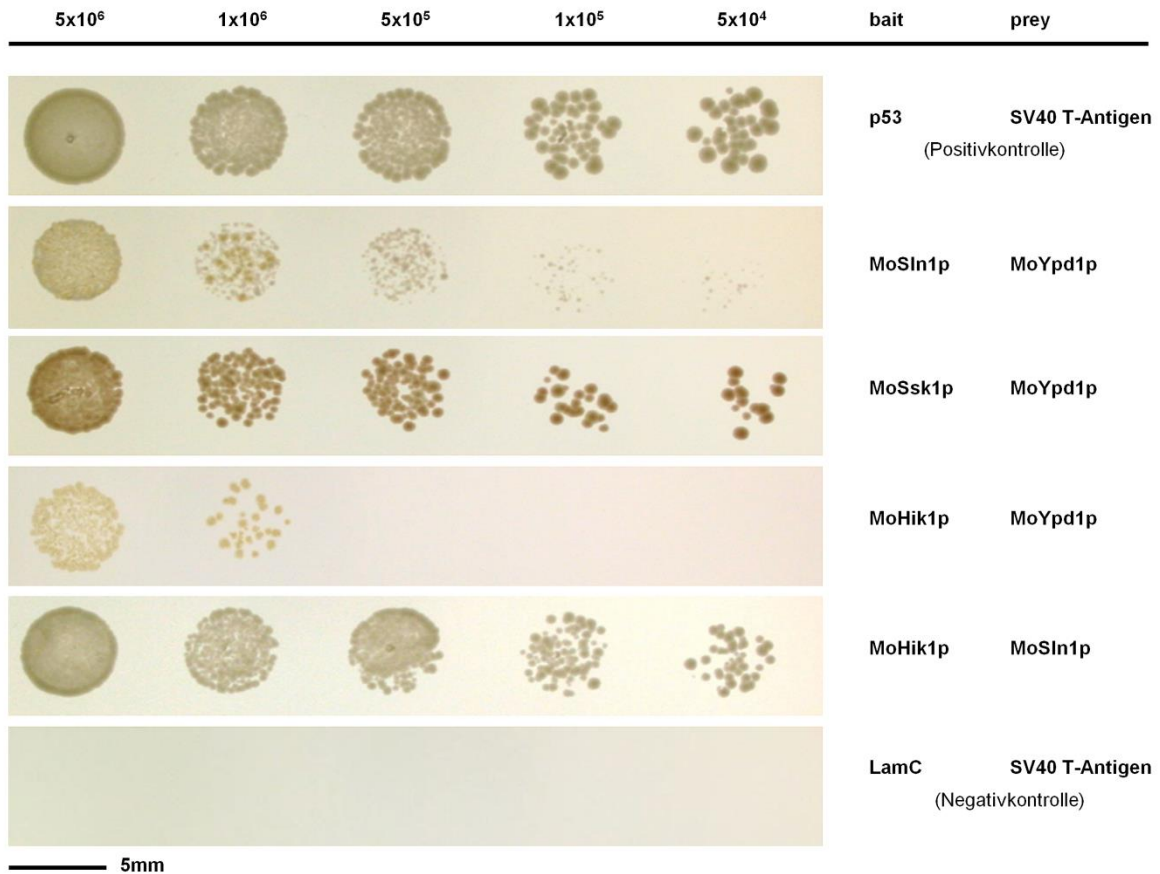
**Abb. 14: Western Blot-Analyse von Phospho-MoHog1p in der komplementierten Mutante  $\Delta$ *Moypd1*/*YPD1* bei Fludioxonilzugabe, NaCl- oder Sorbitstress.** Die Phosphorylierung von MoHog1p wurde in Proteinextrakten des WTs,  $\Delta$ *Moypd1* und  $\Delta$ *Moypd1*/*YPD1* untersucht. Die Kulturen wurden mit Fludioxonil, NaCl oder Sorbit inkubiert. K- = Negativkontrolle ohne Wirkstoffzugabe, M = biotinylierter Proteinmarker.

### 5.1.6 Die Proteininteraktionen von MoYpd1p im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs

Die Untersuchungen zu Proteininteraktionen von MoYpd1p innerhalb des Phosphorelaysystems des HOG-Signalwegs von *M. oryzae* wurden *in vivo* mittels der Yeast Two-Hybrid (Y2H)-Analyse durchgeführt. Für die Interaktionsstudien wurden folgende Proteine des HOG-Signalwegs ausgewählt: MoSln1p, MoHik1p, MoYpd1p und MoSsk1p.

Nach den Transformationsversuchen, der Selektion von erfolgreichen Transformanten sowie den Verdünnungsreihentests auf den entsprechenden Aminosäure-Mangelmedien konnte das Wachstum der Hefetransformanten charakterisiert werden. Die Unterschiede bezüglich des Wachstums konnten auf SD-Medium MS (ohne Leu, Trp, His) nach der Durchführung der Verdünnungsreihentests am besten dargestellt werden. Zugunsten der Übersichtlichkeit ist jeweils nur eine Variante einer Proteininteraktion („bait“ oder „prey“) aufgezeigt. Die Ergebnisse der jeweils anderen Interaktion waren für alle präsentierten Paarungen identisch. Für MoHik1p wurden nur Studien mit *pGBKT7+HIK1* als „bait“ durchgeführt, die Expression von MoHik1p war in Fusion mit dem *ADH1*-Promotor und der *GAL4*-Aktivierungsdomäne von *S. cerevisiae* nicht möglich.

Das Wachstum der Kolonien der Transformanten nach den Doppeltransformationen für Interaktionsstudien von (MoSsk1p)+(MoYpd1p) und von (MoSln1p)+(MoHik1p) begann auf dem Selektionsmedium bei ungefähr der gleichen Zellzahl wie das Wachstum der Kolonien der Positivkontrolle (p53)+(SV40 T-Antigen). Bei den Experimenten zur Interaktion von (MoSln1p)+(MoYpd1p) war das Wachstum im Verdünnungstest erst bei einer im Vergleich zur Positivkontrolle um den Faktor zehn erhöhten Zellzahl zu beobachten. Kolonien nach einer Doppeltransformation für die Untersuchung von (MoHik1p)+(MoYpd1p) wurden erst bei einer um den Faktor 50 erhöhten Zellzahl auf dem Selektionsmedium sichtbar (Abb. 15).



**Abb. 15: Yeast Two Hybrid (Y2H)-Analyse von Proteinen im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs von *Magnaporthe oryzae*.** Verdünnungstest von *S. cerevisiae*-Transformanten auf SD-Medium MS (ohne Leu, Trp, His) nach Doppeltransformationen mit den entsprechenden Y2H-Expressionsvektoren.

Für die restlichen Kombinationsmöglichkeiten an Proteininteraktionen von MoSln1p, MoHik1p, MoYpd1p und MoSsk1p war kein Wachstum auf den Selektionsmedien zu erkennen. Bei den Kontrollen der Einzeltransformation für jedes Konstrukt konnte ebenfalls kein Wachstum beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



## 5.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae*

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden umfassende Untersuchungen zu allen Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HIKs) in *M. oryzae* durchgeführt. Bisher wurden HIKs in *M. oryzae* unzureichend untersucht. Es sind lediglich Arbeiten über MoSln1p und MoHik1p veröffentlicht (Zhang *et al.*, 2010; Motoyama *et al.*, 2005a und b), obwohl die Relevanz dieser Signalproteine für das Verständnis grundlegender physiologischer Signalprozesse und des Wirkmechanismus von Fungiziden dokumentiert ist (Tanaka und Izumitsu, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden alle HIK-codierenden Gene im Genom von *M. oryzae* identifiziert und gezielt einzeln inaktiviert. Durch diese Geninaktivierungen mit einer anschließenden umfassenden phänotypischen Charakterisierung der Mutanten konnten erste Rückschlüsse auf putative Funktionen der inaktivierten Gene bzw. deren Genprodukte erzielt werden. Die Klonierungsstrategien und die Southern Blot-Analysen sind in Anhang II und III zu finden.

### 5.2.1 Sequenzanalysen zu Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae*

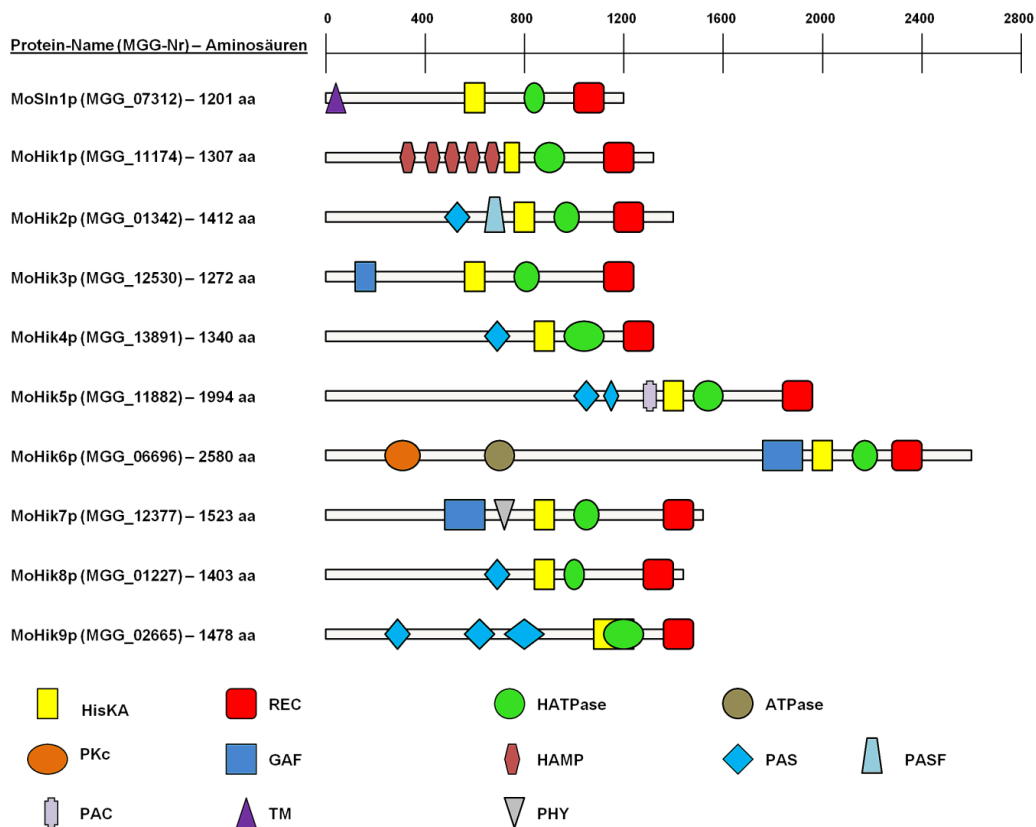
Im Genom von *M. oryzae* sind zehn Gensequenzen annotiert, in deren korrespondierenden Proteinsequenzen jeweils eine konservierte Histidinkinase-Domäne (HisKA, PF00512) identifiziert werden konnte. Aus Gründen der Vergleichbarkeit und um die Gesamtheit der Untersuchungen der HIKs in *M. oryzae* besser darstellen zu können, werden die schon im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen Resultate zu den Komponenten MoSln1p und MoHik1p stellenweise in diesem zweiten Teil nochmals aufgeführt. Die acht bisher nicht in der Literatur beschriebenen HIK-codierenden Gene im Genom von *M. oryzae* wurden im Rahmen dieser Arbeit benannt als:

- *MoHIK2* (MGG\_01342),
- *MoHIK3* (MGG\_12530),
- *MoHIK4* (MGG\_13891),
- *MoHIK5* (MGG\_11882),
- *MoHIK6* (MGG\_06696),
- *MoHIK7* (MGG\_12377),
- *MoHIK8* (MGG\_01227) und
- *MoHIK9* (MGG\_02665).

Durch Analysen zu den konservierten Proteindomänen mit der „InterProScan Sequence Search“ Datenbank und der „Pfam 27.0“ Datenbank wurden in allen zehn untersuchten Sequenzen, neben den HisKA-Domänen, auch je eine regulatorische Domäne (REC-Domäne, PF00072) und eine Histidin-ATPase-Domäne (HATPase, PF02518) identifiziert. Dabei waren vor allem Unterschiede in dem Vorhandensein bzw. der Anzahl von Sensordomänen festzustellen. Bei den Sensordomänen handelt es sich um:

- GAF-Domänen (“**c**GMP-specific phosphodiesterases, **a**denylyl cyclases and **F**hlA (“**f**ormate **h**ydrogen **l**yase transcriptional **a**ctivator in *E. coli*”); PF01590),
- PHY-Domänen („**P**hytochrome region“; PF00360),
- PKc-Domänen (“**p**rotein **k**inases, **c**atalytic domain“; cd00180),
- HAMP-Domänen (“**H**istidine kinase, **A**denylyl cyclase, **M**ethyl-accepting protein **P**hosphatase“; PF00672),
- PAS-Domänen (“**p**eriod circadian protein, **a**ryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, **s**ingle-minded protein“; PF00989),
- PASF-Domänen („**PAS**-fold“, PF08448),
- PAC-Domänen (ein Motiv **C**-terminal zu PAS-Motiven; smart00086) und
- ATPase-Domänen (PF13191).

Transmembrandomänen konnten, abgesehen von einer bereits im ersten Teil dieser Arbeit beschriebenen N-terminalen Transmembranregion bei MoSln1p, für keine der untersuchten Proteinsequenzen identifiziert werden. Anhand der ermittelten Sequenzinformationen konnte eine schematische Darstellung der konservierten Proteindomänen für alle untersuchten HIKs in *M. oryzae* erstellt werden (Abb. 16).



**Abb. 16: Konservierte Domänen in Proteinsequenzen von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae*.** HisKA = Histidinkinase-Domäne, REC = regulatorische Domäne, HATPase = Histidin-ATPase-Domäne, ATPase = ATPase-Domäne, PKc = Proteinkinase-Domäne, GAF = GAF-Domäne, HAMP = HAMP-Domäne, PAS = PAS-Domäne, PASF = PASF-Domäne, PAC = PAC-Domäne, PHY = Phytochrom-Domäne, TM = Transmembrandomäne.

## 5.2.2 Phylogenetische Analyse von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen aus Pilzen

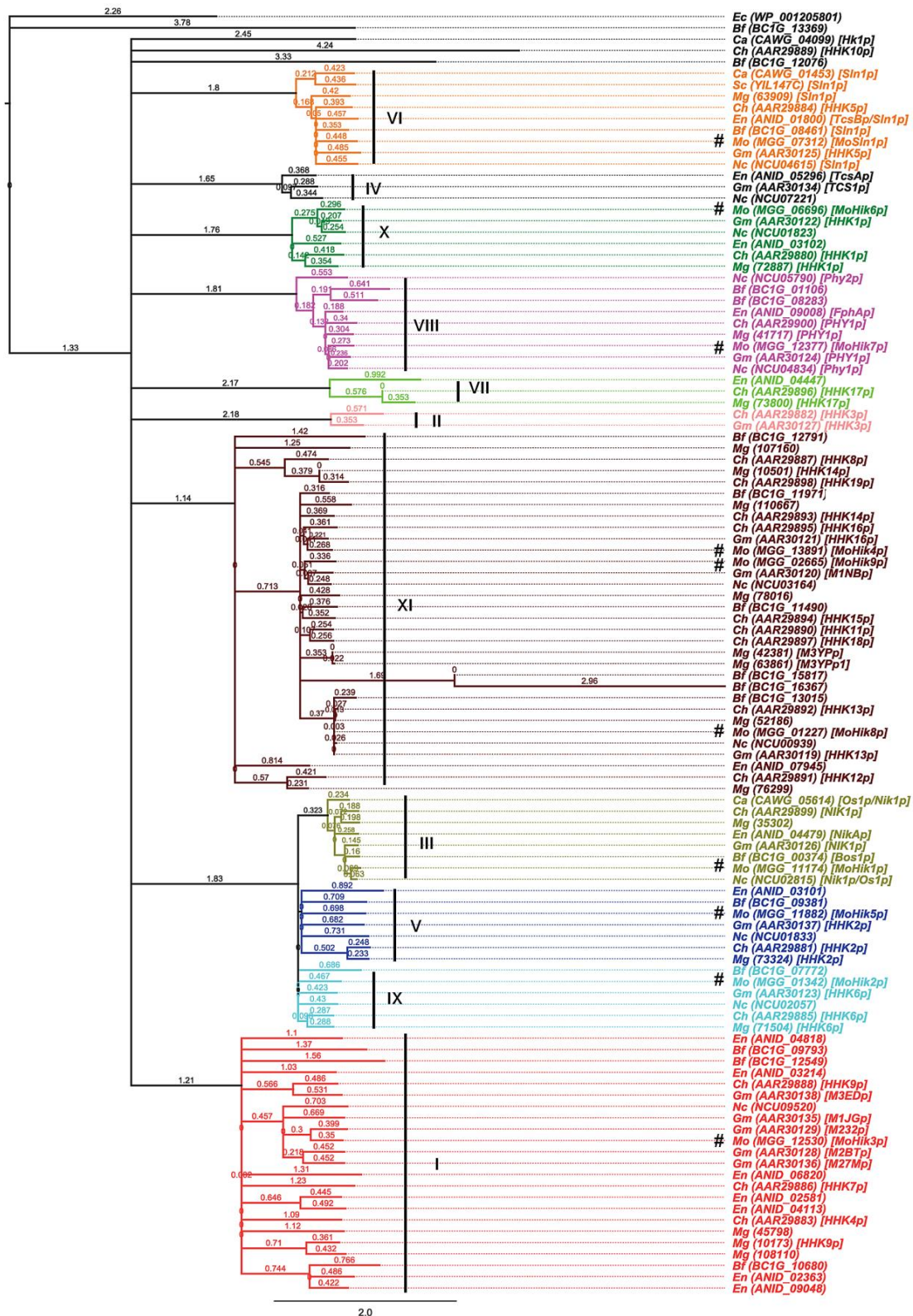
Die Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen von Pilzen werden nach Catlett *et al.* (2003) in elf Gruppen eingeteilt. Die Zuordnung der HIKs aus *M. oryzae* in diese Gruppen konnte anhand phylogenetischer Analysen der Proteinsequenzen durchgeführt werden. Als Grundlage dienen die Proteinsequenzen der putativen HIKs aus *M. oryzae* und ausgewählter Vertreter verschiedener Pilzgruppen:

- *Botryotinia fuckeliana* (anamorph: *Botrytis cinerea*, Leotiomycetes) [17 HIKs],
- *Candida albicans* (Saccharomycetes) [3 HIKs],
- *Cochliobolus heterostrophus* (*Bipolaris maydis*, Dothideomycetes) [21 HIKs],
- *Emericella nidulans* (*Aspergillus nidulans*, Plectomycetes) [15 HIKs],
- *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*, Sordariomycetes) [16 HIKs],
- *Mycosphaerella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*, Dothideomycetes) [19 HIKs],
- *Neurospora crassa* (*Crysolinia crassa*, Sordariomycetes) [11 HIKs] und
- *Saccharomyces cerevisiae* (*Candida robusta*, Saccharomycetes) [1 HIK].

Abweichungen zu Angaben aus der Literatur bezüglich der Anzahl an putativ HIK-codierenden Genen oder homologen Proteinen liegen darin begründet, dass in der vorliegenden Arbeit die jeweils aktuellsten Annotationen aus den entsprechenden Datenbanken verwendet wurden. Die ersten Untersuchungen von Catlett *et al.* (2003) basierten auf Sequenzen älterer Annotationen. Der im Rahmen dieser Arbeit erstellte phylogenetische Baum visualisiert die Einordnung der HIKs aus *M. oryzae* in die elf Gruppen. Mit Ausnahme von Gruppe II, IV und VII ist in jeder Gruppe ein Vertreter aus *M. oryzae* zu finden, in der Gruppe XI wurden sogar drei HIKs aus diesem Pilz gelistet (Abb. 17). MoHik1p wurde durch die phylogenetische Analyse der Gruppe III zugeordnet. In diese Gruppe wurden auch Nik1p/Os1p aus *N. crassa*, Os1p/Nik1p aus *C. albicans*, NikAp aus *E. nidulans*, NIK1p aus *C. heterostrophus*, NIK1p aus *G. moniliformis* und Bos1p aus *B. fuckeliana* sowie eine unbekannte HIK (Mg 35302) von *M. graminicola* eingeordnet. Es konnte somit für alle untersuchten Organismen mit Ausnahme von *S. cerevisiae* genau eine Sequenz, bzw. eine kodierte HIK, in die Gruppe III zugeordnet werden, wobei die Astlängenwerte allesamt sehr klein sind (Abb. 17). Die HIK MoSln1p wurde in die Gruppe VI eingeordnet, in welcher auch die einzige HIK Sln1p aus *S. cerevisiae* sowie die zu Sln1p homologen Proteinsequenzen aus allen untersuchten Organismen gruppiert sind (Abb. 17). Analog zur Gruppe III ist auch hier von jeder untersuchten Spezies genau eine Sequenz gelistet, jedoch sind die Astlängenwerte größer. Die zusätzlich in dieser Arbeit analysierten Proteinsequenzen von MoHik2p-MoHik9p wurden folgenden Gruppen zugeschrieben:

- *MoHIK2* (MGG\_01342): Gruppe IX,
- *MoHIK3* (MGG\_12530): Gruppe I,
- *MoHIK4* (MGG\_13891): Gruppe XI,
- *MoHIK5* (MGG\_11882): Gruppe V,
- *MoHIK6* (MGG\_06696): Gruppe X,
- *MoHIK7* (MGG\_12377): Gruppe VIII,
- *MoHIK8* (MGG\_01227): Gruppe XI und
- *MoHIK9* (MGG\_02665): Gruppe XI.

Die als Kontrolle mitgeführte HIK-Außengruppe („outgroup“) von *E. coli* (WP\_001205801) war durch die verwendeten Algorithmen keiner der elf Gruppen zuzuordnen. Ebenso ergaben die Algorithmen keine Gruppierung für zwei putative HIKs aus *B. fuckeliana* (BC1G\_12076 und BC1G\_13369), für Hk1 aus *C. albicans* und für HHK10p aus *C. heterostrophus* (Abb. 17 oben). Eine ausführliche, vergleichende visuelle Darstellung der konservierten Proteindomänen aller HIKs und eine Tabelle mit den Zugangsnummern zu den jeweils verwendeten Datenbanken sind in Anhang I zu finden.



**Abb. 17: Phylogenetischer Baum zur Analyse von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen aus Pilzen.** Es sind jeweils die Zugangsnummern zur Proteinesequenz der entsprechend verwendeten Datenbank und wenn möglich der Trivialname des korrespondierenden Proteins angegeben. Mit „#“ sind die Proteinesequenzen der HIKs aus *M. oryzae* hervorgehoben. Die römischen Ziffern geben die Gruppennummer nach Catlett *et al.* (2003) an. Die Astlängenwerte sind ein Maß für die Nähe der Verwandtschaft der untersuchten Proteinsequenzen. Bf (*Botryotinia fuckeliana*), Ca (*Candida albicans*), Ch (*Cochliobolus heterostrophus*), Ec (*Escherichia coli*), En (*Emericella nidulans*), Gm (*Gibberella moniliformis*), Mg (*Mycosphaerella graminicola*), Mo (*Magnaporthe oryzae*), Nc (*Neurospora crassa*), Sc (*Saccharomyces cerevisiae*). Die jeweils verwendeten Datenbanken sind in Anhang I gelistet.

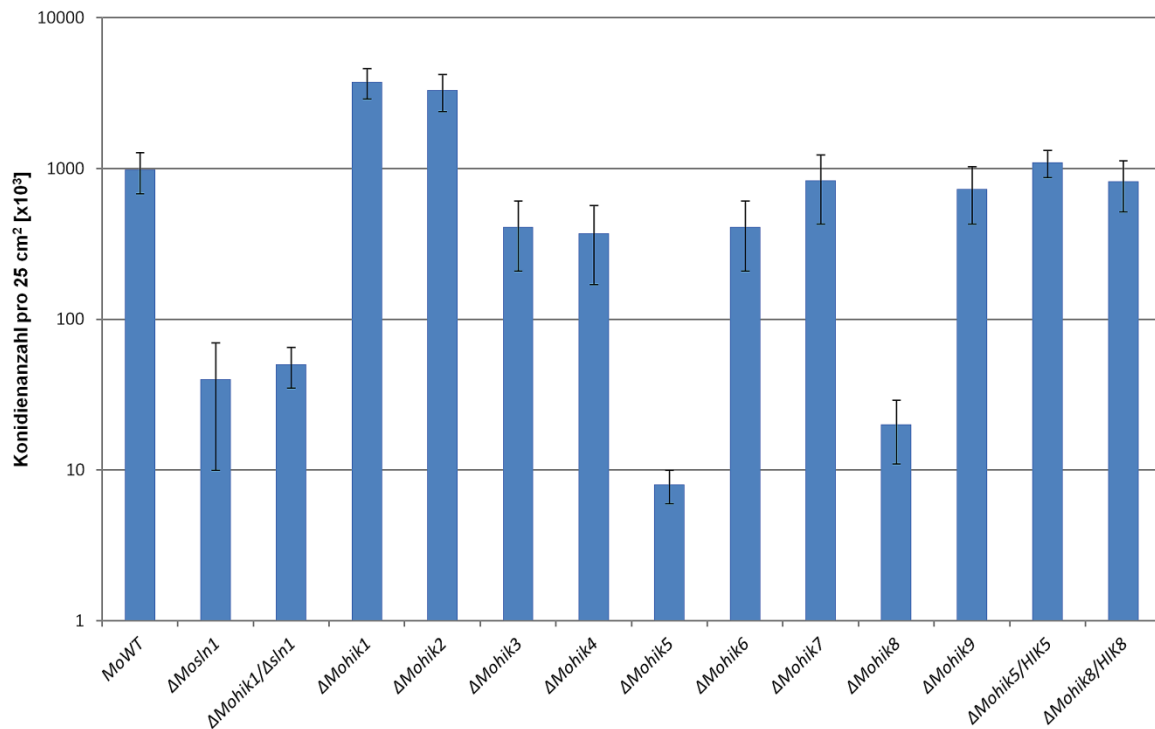
Die Vielfalt an verschiedenen Gruppen dieses phylogenetischen Baumes ist deutlich zu erkennen. So wurden zum einen Gruppen generiert, welche nur einzelne Sequenzen von wenigen Organismen enthalten (Gruppe II, IV und VII). Zum anderen resultierte die Berechnung in großen Gruppen mit teilweise mehreren Proteinsequenzen aus ein und derselben Spezies (Gruppe I und XI, Abb. 17).

Die Gruppe I ist die zweitgrößte Gruppierung. Bezüglich der Ähnlichkeit der untersuchten Sequenzen wurden für diese und für Gruppe XI die größten Astlängenwerte berechnet. Es sind Sequenzen aller untersuchten Spezies in der Gruppe I vorhanden und allein sieben Proteinsequenzen von HIKs aus *E. nidulans* bzw. fünf Sequenzen aus *G. moniliformis* wurden hier gelistet. Nur eine Sequenz aus *N. crassa* konnte zugeordnet werden (Abb. 17).

Die Gruppe XI hat die meisten Mitglieder, Vertreter mit der größten Anzahl an zugeordneten HIKs sind *B. fuckeliana* (6 HIKs), *M. graminicola* (8 HIKs) und *C. heterostrophus* (9 HIKs). Auch in der Gruppe XI sind Sequenzen aller Organismen eingruppiert, wobei hier *E. nidulans* (1 HIK) und *N. crassa* (2 HIKs) die kleinste Anzahl an Gruppe XI-Sequenzen aufweisen (Abb. 17).

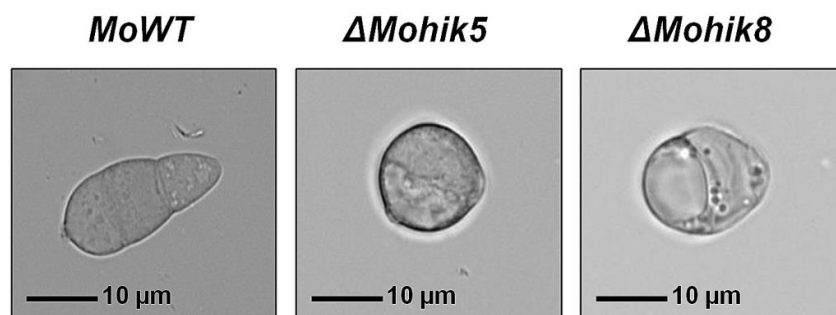
### 5.2.3 Die Konidiogenese in Histidinkinase-Mutanten von *Magnaporthe oryzae*

Bei den Untersuchungen zur Konidiogenese wurde zunächst die Fähigkeit der HIK-Mutanten zur Differenzierung von Konidien überprüft. Die Anzahl an Konidien der analysierten Mutanten variierte sehr stark im Vergleich zum WT. Bei  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mohik2$  war eine Erhöhung der Konidienzahl festzustellen. In den Kulturen von  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik5$ ,  $\Delta Mohik8$  und der Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  war hingegen eine im Vergleich zum WT stark verminderte Anzahl an Konidien zu verzeichnen. Die Konidienzahl der restlichen Stämme entsprach in etwa der des WTs (Abb. 18).



**Abb. 18: Konidienproduktion von Kulturen der Histidinkinase-Mutanten.** Die Anzahl an Konidien auf einer Fläche von 25 cm<sup>2</sup> einer elf Tage alten Kultur auf CM ist dargestellt.

Bei den Mutantenstämmen  $\Delta$ Mohik5 und  $\Delta$ Mohik8 konnte eine starke Veränderung der Konidienform festgestellt werden. Die für *M. oryzae* typischen ellipsoiden und dreizelligen Konidien waren bei beiden Mutanten nicht zu beobachten. Vielmehr waren die Zellen ein- bis zweizellig und von rundlicher Gestalt, apikale oder basale Kompartimente waren nicht zu erkennen (Abb. 19). Des Weiteren war zu sehen, dass sowohl bei  $\Delta$ Mohik5 als auch bei  $\Delta$ Mohik8 vermehrt zwei Keimschläuche an den gegenüberliegenden Seiten der Konidien ausdifferenziert wurden (Abb. 21).



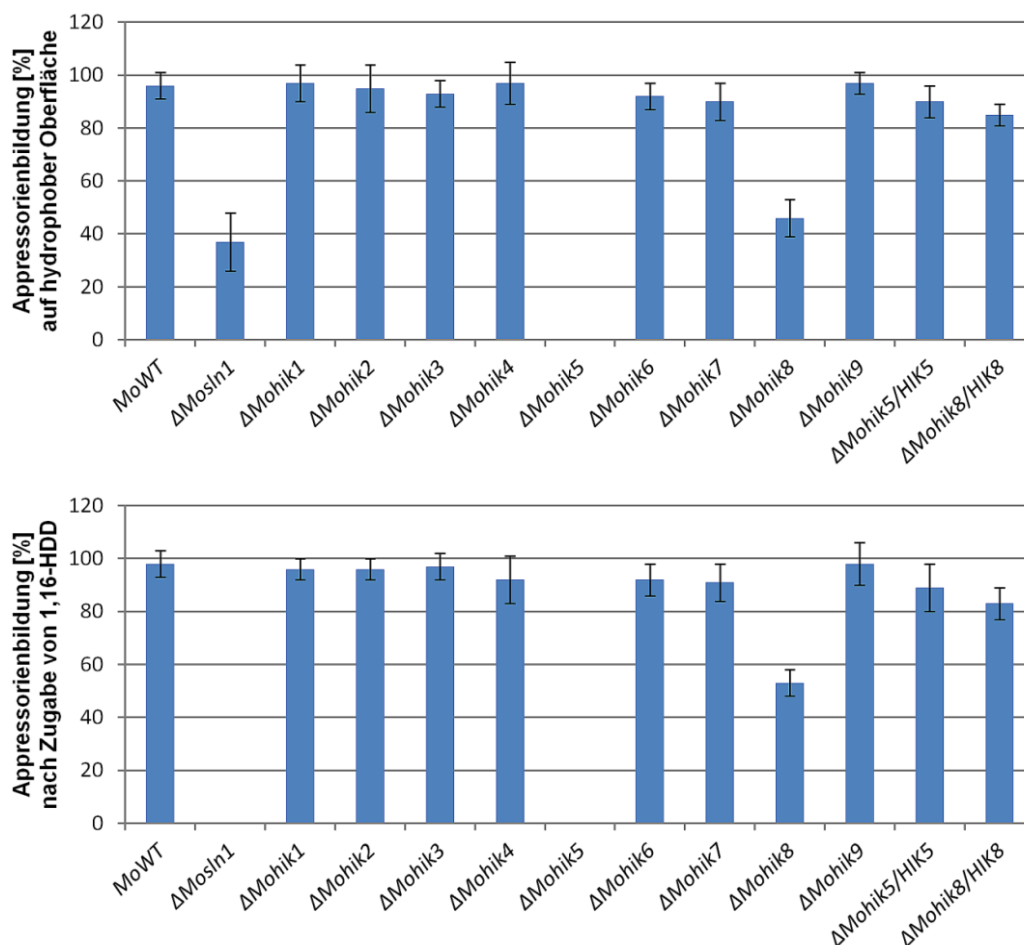
**Abb. 19: Konidienform der Mutantenstämmen  $\Delta$ Mohik5 und  $\Delta$ Mohik8.** Konidien von *M. oryzae* sind dreizellig und ellipsoid. Im Gegensatz dazu sind Konidien der Kulturen  $\Delta$ Mohik5 und  $\Delta$ Mohik8 ein- bis zweizellig und von rundlicher Form.



Die Form der Konidien der übrigen Mutantenstämme war im Vergleich zum WT unverändert. Nach einer Komplementation der Mutanten durch Reintegration der intakten Gene *MoHIK5* und *MoHIK8* waren die Konidien der Stämme  $\Delta$ *Mohik5/HIK5* und  $\Delta$ *Mohik8/HIK8* meist dreizellig (siehe Abb. 21). Ein- bis zweizellige Konidien rundlicher Gestalt waren nur noch vereinzelt zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

#### 5.2.4 Die Appressoriendifferenzierung in Histidinkinase-Mutanten von *Magnaporthe oryzae*

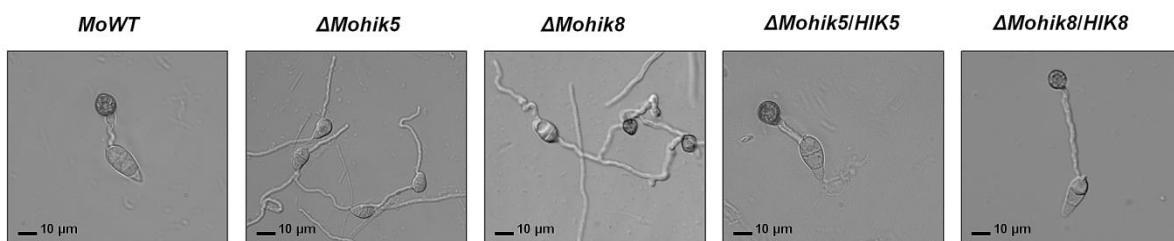
Physikalische Reize wie eine hydrophobe Oberfläche oder chemische Stimuli wie 1,16-HDD sind dafür bekannt, die Appressoriendifferenzierung in *M. oryzae* auszulösen (Lee und Dean, 1994; Gilbert und Dean, 1996). Die Fähigkeit der Mutantenstämme zur Differenzierung der Infektionsstrukturen wurde sowohl auf hydrophoben Deckgläsern als auch nach Applikation von 1,16-HDD untersucht. Dabei waren die Mutanten  $\Delta$ *MosIn1*,  $\Delta$ *Mohik5* und  $\Delta$ *Mohik8* auffällig. Die restlichen HIK-Mutanten waren im Hinblick auf die Differenzierung in der Form und in der Anzahl an Appressorien nicht vom WT zu unterscheiden (Abb. 20).



**Abb. 20: Appressorienbildung der Histidinkinase-Mutanten auf hydrophober Oberfläche oder nach Zugabe von 1,16-HDD.** Die Anzahl der nach 16 h Inkubation differenzierten Appressorien pro Einhundert gekeimten Konidien ist dargestellt.



Auf hydrophober Oberfläche waren bei  $\Delta MosIn1$  wenige deformierte Appressorien zu erkennen. Dies stimmt mit den Angaben anderer Forschergruppen überein (Zhang *et al.*, 2010). Nach der Zugabe von 1,16-HDD zu den keimenden Konidien von  $\Delta MosIn1$  war keine Differenzierung von Infektionsstrukturen festzustellen. Gleiche Ergebnisse wurden für die Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  beobachtet (Daten nicht gezeigt). Der Mutantenstamm  $\Delta Mohik5$  konnte weder mit physikalischen noch mit chemischen Stimuli Appressorien bilden. Bei der Mutante  $\Delta Mohik8$  waren mit beiden Stimuli jeweils eine weitaus geringere Anzahl an deformierten Infektionsstrukturen im Vergleich zum WT zu beobachten (Abb. 21).



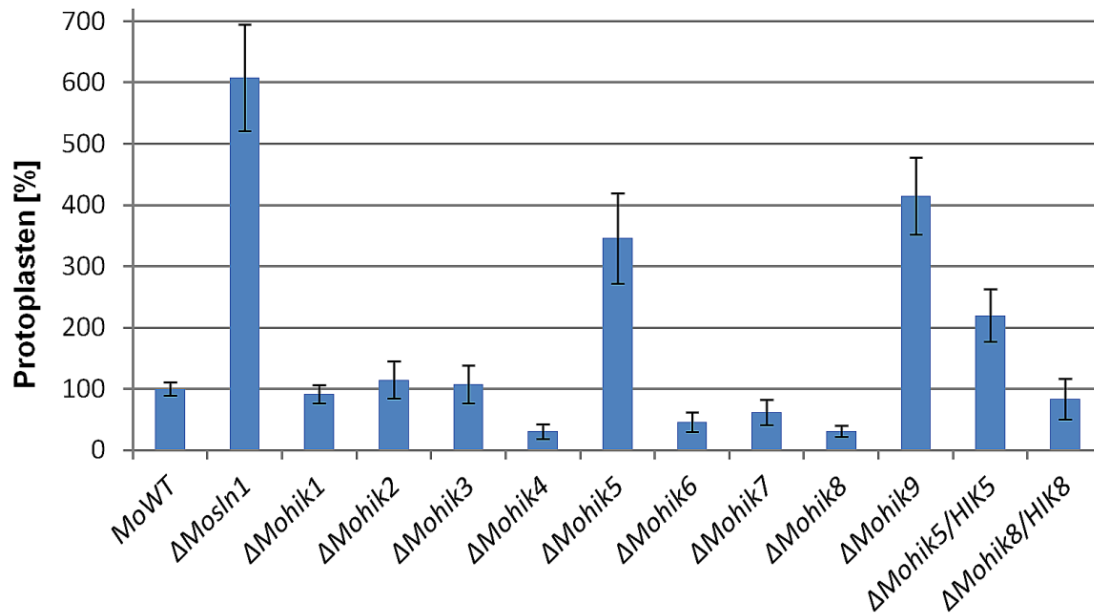
**Abb. 21: Appressoriendifferenzierung in  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  auf hydrophober Oberfläche.** Der Wildtypstamm bildet einen kurzen Keimschlauch und differenziert ein kugelförmiges Appressorium. Die Mutante  $\Delta Mohik5$  bildet lange Keimschläuche, an deren Apex keine Appressorien differenzieren und  $\Delta Mohik8$  bildet wenige deformierte Appressorien.

In allen durchgeführten Tests mit  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  hatten sich erheblich längere Keimschläuche als beim WT differenziert. Die komplementierten Stämme  $\Delta Mohik5/HIK5$  und  $\Delta Mohik8/HIK8$  bildeten nach der Reintegration der intakten Gene *MoHIK5* bzw. *MoHIK8* in allen Ansätzen Appressorien, die in Form und Funktion vergleichbar mit dem WT waren (Abb. 21).

### 5.2.5 Die Zellwandstabilität in Histidinkinase-Mutanten von *Magnaporthe oryzae*

Nach der Inkubation des Myzels der zu untersuchenden Kulturen mit lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum* konnten bei den Mutantenstämmen  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  eine drei- bis sechsfach erhöhte Anzahl an Protoplasten im Vergleich zum WT beobachtet werden. Beim Komplementationsstamm  $\Delta Mohik5/HIK5$  waren es etwa doppelt so viele wie beim WT (Abb. 22). Während nach der Inkubationszeit in den Ansätzen des WTs noch Reste von Myzel vorzufinden waren, konnten bei  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  neben den Protoplasten keine Myzelreste identifiziert werden. Nach der Inkubation der Mutantenstämmen  $\Delta Mohik4$ ,  $\Delta Mohik6$  und  $\Delta Mohik8$  wurde eine um etwa die Hälfte geringere Anzahl an Protoplasten als beim WT festgestellt.

Hyphen der Stämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  unterliegen bereits nach fünf bis zehn Tagen Wachstum auf CM bei 26°C der Autolyse. Bei den restlichen Mutantenstämmen und war diesbezüglich kein Unterschied zum WT erkennbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 22:** Test auf Zellwandstabilität in Histidinkinase-Mutanten nach Applikation von lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum*. Es ist die relative Zahl an Protoplasten in den Proben der HIK-Mutanten in Bezug auf den WT dargestellt.

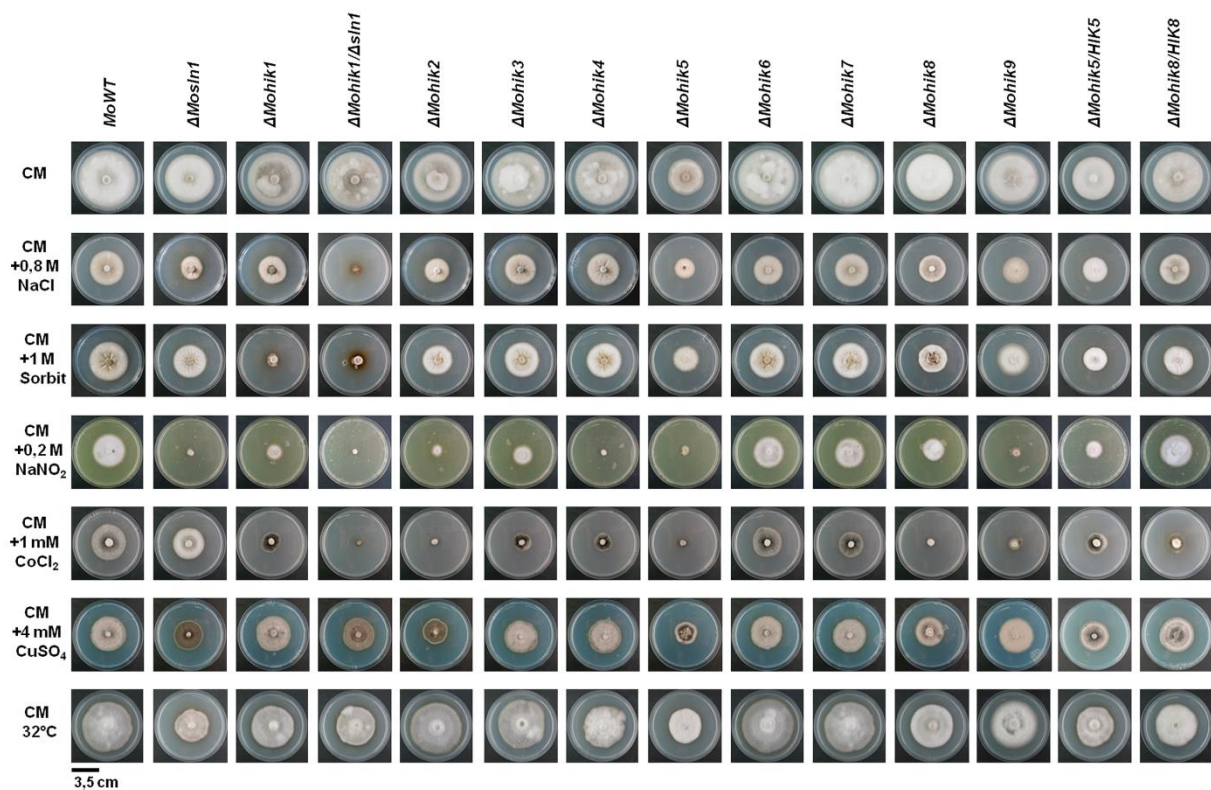
### 5.2.6 Das Wachstum der Histidinkinase-Mutanten unter Stressbedingungen

Das vegetative Wachstum der Mutanten wurde auf verschiedenen Festmedien mit dem Wachstum des WT verglichen, um erste Anhaltspunkte für mögliche Funktionen der inaktivierten Gene bzw. deren Genprodukte im Bezug auf die Vitalität zu erhalten. Verschiedene Umwelteinflüsse wurden unter anderem mit den Zusätzen NaCl (für osmotischen oder Salzstress) oder Sorbit (osmotischer oder Zuckerstress),  $\text{NaNO}_2$  (Salzstress und Hypoxie) oder  $\text{CoCl}_2$  (Hypoxie),  $\text{CuSO}_4$  (Ionenstress) sowie  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ROS, „reactive oxygen species“) oder durch Temperaturveränderungen imitiert. Der Übersichtlichkeit halber sind die Ergebnisse weiterer Wachstumsversuche mit KCl,  $\text{NaNO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Calcofluor White, SDS, Triton-X-100,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{LiCl}_2$  oder  $\text{MnSO}_4$  nicht dargestellt. Bei den nicht nochmals im Verlauf des Ergebnisteils explizit genannten Reagenzien waren, bei der Zugabe in für den WT subletalen Mengen, keine phänotypischen Unterschiede zwischen WT und den untersuchten Mutantenstämmen zu beobachten.

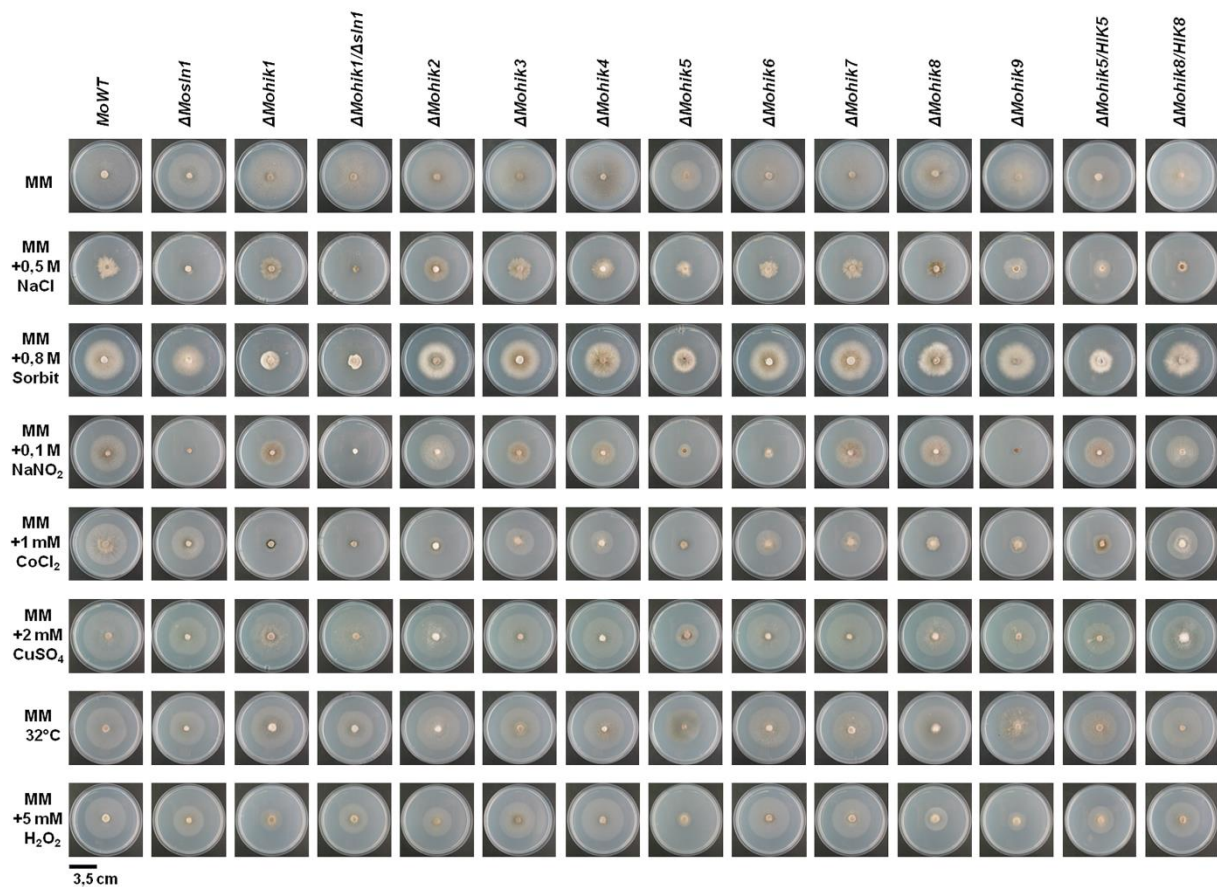
Der Koloniedurchmesser von Kulturen der Mutantenstämmen  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  war bei der Kultivierung auf CM und auf MM signifikant geringer im Vergleich zum

WT. Der Koloniedurchmesser des Stamms  $\Delta Mohik5$  betrug nur etwa die Hälfte von dem des WT (Abb. 23, Abb. 24). Bei dem Mutantenstamm  $\Delta Mohik7$  war eine durch ringförmig abwechselnd helles und dunkles Myzel gekennzeichnete Wachstumszone zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

NaCl und Sorbit haben unterschiedlichen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Kulturen. Die Wachstumszonen von  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik1$ ,  $\Delta Mohik2$  und  $\Delta Mohik9$  waren auf CM, das mit den osmotisch aktiven Verbindungen versetzt war, kleiner als die des WT. Auf MM hingegen waren die Kolonien von  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mohik8$  geringer im Durchmesser verglichen mit dem WT (Abb. 24). Sowohl die Unterschiede zwischen  $\Delta MosIn1$  und  $\Delta Mohik1$ , als auch die erhöhte Sensitivität der Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta sIn1$  wurden bereits im ersten Teil dieser Arbeit dargelegt (Abb. 10).



**Abb. 23: Wachstumsversuche mit den Histidinkinase-Mutanten unter Stress auf verschiedenen CM-Festmedien.** Die Kulturen wurden 10 Tage auf CM mit den Reagenzien NaCl, Sorbit,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_2$  oder  $\text{CuSO}_4$  bei  $26^\circ\text{C}$  kultiviert. Die Koloniedurchmesser sowie die entsprechenden Normalisierungen sind in Anhang IV aufgelistet (Tab. 9, Tab. 10).



**Abb. 24: Wachstumsversuche mit den Histidinkinase-Mutanten unter Stress auf verschiedenen MM-Festmedien.** Die Kulturen wurden 10 Tage auf MM mit den Reagenzien NaCl, Sorbit,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{NaNO}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  oder  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei  $26^\circ\text{C}$  kultiviert. Die Koloniedurchmesser sowie die entsprechenden Normalisierungen sind in Anhang IV aufgelistet (Tab. 9, Tab. 10).

Nach Zugabe von Nitrat (bis  $0,5\text{ M NaNO}_3$ ) im Kulturmedium (CM oder MM) waren keine besonderen Effekte bezüglich vegetativen Wachstums der Mutanten im Vergleich zum WT festzustellen. Lediglich bei  $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{sin1}$  war keine Wachstumszone zu sehen, bereits ab einer Konzentration von  $0,3\text{ M NaNO}_3$  war kein Wachstum zu beobachten. Die gleichen Resultate konnten mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  im Medium ermittelt werden (Daten nicht gezeigt).

Der Einfluss von Nitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) war wesentlich stärker als der von Nitrat. Nur das Wachstum der Mutantenstämme  $\Delta\text{Mohik7}$  und  $\Delta\text{Mohik8}$  glich auf mit  $\text{NaNO}_2$  versetztem CM und MM dem des WT, die restlichen Mutantenstämme hatten kleinere Koloniedurchmesser. Den stärksten Einfluss hatte Nitrit auf die Mutantenstämme  $\Delta\text{Mohik5}$  und  $\Delta\text{Mohik9}$ . Bei der Zugabe von Nitrit zu CM oder zu MM war für diese Mutanten kein Wachstum zu sehen (Abb. 23, Abb. 24).

Die Ergebnisse der Versuche mit  $\text{NaNO}_2$  sind mit den Resultaten der Wachstumsversuche mit  $\text{CoCl}_2$  vergleichbar. Denn auch  $\text{CoCl}_2$  hatte große Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten der getesteten Kulturen. Besonders die Koloniedurchmesser der

Stämme, bei denen Gene mit konservierten PAS-Domänen inaktiviert wurden – und zwar  $\Delta Mohik2$ ,  $\Delta Mohik4$ ,  $\Delta Mohik5$ ,  $\Delta Mohik8$  und  $\Delta Mohik9$  – waren wesentlich kleiner verglichen mit dem WT (Abb. 23, Abb. 24).

$CuSO_4$  im Kulturmedium induzierte eine Dunkelfärbung des Myzels bei den Kulturen der Stämme  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik2$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$ . Außerdem hatten diese Kulturen eine kleinere Wachstumszone im Vergleich zum WT (Abb. 23, Abb. 24).

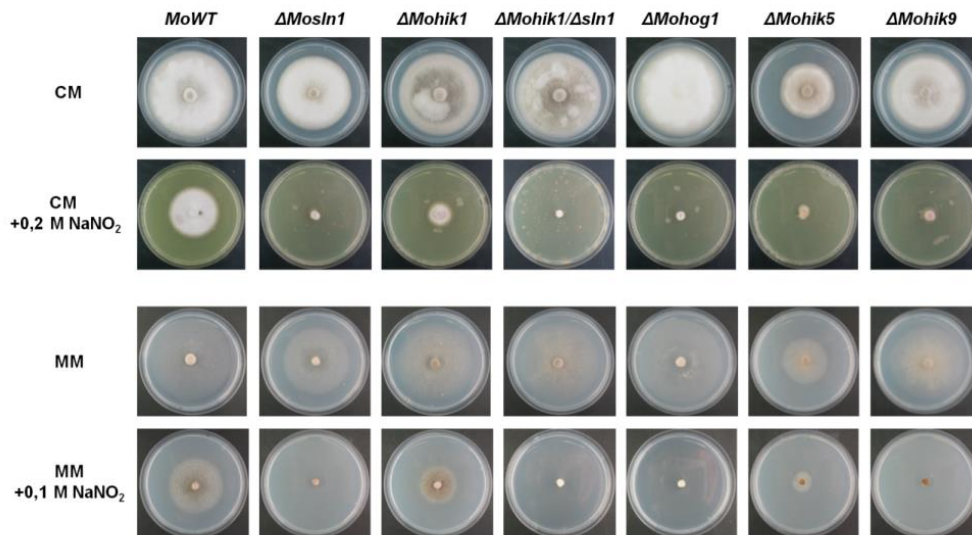
Wachstumsversuche bei einer erhöhten Temperatur von 32°C resultierten in unwesentlich kleineren Koloniedurchmessern bei  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik1$ ,  $\Delta Mohik4$ ,  $\Delta Mohik8$  sowie bei  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  verglichen mit dem WT (Abb. 23, Abb. 24). Die Wachstumszonen bei 20°C waren bei allen getesteten Kulturen analog zum WT (Daten nicht gezeigt).

Die Zugabe von  $H_2O_2$  in MM hatte auf nahezu alle Mutantenstämme mehr Einfluss als auf den WT. Der Koloniedurchmesser von  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  war am kleinsten. Eine Ausnahme hiervon bilden  $\Delta Mohik4$ ,  $\Delta Mohik6$  und  $\Delta Mohik7$ , deren Koloniedurchmesser ähnlich dem des WTs war (Abb. 24).

### 5.2.7 Hypoxie ( $NaNO_2$ ) und der HOG-Signalweg

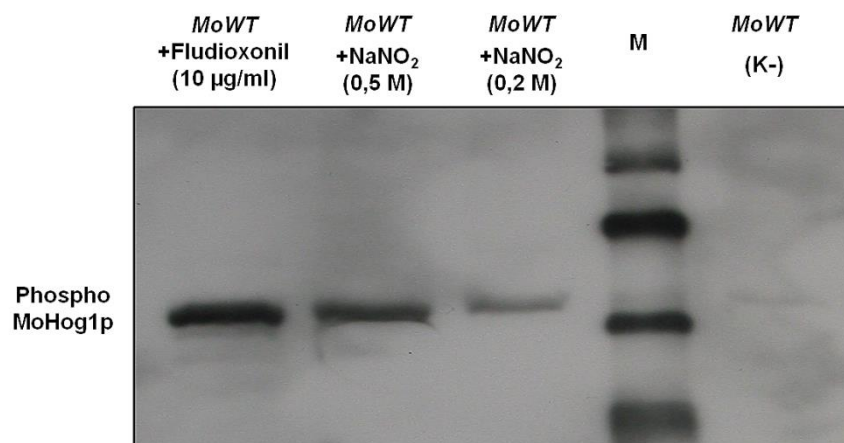
Die Mutantenstämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  sowie die Mutantenstämme mit inaktiviertem HOG-Signalweg waren auffallend stark von  $NaNO_2$  oder  $CoCl_2$  beeinflusst (Abb. 23, Abb. 24). Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Ergebnisse der Wachstumstests ausgewählter Mutantenstämme auf Nährmedium mit  $NaNO_2$  separat vergleichend abgebildet. Dies sind die Stämme  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik1$ ,  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$ ,  $\Delta Mohog1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$ . Diese Mutanten hatten nach Kultivierung unter  $NaNO_2$ -Einfluss auf Komplett- und MM die kleinsten bzw. gar keine Wachstumszonen ausgebildet. Beim WT war im Vergleich dazu immer vegetatives Wachstum festzustellen (Abb. 25).





**Abb. 25: Wachstumsversuche mit Mutanten auf Festmedium mit  $\text{NaNO}_2$ .** Die Kulturen wurden auf CM- oder MM mit  $\text{NaNO}_2$  10 Tage bei  $26^\circ\text{C}$  kultiviert.

Eine mögliche Aktivierung des HOG-Signalwegs durch Hypoxie-imitierende Agenzien wurde durch Applikation von  $\text{NaNO}_2$  analysiert. Diese Untersuchung wurde mittels Western Blot-Analyse unter Verwendung eines phospho-MoHog1p-spezifischen Antikörpers durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigten die Vermutung einer Phosphorylierung von MoHog1p in *M. oryzae* durch Zugabe von  $\text{NaNO}_2$ . Dosisabhängige Chemolumineszenzsignale, ausgelöst durch  $\text{NaNO}_2$ , waren auf dem Röntgenfilm zu beobachten (Abb. 26). Eine Applikation der Positivkontrolle Fludioxonil führte zu ähnlichen Signalen. Die Chemolumineszenzsignale sind durch den Vergleich mit dem Marker auf Proteine einer Größe von etwa 40 kDa (MoHog1p hat 42 kDa) zurückzuführen.

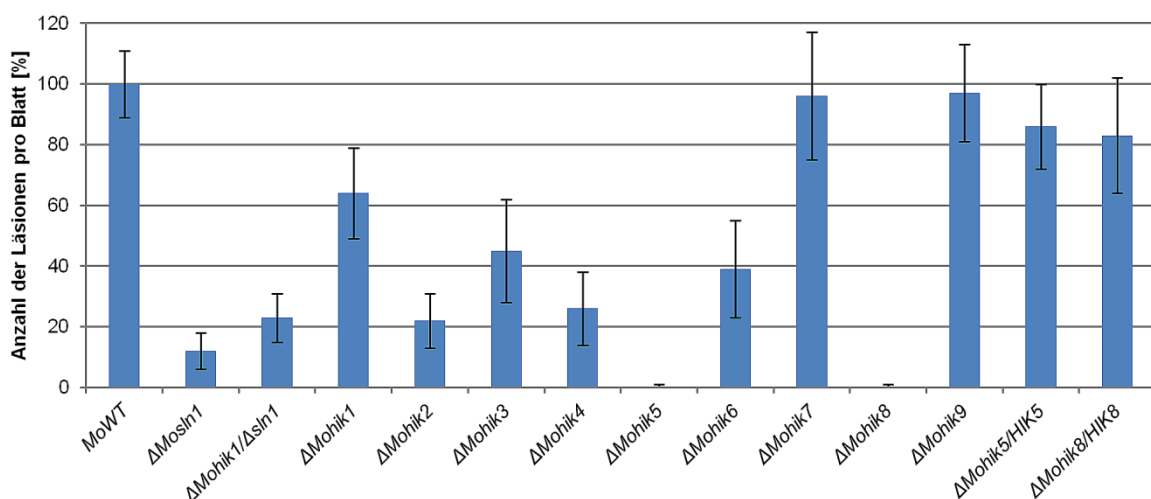


**Abb. 26: Western Blot-Analyse von MoHog1p in *Magnaporthe oryzae* bei  $\text{NaNO}_2$ -Zugabe.** Die Phosphorylierung von MoHog1p wurde in Proteinextrakten des WTs untersucht. Die Kulturen wurden mit  $\text{NaNO}_2$  inkubiert. K- = Negativkontrolle ohne Wirkstoffzugabe, M = biotinylierter Proteinmarker.

In weiteren Analysen mit den Mutantenstämmen  $\Delta Mohog1$ ,  $\Delta Mopbs2$ ,  $\Delta Mossk2$ ,  $\Delta Mossk1$  und  $\Delta Moypd1$  konnte nachgewiesen werden, dass durch  $\text{NaNO}_2$  in Proben von Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg keine Phosphorylierungssignale detektiert werden können (Daten nicht gezeigt). Klare Phosphorylierungssignale waren jedoch in den Proben der Mutantenstämme  $\Delta Mosln1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

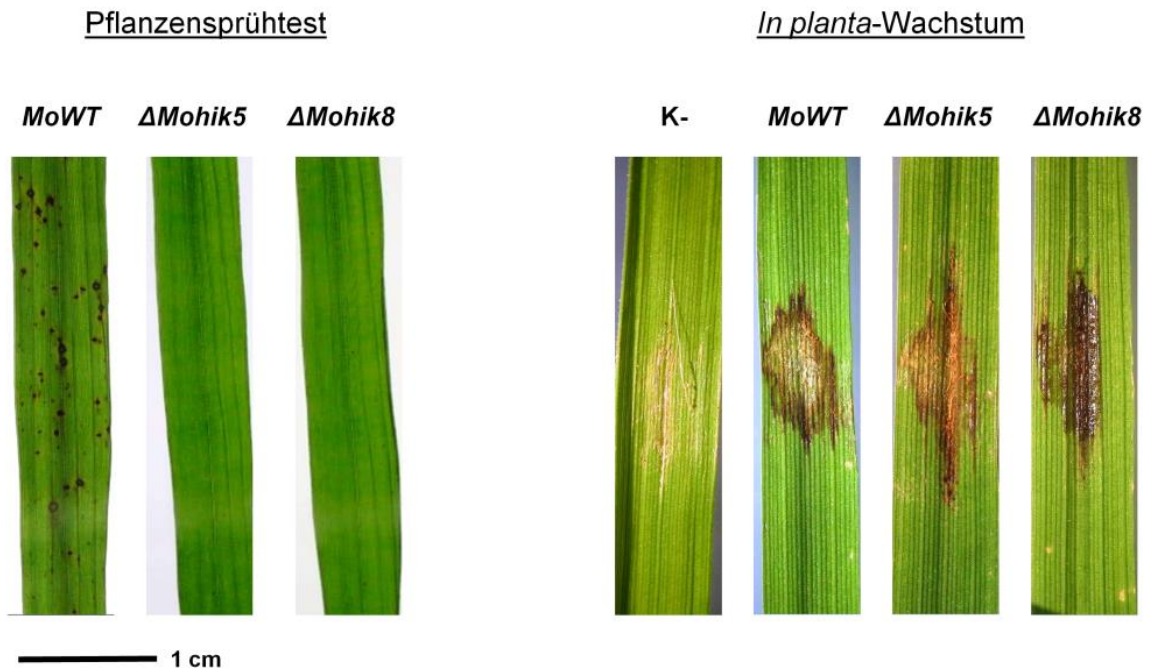
### 5.2.8 Pathogenitätstest mit Reispflanzen und Wachstum *in planta*

Um die möglichen Funktionen von HIKs oder deren codierenden Genen in pathogenitätsrelevanten Differenzierungsprozessen zu untersuchen, wurden Infektionstests mit Konidien des WT und den HIK-Mutanten auf Reispflanzen durchgeführt. Die Anzahl der Läsionen auf den mit Konidien der HIK-Mutanten besprühten Pflanzenblättern war im Vergleich zum WT bei allen Mutantenstämmen außer  $\Delta Mohik1$ ,  $\Delta Mohik6$  und  $\Delta Mohik9$  um mindestens 50 % reduziert (Abb. 27). Nach den Infektionstests mit Konidiensuspensionen von  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  konnten auf den Reisblättern keine Läsionen erkannt werden (Abb. 28). Die Testergebnisse der komplementierten Mutantenstämme  $\Delta Mohik5/HIK5$  und  $\Delta Mohik8/HIK8$  waren bezüglich der Anzahl der Läsionen innerhalb der Fehlergrenzen analog zu den Beobachtungen beim WT (Abb. 27). In zuvor dargelegten Testergebnissen konnten bereits für die Mutantenstämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  eine deutliche Veränderung der Konidienform sowie das Fehlen bzw. die Fehlbildung von Appressorien beobachtet werden (Abb. 19, Abb. 21).



**Abb. 27: Pathogenitätstest mit den Histidinkinase-Mutanten auf Reispflanzen.** Die Anzahl von Läsionen pro Blatt nach dem Besprühen von Reispflanzen mit Konidiensuspensionen der HIK-Mutanten ist in Relation zu der Anzahl von Läsionen des WT gesetzt.

Das *in planta*-Wachstum war bei keinem der getesteten Mutantenstämme beeinflusst. Nach der Applikation von Konidiensuspensionen auf verwundete Blätter war nekrotisches Pflanzengewebe sowohl bei der Positivkontrolle als auch bei allen anderen Proben der Teststämme zu sehen. Exemplarisch sind die Ergebnisse der Pflanzentests des WT,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  dargestellt (Abb. 28).



**Abb. 28:** Pathogenitätstests mit *Magnaporthe oryzae* 70-15,  $\Delta Mohik5$  sowie  $\Delta Mohik8$  auf Reispflanzen und *in planta*. Die Penetrationsfähigkeit wurde durch Besprühen von intakten Reispflanzen mit Konidiensuspensionen untersucht (links). Das *in planta*-Wachstum wurde durch die Applikation von Konidiensuspensionen auf verwundeten Blattoberflächen analysiert (rechts).



## 6 DISKUSSION

Gesteuerte Differenzierungsprozesse, als Antwort auf Signale aus der Umwelt, sind von großer Relevanz für pathogene Organismen. Sie sind zum einen oftmals essenziell für die komplexen Lebenszyklen dieser Organismen und sind zum anderen notwendig für deren erfolgreiche Verbreitung. Die Differenzierungsprozesse haben sich im Laufe der Evolution vor allem in eukaryotischen Pathogenen einhergehend mit Signaltransduktionsmechanismen in entsprechenden Netzwerken entwickelt. Die Lebenszyklen von pathogenen Organismen erfordern eine schnelle, situationsangepasste Erkennung von und Reaktion auf sich verändernde Umwelteinflüsse und Signale, wie sie z.B. im Laufe der infektiösrelevanten Morphogenese auftreten (Viaud *et al.*, 2006; Nemecek *et al.*, 2006; Islas-Flores *et al.*, 2011).

Bei phytopathogenen Pilzen wie *M. oryzae* finden solche pathogenitätsrelevanten Differenzierungsprozesse im Verlauf der Adhäsion und Keimung der Konidien auf der Blattoberfläche statt oder bei der darauffolgenden Ausbildung des Appressoriums. Weitere signalgesteuerte Lebensphasen schließen sich nach der Penetration der Kutikula während des weitgehend noch unverstandenen Wachstums *in planta* bei der Kolonisierung der Wirtspflanze und der anschließenden Konidiogenese an.

Signaltransduktions- und Differenzierungsprozesse sind in der Pflanzenschutzforschung wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer Strategien zur Bekämpfung bzw. Prävention von Pflanzenschädlingen. Ein besonderer Signalweg ist in diesem Kontext der „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg in pathogenen filamentösen Pilzen. Er hat hoch spezifische Elemente für pathogene Organismen und ist adressierbar als Fungizidtarget. Der HOG-Signalweg, bzw. Proteine daraus können in Testsystemen zur Findung neuer Wirkstoffe adressiert werden. Die Gruppe III HIK ist bereits ein validiertes Target des weltweit im Agrarsektor genutzten Fungizids Fludioxonil (Motoyama *et al.*, 2005a; Tanaka, 2010).

Das Phenylpyrrol Fludioxonil beeinflusst die Osmoregulation und bewirkt eine Hyperaktivierung der MAPK Kaskade des HOG-Signalwegs. Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht vollkommen verstanden - lediglich eine Eingrenzung des Wirkortes von Fludioxonil auf eine Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase (HIK) innerhalb des Phosphorelaysystems im HOG-Signalweg pathogener Pilze ist postuliert (Motoyama *et al.*, 2005a). Das Verständnis des Wirkmechanismus von Fludioxonil sowie der Architektur des Phosphorelaysystems in *M. oryzae* stand im Fokus des ersten Teils dieser Arbeit. Im zweiten Teil wurden umfassende Untersuchungen zu allen HIK-codierenden Genen in *M. oryzae* durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung der korrespondierenden Proteine an Signaltransduktionsprozessen, wie zum Beispiel der Osmoregulation, aufdecken oder ausschließen zu können.

## 6.1 Der HOG-Signalweg in *Magnaporthe oryzae*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der HOG-Signalweg in *M. oryzae* untersucht und modellhaft dargestellt. Dabei konnten erstmals genetische sowie proteinbiochemische Beweise erbracht werden, dass das Phosphotransferprotein MoYpd1p eine Funktion im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs hat und am Wirkmechanismus des kommerziellen Fungizids Fludioxonil beteiligt ist.

### 6.1.1 Sequenzanalysen zu Proteinen des HOG-Signalwegs in *Magnaporthe oryzae*

Durch Sequenzanalysen und Homologievergleiche von Aminosäuresequenzen der Proteine des HOG-Signalwegs aus *S. cerevisiae* konnten in den Datenbanken des Broad Instituts homologe Proteinsequenzen in *M. oryzae* identifiziert und analysiert werden. Die Sequenzen der Proteine MoSln1p (MGG\_07312), MoHik1p (MGG\_11174), MoYpd1p (MGG\_07173), MoSsk1p (MGG\_02897), MoSsk2p (MGG\_00183), MoPbs2p (MGG\_10268) und MoHog1p (MGG\_01822) wurden als homolog zu den Aminosäuresequenzen der Proteine des HOG-Signalwegs aus *S. cerevisiae* identifiziert (Tab. 1). Die durch die Algorithmen des NCBI errechneten Ähnlichkeitswerte (E-values) waren hoch signifikant. Der für einen Homologievergleich angegebene E-value steht für die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Treffer nicht zufällig ermittelt wurde und ist von einer ganzen Reihe von Faktoren abhängig. Die Länge der Sequenz, die Übereinstimmung von konservierten Bereichen innerhalb der Sequenz und auch die Größe sowie Art der verwendeten Datenbank hat Einfluss auf diesen Wert. Ein E-value von 0.0, wie im Ergebnis des Vergleichs der Aminosäuresequenzen von Hog1p aus *S. cerevisiae* und MoHog1p aus *M. oryzae*, bedeutet nicht zwangsläufig, dass die beiden Proteine identisch sind. Der E-value wird bereits als 0.0 angegeben, wenn der in der Berechnungsmatrix angegebene Schwellenwert unterschritten wird (Altschul *et al.*, 1990; Altschul und Gish, 1996; Altschul *et al.*, 1997).

Die basierend auf Homologievergleichen erstellten Vermutungen über die putativen Funktionen der ausgewählten Proteine im HOG-Signalweg des phytopathogenen Pilzes wurden durch die Ermittlung der konservierten Domänen der Aminosäuresequenzen gestützt. Wie zu erwarten war, konnten für die HIKs MoSln1p und MoHik1p je eine Histidinkinase-Domäne, eine Histidin-ATPase-Domäne, sowie eine regulatorische Domäne vorhergesagt werden (Abb. 3). Mit diesen Domänen könnten die Proteine die typischen Funktionen und Reaktionen einer Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase ausführen (Abb.1).

Die HIK MoSln1p ist das membranständige Homolog zu Sln1p aus *S. cerevisiae*, was durch den sehr kleinen E-value beim Homologievergleich und das Lokalisieren einer N-terminalen Transmembrandomäne bestätigt wird. Auch wenn Sln1p aus *S. cerevisiae* zwei (Wurgler-Murphy und Saito, 1997) und MoSln1p nur eine Transmembrandomäne hat, ist die Architektur der beiden Sensorproteine dennoch so ähnlich, dass die Annahme einer ähnlichen Funktionsweise zulässig ist.

Das Protein MoHik1p ist eine zytosolisch lokalisierte HIK ohne Transmembrandomänen. Die fünf HAMP-Domänen von MoHik1p sind charakteristisch für dessen Zuordnung zu den HIKs in Gruppe III. Die Ähnlichkeit in Aufbau und Funktion von Gruppe III- und Gruppe VI-HIKs wurde bereits durch Komplementationsexperimente bestätigt. Mit der Gruppe III-HIK DhNik1p aus der stark osmo- und halotoleranten Hefe *Debaryomyces hansenii* (Prista *et al.*, 2005; Aggarwal und Mondal, 2006) kann die *SLN1*-Mutation in *S. cerevisiae* komplementiert werden. Die Funktion von Sln1p als Osmosensor wird dann von DhNik1p ausgeführt (Meena und Mondal, 2010). Die für diese Gruppe charakteristischen HAMP-Domänen sind in Signaltransduktionsprozessen sowohl in Pro-, als auch in Eukaryoten weit verbreitet. HAMP-Domänen von membrandurchspannenden oder membrangebundenen Proteinen sind auf zytosolischer Seite der Membran lokalisiert. Dort vermitteln sie membranübergreifende oder intrazelluläre bzw. intermolekulare Interaktionen (Parkinson, 2010; Pollard *et al.*, 2009; Swain und Falke, 2007; Tao *et al.*, 2002). Die HAMP-Domänen werden auch mit der Wirkungsweise und des Wirkmechanismus von Fludioxonil in Verbindung gebracht. Die heterologe Expression des Proteins CaNik1p aus *C. albicans* bewirkt, dass die resistente Hefe *S. cerevisiae* sensitiv gegenüber Fludioxonil wird. Eine genetische Manipulation in Form von einer Verringerung der Anzahl der HAMP-Domänen von CaNik1p führt nach heterologer Expression zu einer Verminderung der Sensitivität des generierten Transformantenstammes gegenüber dem Fungizid (Buschart *et al.*, 2012).

MoYpd1p ist ein kleines Protein mit einer konservierten Histidin-Phosphotransfer-Domäne (HPt). Es werden zwei mögliche Proteinsequenzen, Variante [A] und Variante [B], in den Datenbanken des Broad Instituts angegeben. Aufgrund von Homologievergleichen und Datenbankrecherchen die Wahrscheinlichkeit höher, dass die Variante [B] mit 136 Aminosäuren die genauere Vorhersage ist (Abb. 4). Zu dem in Variante [A] zusätzlich vorhandenen N-terminalen Sequenzabschnitt sind keine Homologien von Phosphotransferproteinen von filamentösen Pilzen in den Datenbanken zu finden. Die homologen Proteinsequenzen beginnen nahezu alle am N-Terminus der Variante [B] von MoYpd1p. Weiterhin stützen q-PCR-Experimente die Annahme, dass es sich bei Variante [B] um die richtige handelt. Beide vom Broad Institut errechneten Varianten beruhen auf mathematischen Algorithmen und sind daher nicht durch physiologische Experimente bestä-

tigt. In dieser Arbeit wurde in allen Experimenten mit der Variante [B] von MoYpd1p gearbeitet.

Histidin-Phosphotransferproteine haben konservierte Module mit einem Histidinrest, der den Phosphattransfer vermittelt. Für den Modellorganismus *S. cerevisiae* sind detaillierte Informationen für dieses konservierte Modul der HPt-Domäne in der Literatur zu finden. Die Domäne hat vier gebündelt angeordnete  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A,  $\alpha$ B,  $\alpha$ C,  $\alpha$ D) als Kernstruktur, wobei Helix  $\alpha$ C den phosphatbindenden Histidinrest beinhaltet. Des Weiteren sind Bindestellen an Ypd1p aus *S. cerevisiae* für die Interaktion mit Ssk1p sowie mit Sln1p beschrieben (Lee *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2003). Es sind Arbeiten über den filamentösen Pilz *E. nidulans* zur biochemischen Interaktion *in vitro* von dessen Phosphotransferprotein YpdAp in His-Asp-Systemen zu finden (Azuma *et al.*, 2007). Die Domänenstruktur der HPt-Domäne von MoYpd1p ist stark homolog zu der HPt-Domäne von Ypd1p aus *S. cerevisiae*. MoYpd1p könnte somit ähnlich wie Ypd1p in *S. cerevisiae* oder YpdAp in *E. nidulans* die zentrale Rolle als Signalvermittler im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs von *M. oryzae* einnehmen.

MoSsk1p hat eine C-terminale regulatorische Domäne und ist denkbar als terminaler Phosphatakzeptor im Phosphorelaysystem (Motoyama *et al.*, 2008). MoSsk2p, MoPbs2p und MoHog1p haben jeweils eine Serin/Threonin/Tyrosinkinase-Domäne, deren Homologie zu den korrespondierenden Proteinen aus *S. cerevisiae* sehr hoch ist (Tab. 1).

### 6.1.2 Die Inaktivierung von *MoYPD1* ist in *Magnaporthe oryzae* nicht letal

Die wichtige Funktion des Phosphotransferproteins Ypd1p als Signalvermittler ist nicht nur in *S. cerevisiae*, sondern auch in diversen anderen pilzlichen Organismen beschrieben. In den meisten bekannten Genomen von Pilzen – so auch in *M. oryzae* – ist unabhängig von der Komplexität des bewohnten Habitats oder des Lebenszyklus nur ein *YPD1*-Homolog lokalisiert. Ein direkter Bezug zwischen der Anzahl an Phosphotransferproteinen und der Diversität der ökologischen Nische lässt sich anders als bei den HIKs nicht unmittelbar ableiten.

Die Inaktivierung des Gens *YPD1* resultiert in *S. cerevisiae*, ebenso wie die Inaktivierung von *SLN1*, in einem letalen Phänotyp (Posas, 1996). Auch eine Inaktivierung des *YPD1*-Homologs *CnYPD1* in dem humanpathogenen Basidiomycet *Cryptococcus neoformans* ist letal (Lee *et al.*, 2011). Als essenziell für die Lebensfähigkeit des Pilzes werden des Weiteren die *YPD1*-homologen Gene *HPT-1* für *N. crassa* und *ypdA* für *E. nidulans* beschrieben (Vargaz-Perez *et al.*, 2007; Banno *et al.*, 2007). Eine Inaktivierung des Gens *HPT-1* ist nur in Mutanten mit inaktiviertem MAPK-Gen *OS-2* (ein *HOG1*-Homolog) möglich. Das deutet auf dessen

Wichtigkeit bei der Aufrechterhaltung der Phosphorylierungen im Phosphorelaysystem hin. Eine Unterbrechung der konstitutiven Phosphorylierung führt zur unkontrollierten Aktivierung des HOG-Signalwegs. Durch eine unkontrollierte Aktivierung der Signalkaskade werden die Reaktionen auf osmotischen Stress, wie z.B. die Akkumulation von Osmolyten, dauerhaft ausgeführt. Das ist letal für den Organismus (Banno *et al.*, 2007).

Interessanterweise ist das *YPD1*-Homolog *MPR1* (auch bekannt als *SPY1*) aus *Schizosaccharomyces pombe* nicht unabdingbar für deren Überleben. In *S. pombe*  $\Delta$ *spy1*-Mutantenstämmen werden keine Veränderung zum WT festgestellt, die auf Funktionen des Gens *SPY1* in der Osmoregulation hindeuten (Aoyama *et al.*, 2000). Ypd1p hat somit variierende Funktionen in verschiedenen Pilzen, unabhängig davon, ob diese in komplexen Umweltnischen vorkommen, filamentös wachsen oder pathogen sind (Lee *et al.*, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung des Gens *MoYPD1* in *M. oryzae* nicht letal ist und einen interessanten Phänotyp ergibt. Der HOG-Signalweg in *M. oryzae* und insbesondere dessen Phosphorelaysystem scheint anders aufgebaut zu sein als in *S. cerevisiae*, *C. neoformans* und *N. crassa*. Die q-PCR-Analyse bestätigt die Inaktivierung des Gens *MoYPD1*. In einer durch Reintegration von *MoYPD1* im entsprechenden Locus (MGG\_07173) der Mutante  $\Delta$ *Moypd1* generierten Komplementationsmutante  $\Delta$ *Moypd1/YPD1* konnte eine Transkriptmenge, etwa 60 % derer des WTs erreicht, gemessen werden (Abb. 5). Ein möglicher Grund für die Abweichung der Transkriptmenge zwischen  $\Delta$ *Moypd1/YPD1* und dem WT könnte in der Tatsache begründet sein, dass aus klonierungsstrategischen Gründen nicht der gesamte 3'-UTR-Bereich in die Konstruktion des Komplementationsvektors mit einbezogen wurde und so die Transkription von *MoYPD1* in  $\Delta$ *Moypd1/YPD1* nicht in vollem Umfang stattfinden könnte. Da die 3'UTR-Bereiche von wenigen Hundert bis zu mehreren Tausend Nukleotiden bestehen können und die diesbezüglichen Angaben in den Datenbanken nur Schätzwerte sind, werden diese Bereiche im Allgemeinen nicht vollständig in die Planung von Komplementationskonstrukten miteinbezogen.

### 6.1.3 Die Inaktivierung von *MoYPD1* führt in *Magnaporthe oryzae* zum Albino-Phänotyp

Durch die Geninaktivierung von *MoYPD1* entstand eine zum WT morphologisch unterscheidbare Mutante, deren Phänotyp in der Konidiogenese gestört und ein Albino ist (Abb. 6). Ein Albino begründet sich oftmals in einer Störung der Melaninbiosynthese (Chumley und Valent, 1990).

Die Konidiogenese ist ein Schlüsselschritt im Infektionszyklus von *M. oryzae*, denn die asexuellen Konidien sind essenziell für die Verbreitung des Pathogens und für die Neubesiedelung von Wirtspflanzen. Konidien und folglich auch die Appressorien sind unabdingbar, um sich auf der Pflanzenoberfläche anzuheften, anschließend die Kutikula zu durchbrechen und die Pflanze zu kolonisieren (Howard *et al.*, 1991). Genomweite funktionelle Genanalysen von Transkriptionsfaktoren des Homeobox-Typs in *M. oryzae* zeigen die Bedeutsamkeit von *MoHOX2* für die Konidiogenese auf. Mutanten ohne das funktionelle Protein MoHox2p bilden ein Luftmyzel mit Konidiophoren aus, jedoch ohne die Differenzierung von Konidien (Kim *et al.*, 2009). Eine Inaktivierung der Gene *MoSNF1*, *MoMPS1* und *MoTPS1* resultiert in Mutanten mit einer Reduktion bzw. Störung der Konidiogenese (Yi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 2003). Im Falle einer Inaktivierung von *MoSNF1* und *MoMPS1* - beide Gene codieren Proteinkinasen, die Einfluss auf die Appressoriendifferenzierung und somit auf die Pathogenität haben – stützen diese Beobachtungen allgemeine Vermutungen, die Signaltransduktionswege der Konidiogenese in Verbindung mit Signalwegen der Appressoriendifferenzierung bringen. Für den G-Protein gekoppelten Rezeptor Rgs1p wird ebenfalls eine negative Regulation der Konidiendifferenzierung über die G- $\alpha$ -Untereinheit MagBp beschrieben (Liu *et al.*, 2007).

Die Konidienproduktion wurde durch Einzelinaktivierung aller Komponenten des HOG-Signalwegs in den entsprechenden Mutanten von *M. oryzae* signifikant verringert, wobei Kulturen der Mutante  $\Delta Moypd1$  überhaupt keine Konidien bilden. Basierend auf diesen Ergebnissen besteht die Möglichkeit einer Beteiligung des HOG-Signalwegs oder einzelner HOG-assoziiertes Proteine an Signalkaskaden, die für die Konidiogenese wichtig sind. Das Phosphotransferprotein MoYpd1p könnte durch Phosphattransfer eine Verbindung unter den genannten Konidiogeneserelevanten Komponenten und Signalwegen ermöglichen.

Pilze sind dafür bekannt, dass sie neben Sekundärmetaboliten eine Reihe von farbgebenden Pigmenten synthetisieren. Die bekanntesten Vertreter sind das Dihydroxyphenylalanin (DOPA)- und 1,8-Dihydroxynaphthalin (DHN)-Melanin (Langfelder *et al.*, 2003). Je nach Lebensweise oder ökologischer Nische der Pilze hat das in der Zellwand eingelagerte Polymer unterschiedliche Funktionen. Diese reichen von dem Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies über die Festigung der Zellwand bis hin zur Bestimmung der Porengröße und somit der Steuerung der Permeabilität von Membranen (Deising *et al.*, 2000). In melanisierten Appressorien verbleiben Osmolyte innerhalb der Zelle, während Wasser die semipermeable Schicht durchdringen kann. Die Aufnahme von Wasser resultiert in einem hohen Turgor im Appressorium von bis zu 8 MPa, der für das mechanische Durchbrechen der pflanzlichen Kutikula nötig ist (Bastmeyer *et al.*, 2002; Howard *et al.*, 1991). Es erscheint somit schlüssig, dass melanindefiziente Mutanten nicht mehr in der Lage sind in die

Pflanzenzelle einzudringen um das Wirtsgewebe zu kolonisieren. Folglich ist der Biosyntheseweg von DHN-Melanin ein nicht-fungitoxisches Target für eine Reihe von Pflanzenschutzmitteln. Die Reduktasen und Dehydratasen des Synthesewegs sind validierte Angriffspunkte für Tricyclazole (Beam™), Phtalide (Rabcide) oder das Fungizid Carpropamid (Thieron *et al.*, 1998), die seit 40 Jahren erfolgreich im Pflanzenschutz Anwendung finden (Kunova *et al.*, 2012). Weder Pflanzen noch Tiere synthetisieren DHN-Melanin. Der Syntheseort tierischen Melanins unterscheidet sich von dem in Pilzen. Während Melanin in Tieren ausschließlich in Melanosomen in Melanozyten synthetisiert und gelagert wird, kann bei Pilzen die Biosynthese sowohl in und an der Zellwand als auch außerhalb der Zelle durchgeführt werden (Eisenman und Casadevall, 2012).

Ein Beispiel für eine Mutante mit Albinophänotyp ist  $\Delta Moalb1$ . Inaktivierung des Melaninbiosynthesegens *MoALB1* (codiert für eine Polyketidsynthase) resultiert in einer melanindefizienten Albinomutante, die apathogen ist (Chumley und Valent, 1990). Die Ergebnisse der q-PCR-Experimente mit mRNA aus der Mutante  $\Delta Moypd1$  lassen Spekulationen über eine Verbindung zwischen MoYpd1p und MoAlb1p zu, da die Transkriptmenge des Genprodukts von *MoALB1* in der Mutante  $\Delta Moypd1$  vermindert war (Abb. 7). MoAlb1p ist als Polyketidsynthase bei der Synthese von Scytalon in den ersten Schritten der Melaninbiosynthese, und zwar bei der Synthese von der Scytalonvorstufe 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalin, involviert. Die Zugabe von Scytalon in das Kulturmedium bei der Mutante  $\Delta Moalb1$  komplementiert den Albino- zum Phänotyp des WTs und bei Zugabe von Scytalon zu Konidien suspensionen wird deren Fähigkeit zur Infektion der Wirtspflanzen wieder hergestellt (Chumley und Valent, 1990). Der Albinophänotyp von  $\Delta Moypd1$  konnte mit Scytalon nicht zu dem des WTs komplementiert werden. Dies kann darin begründet sein, dass durch Inaktivierung des Gens *MoYPD1* weitere Schlüsselenzyme des Melaninbiosynthesewegs, nicht wie bei *MoALB1* über die transkriptionelle Regulationsebene, sondern direkt auf Proteinebene, beeinflusst werden. Die Scytalondehydratase (MoRSY1p, MGG\_05059) oder die Hydroxynaphthalinreduktase (MoBUF1p, MGG\_02252) könnten darüber hinaus auf Proteinebene durch MoYpd1p reguliert sein. Das Fehlen von MoYpd1p in der Mutante  $\Delta Moypd1$  führt möglicherweise zu Funktionsstörungen dieser Proteine und somit zur Hemmung der Biosynthese von Melanin.

Die Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom des Mutantenstamms  $\Delta Moypd1$  stellt den WT-Phänotyp fast vollständig wieder her. Der Habitus von  $\Delta Moypd1/YPD1$  war kein Albino mehr und die Konidienbildungsrate entsprach der des WTs. Die Differenzierung von Appressorien und damit verbunden die Fähigkeit zur Infektion der Wirtspflanze wurde bei  $\Delta Moypd1/YPD1$  nachgewiesen und war ebenfalls vergleichbar mit dem WT.

### 6.1.4 MoYpd1p und der HOG-Signalweg in *Magnaporthe oryzae*

Die Beteiligung des Phosphotransferproteins MoYpd1p im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* und Interaktion mit den HIKs MoSln1p und MoHik1p konnten im Rahmen dieser Arbeit sowohl auf Basis genetischer Manipulation mit physiologischer Charakterisierung von Mutantenstämmen, als auch auf proteinbiochemischer Ebene durch Interaktionsstudien mittels Y2H bestätigt werden.

#### 6.1.4.1 MoHik1p, MoSln1p und MoYpd1p im Phosphorelaysystem

Eine erhöhte Osmosensitivität ist für die Mutanten  $\Delta Mosln1$  (Zhang *et al.*, 2010),  $\Delta Mohik1$ ,  $\Delta Mossk1$  (Motoyama *et al.*, 2008) und  $\Delta Mohog1$  ( $\Delta osm1$ , Dixon *et al.*, 1999) bereits beschrieben. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde darüber hinaus nicht nur bei den Mutantenstämmen  $\Delta Moypd1$ ,  $\Delta Mopbs2$  und  $\Delta Mossk2$  eine vergleichbare Osmosensitivität aufgezeigt, sondern auch bei den Doppelmutanten  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  und  $\Delta Mohik1/\Delta ypd1$  (Abb. 8, Abb. 9).

Vergleichende Untersuchungen mit den Mutantenstämmen  $\Delta Mosln1$  und  $\Delta Mohik1$  sowie dem Doppelmutantenstamm  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  bezüglich ihrer Funktion im Bereich des Erkennens von osmotischem bzw. von Salzstress brachte interessante Unterschiede bezüglich der potenziellen Proteinfunktionen hervor. Die im Vergleich zu den Einzelmutanten  $\Delta Mosln1$  und  $\Delta Mohik1$  höhere Sensitivität der Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  sowohl gegenüber NaCl- als auch Sorbitstress verdeutlicht, dass bei Einzelinaktivierung der Gene *MoSLN1* oder *MoHIK1* die physiologische Funktion des jeweiligen Genprodukts durch die noch vorhandene HIK aufrechterhalten bzw. übernommen werden kann (Abb. 10). Dieses Phänomen wurde auch für den humanpathogenen Pilz *Penicillium marneffeii* bereits beschrieben (Boyce *et al.*, 2011).

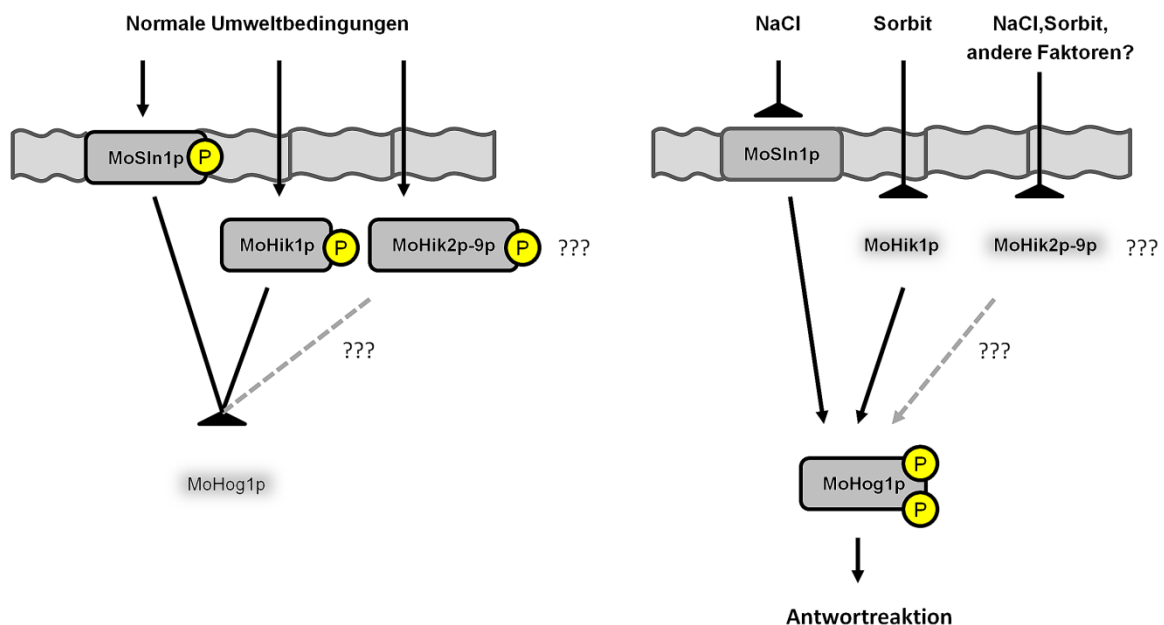
Ein wichtigster Faktor ist der Phosphorylierungszustand von MoSsk1p im Phosphorelaysystem. Das Phosphorylierungsmuster darf nicht gestört bzw. zu stark reduziert werden, da dies die unregulierte Bindung von MoSsk1p an MoSsk2p ermöglicht und das eine Aktivierung der MAPK-Kaskade zur Folge hat. Für eine sensible und exakte Erkennung und Reaktion auf osmotische Veränderungen sind somit vermutlich beide HIKs notwendig. Die Resultate der Wachstumsversuche mit NaCl und Sorbit verdeutlichen weiterhin die Rolle des Proteins MoSln1p bei der Anpassung an Salzstress (NaCl und KCl) und die Funktion von MoHik1p bei der Detektion und Reaktion auf osmotischen Stress, wie er beispielsweise von dem Zucker Sorbit verursacht wird (Abb. 10). *M. oryzae* nimmt also die physiologischen Reize von Salz- und Zuckerstress unterschiedlich wahr. In Arbeiten zu OS-1 (*NIK-1*) in *N. crassa* wurde eine solche Fähigkeit trotz des Vorhandenseins von mehreren HIK-codierenden Genen nicht



beobachtet (Motoyama *et al.*, 2005b). Dies verdeutlicht abermals die Diskrepanz von der Struktur und Funktion von Phosphorelaysystemen in verschiedenen Pilzen.

In *S. cerevisiae* ist eine Inaktivierung des Gens *SLN1*, das für die einzige HIK im Genom der Hefe kodiert, letal (Maeda *et al.*, 1994). In *C. albicans* sind drei HIK-codierende Gene bekannt, deren Einzelinaktivierungen möglich sind, während eine Doppelmutation von *CaNIK1/CaSLN1* letal ist (Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Die HIKs sind essenziell für die Aufrechterhaltung des Phosphorylierungsmusters des Phosphorelaysystems im HOG-Signalweg in Pilzen.

Die Tatsache, dass eine Doppelmutation der Gene *MoSLN1* und *MoHIK1* nicht letal ist, deutet darauf hin, dass noch weitere Faktoren (evtl. weitere HIKs) im Phosphorelaysystem von *M. oryzae* bei der Aufrechterhaltung der Phosphorylierungsmusters beteiligt sein müssen. Bewiesen werden diese Vermutungen durch die Western Blot-Analysen zur Aktivierung des HOG-Signalwegs bei NaCl- bzw. Sorbitstress in den Mutantenstämmen  $\Delta MoSLN1$ ,  $\Delta Mohik1$  und  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$  (Abb. 11). Ein Chemolumineszenzsignal von den Proben der Doppelmutante  $\Delta Mohik1/\Delta sln1$ , ausgelöst durch Fludioxonil, NaCl oder Sorbit bedeutet, dass der Regulationsmechanismus im Phosphorelaysystem weitere Faktoren beinhaltet (Abb. 29).



**Abb. 29: Ein vereinfachtes Modell der Signaltransduktion im HOG-Signalweg in *Magnaporthe oryzae* bei NaCl- oder Sorbitstress.** Neben den HIKs MoSln1p und MoHik1p müssen noch weitere Faktoren (evtl. die HIKs MoHik2p-MoHik9p) an der Signalerkennung und -transduktion bei NaCl- oder Sorbitstress beteiligt sein.

In den Proben der restlichen Mutantenstämme  $\Delta Moypd1$ ,  $\Delta Mossk1$ ,  $\Delta Mossk2$ ,  $\Delta Mopbs2$  und  $\Delta Mohog1$  sind keine Chemolumineszenzsignale zu beobachten. Dies deckt sich mit Anga-

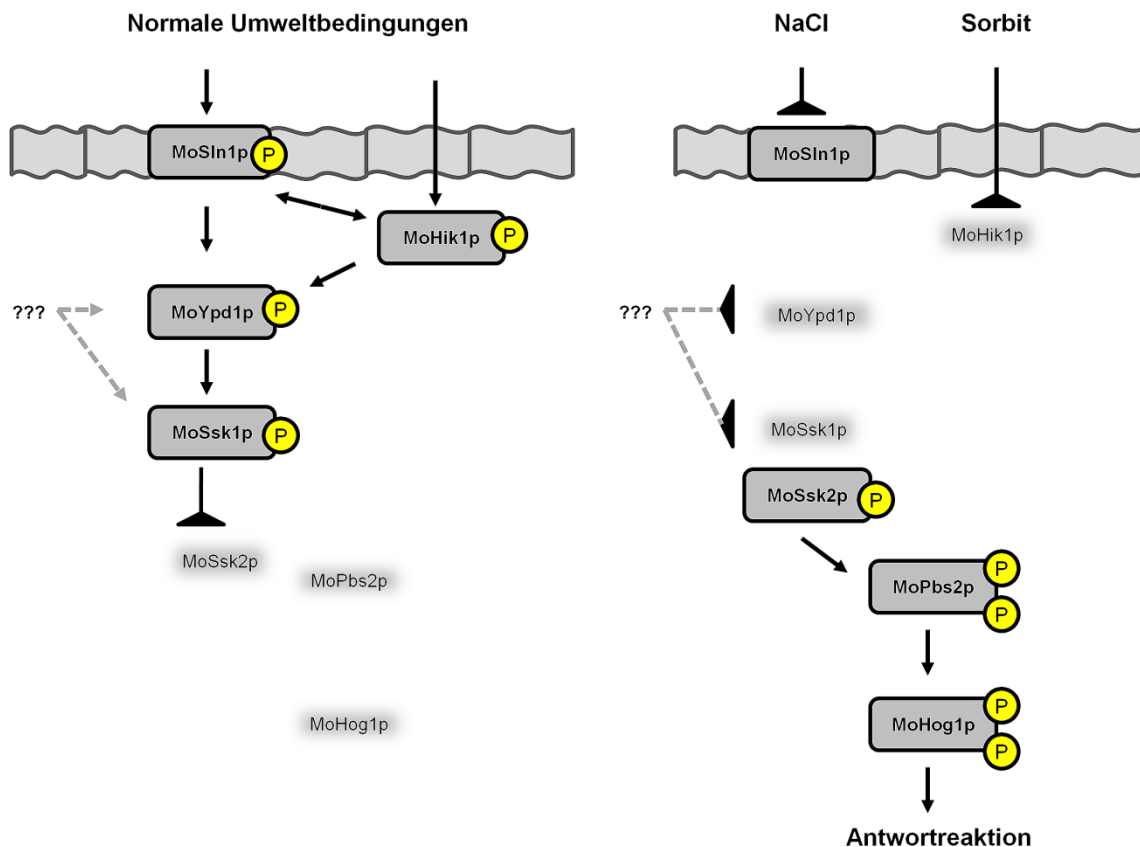
ben aus der Literatur, wonach in *M. oryzae* und in *N. crassa* eine Beteiligung von zusätzlichen HIKs oder noch unbekannter Mechanismen zur Adaptation an hyperosmotische Verhältnisse diskutiert werden (Motoyama *et al.*, 2005b; Furukawa *et al.*, 2012). Mehrere Proteine oder ganze Signalwege können bei der Erkennung und Verarbeitung externer Stimuli zusammenwirken oder der Einfluss niedrigmolekularer Phosphatdonoren wie etwa Acetylphosphat oder Carbamoylphosphat kann diskutiert werden. Es ist bekannt, dass regulatorische Antwortproteine wie CheYp und CheBp aus *E. coli*, die normalerweise von Histidinkinasen phosphoryliert werden, durch diese niedrigmolekularen Phosphatdonoren auch in Abwesenheit der Histidinkinasen phosphoryliert werden können (Lukat *et al.*, 1992).

Die Empfänglichkeit von *C. neoformans* gegenüber Fludioxonil wird erhöht, wenn zeitgleich zur Fungizidapplikation Zellwandintegritäts-Signalwege, wie Calcineurin- oder Mpk1-Signalwege, inhibiert werden (Kojima *et al.*, 2006). Zwischen MAPK-Signalwegen in pathogenen Pilzen scheinen intensive Verbindungen vorhanden zu sein. Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* und pathogenen Pilzen wie *M. oryzae* oder *C. albicans* ist Hog1p in *C. neoformans* unter normalen, isoosmotischen Bedingungen phosphoryliert (somit ein Repressor). Die Exposition von *C. neoformans* gegenüber verschiedenen Umweltstimuli resultiert in Dephosphorylierung von Hog1p und physiologischen Reaktionen wie der Steigerung der Melaninbiosynthese. Die Verbindung des HOG-Signalwegs zur Melaninbiosynthese in *C. neoformans* wird verifiziert durch Untersuchungen an Mutantenstämmen, die Mutationen in den Genen haben, die für Proteine des cAMP-Signalwegs codieren. Das sind *GPA1* ( $G\alpha$ -Untereinheit), *CAC1* (Adenylylcyclase) oder *PKA1* (*PKA*). Diese Mutanten können kein Melanin synthetisieren, jedoch kann eine Inaktivierung des Gens *HOG1* die Polymersynthese wiederherstellen (Bahn *et al.*, 2005).

Der Einfluss des Verlustes der Proteinfunktion von MoYpd1p auf die Funktion des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlicht. Eine Störung des Phosphorelaysystems durch Inaktivierung des Gens *MoYPD1* geht einher mit einem Verlust der Fähigkeit zur Osmoregulation der entsprechenden Mutante. Dies wurde im Rahmen der Arbeit zunächst in Wachstumsversuchen beobachtet. Die Sensitivität der Mutante  $\Delta$ *Moypd1* gegen die Osmolyte NaCl, KCl oder Sorbit ist im Vergleich zu den anderen untersuchten Mutanten, in denen die Komponenten des HOG-Signalwegs inaktiviert sind, ähnlich bzw. stärker. Der WT-Phänotyp wird durch eine Reintegration des intakten Gens *MoYPD1* in das Genom der Mutante  $\Delta$ *Moypd1* komplementiert (Abb. 8, Abb. 9). Ungestörte Phosphorylierungsreaktionen zwischen den Komponenten MoSln1p, MoHik1p und MoSsk1p innerhalb des Phosphorelaysystems sind unabdingbar für die adäquate Reaktion von *M. oryzae* auf verschiedene Umweltbedingungen. MoYpd1p fungiert hier als zentrales Protein und hat somit entscheidenden Einfluss auf das gesamte Signaltransduktionssystem. Das

Phosphorylierungsmuster wird durch das Inaktivieren von einzelnen Komponenten dieses Systems verändert und entsprechende Mutanten reagieren anders auf Umweltstimuli und Stress. Das hat wiederum signifikante Auswirkungen auf die Aktivierung der MAPK Kaskade MoSsk2p-MoPbs2p-MoHog1p und somit auf die physiologische Reaktionsfähigkeit der Mutantenstämme bei hoher Osmolarität bzw. bei Salzstress.

Basierend auf den Ergebnissen der Sequenzanalysen (Abb. 3) und der Homologievergleiche aller untersuchten Komponenten (Tab. 1) sowie der Resultate der Wachstumsversuche und der Western Blot-Analysen (Abb. 11) konnte ein Modell des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* mit Beteiligung von MoYpd1p im Phosphorelaysystem erstellt werden (Abb. 30). Es wurden die genetischen und proteinbiochemischen Experimente zur Validierung durchgeführt, denn bislang publizierte Modelle für den HOG-Signalweg in *M. oryzae* basierten nur auf Homologievergleichen zwischen Proteinsequenzen aus *M. oryzae* und der Komponenten aus *S. cerevisiae* (Li *et al.*, 2012). Die physiologischen Beweise durch gezielte genetische Manipulationen oder Proteinbiochemie waren bisher noch nicht für alle Komponenten erbracht.



**Abb. 30: Ein Modell des HOG-Signalwegs in *Magnaporthe oryzae*.** Das Phosphorelaysystem und die nachgeschaltete MAPK-Kaskade bei normalen Umweltbedingungen (links). Die Proteine des Phosphorelaysystems sind phosphoryliert und die MAPK-Kaskade bleibt inaktiv. Bei Salz- bzw. Zuckerstress wird das Phosphorelaysystem dephosphoryliert. Die Signalerkennung von NaCl erfolgt durch MoSln1p, die von Sorbit durch MoHik1p. Durch die Dephosphorylierung von MoSsk1p wird die MAPK-Kaskade aktiviert. Es folgt die Antwortreaktion.

Dieses Modell mit MoYpd1p als zentralem Element im Phosphorelaysystem wurde mittels Proteininteraktionsstudien durch Y2H-Analysen *in vivo* bestätigt (Abb. 15). Y2H-Analysen bieten den Vorteil, dass mit relativ geringen Mengen an cDNA oder gDNA (die komplette codierende Sequenz oder aber nur ein Teil derer, inklusive der relevanten aktiven Proteindomänen) gearbeitet werden kann, anstelle von großen Mengen gereinigtem Protein. Es ist ein *in vivo*-System, dass die physiologische Umgebung der zu untersuchenden Proteine besser imitiert als *in vitro*-Systeme (Van Crielinge und Beyaert, 1999).

*In vivo* Y2H-Interaktionsstudien von Proteinen des Phosphorelaysystems des HOG-Signalwegs wurden zwar bereits in *S. cerevisiae* mit MoHik1p aus *M. oryzae* durchgeführt, jedoch wurde als Interaktionspartner nur das Phosphotransferprotein Ypd1p aus *S. cerevisiae* verwendet (Motoyama *et al.*, 2005a). Studien mit dem Phosphotransferprotein MoYpd1p aus *M. oryzae* waren vor dieser Arbeit noch nicht bekannt. Die starke Interaktion von (MoYpd1p)+(MoSsk1p) und (MoYpd1p)+(MoSln1p) konnte in dieser Arbeit erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 15), womit MoYpd1p der zentrale Signalvermittler innerhalb des

Phosphorelaysystems ist (Abb. 30). Ebenso lagen noch keine Erkenntnisse über Interaktionen zwischen (MoHik1p)+(MoSln1p) oder (MoHik1p+MoYpd1p) vor. Diese waren ebenfalls deutlich nachweisbar (Abb. 15). Die mit der Positivkontrolle vergleichbar starke Interaktion der beiden Sensor-Histidinkinasen (MoHik1p)+(MoSln1p) stützt die Vermutung, dass die Wirkungsweise von Fludioxonil durch eine Bindung der HIK MoHik1p das gesamte Phosphorelaysystem stört, also auch MoSln1p. Dies wird in der Diskussion zum Wirkmechanismus von Fludioxonil genauer erläutert. Die größere Interaktionsstärke von (MoYpd1p)+(MoSsk1p) im Vergleich zu MoYpd1p mit den HIKs MoSln1p und MoHik1p stützt die Annahme, dass MoYpd1p von mehreren verschiedenen Signalproteinen Inputsignale zu einem Antwortprotein, MoSsk1p, überträgt.

Der Nachweis von Proteininteraktionen von und mit MoHik1p wurde nicht wie alle anderen untersuchten Proteine als Doppelkontrolle (Expression als „bait“ in *pGBKT7* und als „prey“ in *pGADT7*) durchgeführt. MoHik1p wurde nur in dem Expressionsvektor *pGBKT7* funktionell exprimiert. Die Fusion von MoHik1p mit dem *ADH1*-Promotor und der Gal4p Aktivierungsdomäne von *S. cerevisiae* führt vermutlich zu toxischen Effekten. Die toxische Reaktion muss auf die Fusion mit der Gal4p Aktivierungsdomäne zurückzuführen sein, da eine Fusion mit der Gal4p DNA-Bindedomäne möglich war. Phänomene dieser Art werden immer wieder für Signalproteine, Kinasen oder Transkriptionsfaktoren diskutiert und können durch den Wechsel des verwendeten Transkriptionsfaktors oder Promotors (induzierbare Systeme) teilweise umgangen werden (Van Criekinge und Beyaert, 1999).

#### 6.1.4.2 Der HOG-Signalweg als Vermittler von Umweltstress und Hypoxie

Neben der Beteiligung von MoYpd1p in den Signalprozessen des Phosphorelaysystems im HOG-Signalweg und den unterschiedlichen Funktionen von MoSln1p und MoHik1p konnten weitere interessante Effekte hinsichtlich des Wachstums von *M. oryzae* bei verschiedenen Umwelteinflüssen beobachtet werden. Der HOG-Signalweg scheint die physiologische Reaktion auf Veränderungen der Umgebungstemperatur zu vermitteln. Die Erhöhung der Wachstumstemperatur führt zu einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums einzelner HOG-Signalweg-Mutanten auf CM, besonders von  $\Delta$ *Mossk1*. Auf MM ist der Effekt weniger stark zu beobachten, was auf die generell limitierten Wachstumsbedingungen in MM zurückzuführen ist (Abb. 8, Abb. 9). Die Beteiligung des HOG-Signalwegs bei Temperaturerhöhung ist bereits aus Arbeiten mit *S. cerevisiae* bekannt (Winkler *et al.*, 2002). Für *M. oryzae* waren diese Phänomene noch nicht beschrieben. In diesem Organismus geht eine Erhöhung der Umgebungstemperatur mit Veränderungen der Membranfluidität einher, was durch den vermehrten Einbau von Phospholipiden in die Membran ausgeglichen wird. Phospholipide sind amphiphil und werden als eine Art Anker für Proteine angesehen, die an

der Membran assoziiert oder fest integriert sind (Levental *et al.*, 2010). Eine Veränderung der Zusammensetzung von Biomembranen hinsichtlich des Phospholipidgehaltes kann zu einer Störung des Transmembranproteins MoSln1p sowie der putativ membranassoziierten HIK MoHik1p führen. Dadurch wird die Aktivität im Phosphorelaysystem gestört und eine Aktivierung des HOG-Signalwegs verursacht.

Die Signalweiterleitung bezüglich Hypoxie wird vermutlich von dem HOG-Signalweg vermittelt. Die Signalkaskade scheint in die Erkennung und Reaktion von Hypoxie oder von durch Hypoxie ausgelösten Prozessen eingebunden zu sein. Die putativ als Sauerstoffsensoren fungierenden HIKs MoHik5p und MoHik9p sind mutmaßlich an diesem Vorgang im Phosphorelaysystem beteiligt. Die grundlegenden Überlegungen und Ergebnisse zu den Wachstumsversuchen mit Zugabe der Hypoxie-induzierenden Reagenzien NaNO<sub>2</sub> und CoCl<sub>2</sub> sind im zweiten Teil der Diskussion zu finden.

#### **6.1.4.3 MoYpd1p und der Wirkmechanismus von Fludioxonil**

Für die Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Fludioxonil konnte im Rahmen dieser Arbeit auf zur Verfügung stehende Mutanten des HOG-Signalwegs zurückgegriffen werden. Die Ergebnisse der Wachstumsversuche nach Fungizidapplikation sowie die Ergebnisse der Western Blot-Analysen bestätigten erstmals eine Beteiligung von MoYpd1p aus *M. oryzae* am Wirkmechanismus des Fungizids Fludioxonil (Abb. 12, Abb. 13).

Die Beteiligung der Gruppe III-HIK am Wirkmechanismus von Fludioxonil wurde bereits in *N. crassa*, *E. nidulans*, *C. albicans*, sowie auch in *M. oryzae* diskutiert und beschrieben. Für das Gen *OS-1* (*NIK-1*) aus *N. crassa* wurden heterologe Reporteranalysen in *S. cerevisiae* zur Wirkung von Fludioxonil auf transkriptioneller Ebene durchgeführt (Furukawa *et al.*, 2012). Bei den Untersuchungen in *E. nidulans* wurde eine Resistenz der Mutante  $\Delta nik1$  gegenüber Fludioxonil beschrieben (Hagiwara *et al.*, 2007) und es sind heterologe Expressionsversuche des HIK-codierenden Gens *CaNIK1* aus *C. albicans* in *S. cerevisiae* dokumentiert (Buschard *et al.*, 2012). *S. cerevisiae* ist natürlicherweise resistent gegenüber Fludioxonil. Eine heterologe Expression des putativen Targetproteins CaNik1p aus *C. albicans* oder MoHik1p aus *M. oryzae* bewirkt, dass der Hefestamm sensitiv gegen das Fungizid wird (Buschard *et al.*, 2012, Motoyama *et al.*, 2005a). Eine solche erworbene Sensitivität von *S. cerevisiae* gegenüber einem Wirkstoff kann als Beweis für eine Beteiligung der Proteine CaNik1p oder MoHik1p an der Wirkungsweise bzw. Bindung von Fludioxonil angesehen werden. Dennoch fehlen Studien zur Wirkstoffbindung bzw. Kristallstrukturen der Targetproteine und der direkten Interaktionspartner.

Alle bisherigen Untersuchungen beschreiben die wichtige Rolle der Gruppe III-HIKs im Kontext mit dem Wirkmechanismus von Fludioxonil. Die bisher durchgeführten Experimente identifizierten immer das vermutliche Zielprotein und zeigen eine Aktivierung von Hog1p, jedoch nicht die Reaktion bzw. Interaktionen, die unmittelbar durch eine Wirkstoffbindung im Phosphorelaysystem ausgelöst werden könnten. Aus diesem Grund wird spekuliert, ob die HIKs alleine oder die von ihnen beeinflussten Phosphorylierungsreaktionen und Interaktionen mit anderen Komponenten des Phosphorelaysystems für die fungizide Wirkung verantwortlich sind (Tanaka und Izumitsu, 2011). Untersuchungen einer Wirkstoffbindung an das gereinigte Protein *in vitro* könnten zum Beispiel mittels Microscale Thermophoresis (Nanotemper technologies) durchgeführt werden. Hierfür wäre es notwendig die HIK oder deren Interaktionspartner mit einem Affinitätstag zu fusionieren und heterolog oder homolog zu exprimieren. Die Expression von Signalproteinen gestaltet sich jedoch meist sehr schwierig, da jegliche Störung (z.B. durch Überexpression) von den Phosphorylierungsmustern in den Phosphorelaysystemen direkte Auswirkungen auf die Zellphysiologie hat. Das wurde am Beispiel von Expressionsstudien mit der MAPK MoPmk1p in *M. oryzae* bereits beschrieben (Bruno *et al.*, 2004).

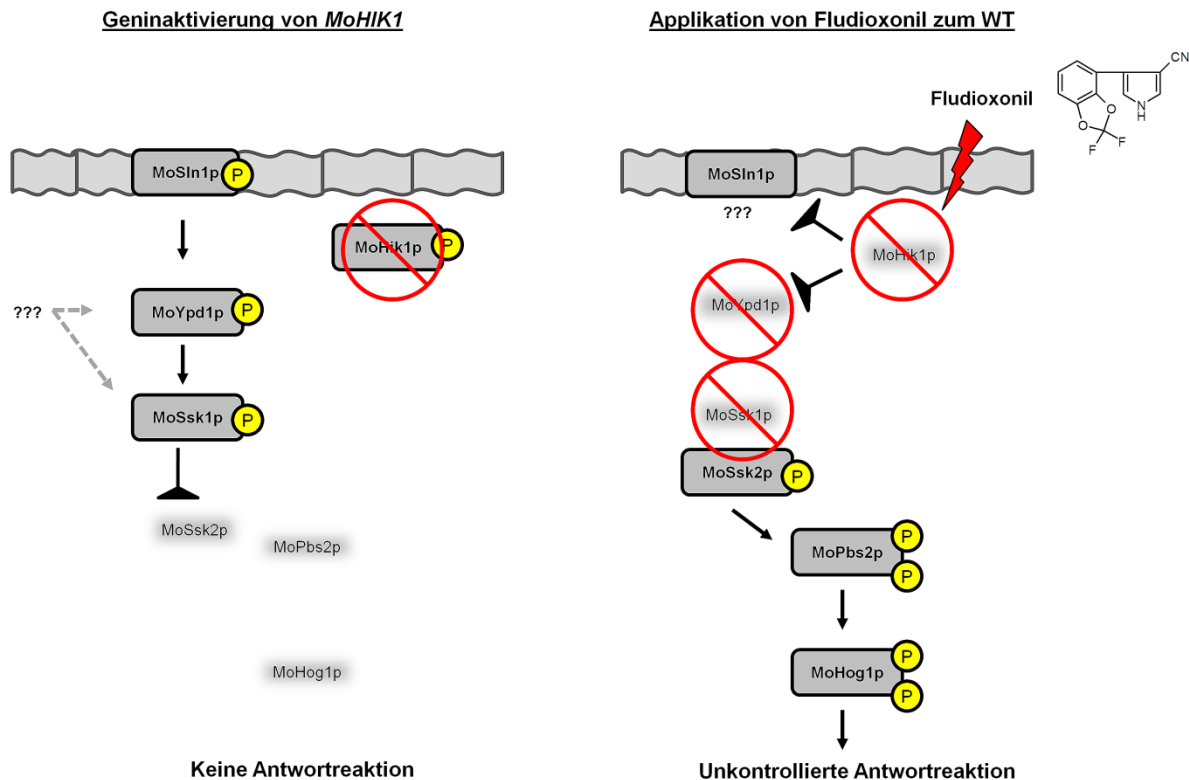
Eine Beteiligung des Phosphotransferproteins MoYpd1p am Wirkmechanismus von Fludioxonil war in der Literatur bisher nicht belegt. In dieser Arbeit konnte eine solche Beteiligung *in vivo* erstmals experimentell nachgewiesen werden - auf genetischer Ebene durch Resistenzversuche mit der Mutante  $\Delta Moypd1$  (Abb. 12) und auf proteinbiochemischer Ebene durch Western Blot-Analysen (Abb. 13). Die dabei beobachtete Resistenz der Mutante  $\Delta Moypd1$  bzw. die mit dem WT vergleichbare Sensitivität des komplementierten Stammes  $\Delta Moypd1/YPD1$  gegenüber dem Phenylpyrrol beweist einerseits die Rolle von MoYpd1p im Phosphorelaysystem und bestärkt andererseits die Richtigkeit des aufgestellten Modells des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* (Abb. 30).

Die im Vergleich zum WT in den Wachstumstests leicht verminderte Sensitivität gegenüber Fludioxonil bei der komplementierten Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  (Abb. 12) sowie die etwas schwächeren Signale von Fludioxonil in den Proben von  $\Delta Moypd1/YPD1$  bei den Western Blot-Analysen (Abb. 14) deuten darauf hin, dass die Komplementation nicht wieder alle physiologischen Funktionen von MoYpd1p in vollem Umfang hergestellt hat. Die q-PCR-Analyse bestätigt diese Annahme, denn die relative Menge an Transkript von *MoYPD1* liegt in  $\Delta Moypd1/YPD1$  noch deutlich unter der Menge des WT (Abb. 5). Dies könnte bedeuten, dass die nicht ganz erreichten phänotypischen Effekte, die Fludioxonil auf den WT hat, können durch die verminderte Menge an dem Phosphotransferprotein in der komplementierten Mutante erklärt werden. Für die ungestörte Funktion des HOG-Signalwegs reicht die im Vergleich zum WT verminderte Menge an MoYpd1p in der Mutante  $\Delta Moypd1/YPD1$  aus, um

adäquat auf die verschiedenen Stresssituationen in den Wachstumstests reagieren zu können. Bei der Wirkungsweise von Fludioxonil jedoch kann angenommen werden, dass für das Höchstmaß an Wirkung die relative Menge des Transkripts von *MoYPD1* im Bereich derer des WT sein muss. Wenn eine geringere Menge von physiologisch funktionellem MoYpd1p in den Zellen vorhanden ist, findet die komplette Hemmung des Phosphorelaysystems nicht statt. Analog zu den Überlegungen zur Mutante  $\Delta$ *Mohik1* könnte angenommen werden, dass die lebensnotwendigen Phosphorylierungen an MoSsk1p noch durch MoSln1p aufrecht erhalten werden können, wenn dies nicht durch die entsprechende Menge des über MoHik1p gestörten Phosphotransferproteins MoYpd1p inhibiert wird.

Da die Mutante  $\Delta$ *Mosln1* nicht Resistent gegen Fludioxonil ist und sonst alle in dieser Arbeit untersuchten HOG-Signalweg-Mutanten deutliche Resistenzen gegenüber dem Fungizid zeigen, konnte ein Modell der Wirkungsweise von Fludioxonil erstellt werden. Um besser zu verdeutlichen, warum eine Geninaktivierung von *MoHIK1* nicht letal ist, die Wirkung von Fludioxonil an MoHik1p aber dennoch den Zelltod auslöst, wurden zwei Modelle des HOG-Signalwegs mit den entsprechenden Darstellungen entwickelt (Abb. 31). Während eine gezielte genetische Inaktivierung des Gens *MoHIK1* das Phosphorelaysystem zwar stört (dies ist den Ergebnissen der Wachstumsversuche zu entnehmen, die Mutante  $\Delta$ *Mohik1* ist verglichen mit dem WT z.B. sensitiver gegenüber Sorbit, Abb. 10), wird das Phosphorylierungsmuster wahrscheinlich teilweise durch MoSln1p aufrecht erhalten (Abb. 31 links). Die Aufrechterhaltung der Phosphorylierungen im Phosphorelaysystem bei Einzelinaktivierung von Sensor-Histidinkinasen wurde analog auch in dem humanpathogenen Pilz *Penicillium marneffe* diskutiert (Boyce *et al.*, 2011). Die Applikation von Fludioxonil bewirkt hingegen vermutlich über die Bindung an MoHik1p eine wesentlich stärkere Störung des gesamten Systems (Tanaka und Izumitsu, 2010), wodurch die Dephosphorylierung von MoSsk1p auch durch MoSln1p nicht kompensiert werden kann (Abb. 31 rechts). Fludioxonil könnte eine irreversible Interaktion von MoHik1p mit MoYpd1p, MoSln1p oder MoSsk1p verursachen und somit zur dauerhaften Störung im Phosphorelaysystem führen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Y2H-Analysen bekräftigen diese Annahme dadurch, dass in den Experimenten eine starke Interaktion der beiden Sensor-Histidinkinasen (MoHik1p)+(MoSln1p) beobachtet wurde. Wenn die HIKs MoSln1p und MoHik1p stark wechselwirken, liegt es nahe, dass die Wirkungsweise von Fludioxonil durch eine Bindung MoHik1p also auch unmittelbar MoSln1p und somit das gesamte Phosphorelaysystem stören kann. Es wird eine unkontrollierte Aktivierung der MAPK-Kaskade ausgelöst, was zum Zelltod führt.





**Abb. 31: Ein Modell, welches die Auswirkungen einer Geninaktivierung von *MoHIK1* vergleichend mit der Applikation von Fludioxonil in *Magnaporthe oryzae* beschreibt.** Das Phosphorelaysystem und die nachgeschaltete MAPK-Kaskade in der Mutante  $\Delta Mohik1$  bei normalen Umweltbedingungen. Die Proteine *MoSln1p*, *MoYpd1p* und *MoSsk1p* des Phosphorelaysystems sind phosphoryliert und die MAPK-Kaskade bleibt inaktiv (links). Applikation von Fludioxonil stört das Phosphorelaysystem ausgehend von der HIK *MoHik1p* und bewirkt Dephosphorylierung des Systems. Durch die Dephosphorylierung von *MoSsk1p* wird die MAPK-Kaskade unkontrolliert aktiviert. Es folgt die dauerhafte Antwortreaktion und der Zelltod (rechts).

Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellte Modell zu einer Wirkungsweise von Fludioxonil wird durch Untersuchungen zu der HIK *DhNik1p* aus der Hefe *Debaryomyces hansenii* gestützt (Furukawa *et al.*, 2012). Studien zur heterologen Expression in *S. cerevisiae* verweisen auf eine Störung der Kinaseaktivität von *Sln1p* durch die Effekte, die von Fludioxonil an *DhHik1p* ausgelöst werden. Die Expression von *DhNik1p* in *S. cerevisiae* vermittelt Sensitivität gegenüber Fludioxonil in dem Hefe-WT sowie in der Mutante  $\Delta skn7$  (*Skn7p* ist ein regulatorisches Antwortprotein unter Kontrolle von *Ypd1p*), jedoch nicht in Mutantenstämmen  $\Delta ssk1$  und  $\Delta hog1$ . Deshalb wurde bisher der Wirkmechanismus von Fludioxonil als eine Aktivierung von *Hog1p* durch *DhNik1p* direkt über *Ssk1p* (ohne die Beteiligung von *Ypd1p*) diskutiert (Furukawa *et al.*, 2012). Jedoch belegen sowohl die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Untersuchungen als auch die Ergebnisse der Western Blot-Analysen erstmals auch die Funktion von *MoYpd1p* an dem Wirkmechanismus von Fludioxonil in *M. oryzae*.

## 6.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae*

In dieser Arbeit wurden erstmals umfassende Untersuchungen zu allen identifizierten HIK-codierenden Genen von *M. oryzae* durchgeführt. Die Ergebnisse machen deutlich, dass HIKs in *M. oryzae* an physiologischen Prozessen beteiligt sind. Bei diesen Prozessen handelt es sich unter anderem um die Adaptation an verschiedene Umwelteinflüsse, die Konidiogenese, die Appressoriendifferenzierung und somit die pathogenitätsrelevante Morphogenese.

### 6.2.1 Identifikation von Histidinkinasen und Sequenzanalysen in *Magnaporthe oryzae*

Die durchgeführten Sequenzanalysen resultierten in der Identifikation von insgesamt zehn HIK-codierenden Genen im Genom von *M. oryzae* mit jeweils einer Histidinkinase-Domäne, einer regulatorischen Domäne und einer Histidin-ATPase-Domäne (Abb. 16). Im Rahmen der Literaturrecherchen konnten nur Publikationen über die Gene *MoSLN1* und *MoHIK1* gefunden werden (Zhang *et al.*, 2010; Motoyama *et al.*, 2005a und b), die weiteren acht in der Arbeit analysierten HIK-codierenden Gene *MoHIK2-MoHIK9* wurden bisher nicht in wissenschaftlichen Studien untersucht.

Die Analysen zum Vorkommen von Transmembrandomänen der potenziellen Signalsensoren ergaben, dass lediglich in der Aminosäuresequenz von MoSlN1p eine putative Transmembranregion zu finden ist. In den anderen untersuchten Sequenzen konnten keine derartigen Domänen gefunden werden, woraus geschlossen werden kann, dass die Proteine allesamt im Zytosol vorkommen oder höchstens an der Membran angelagert sind. Prokaryotische HIKs sind meist membrandurchspannend und haben eine extrazelluläre Sensordomäne. Bei Eukaryoten ist es möglich, dass diese Sensorproteine membranständig oder frei im Zytosol lokalisiert sind (Catlett *et al.*, 2003). In den meisten eukaryotischen Organismen werden Umweltsignale jedoch direkt oder indirekt über externe N-terminale Sensordomänen von Sensorkinasen erfasst. Durch die zusätzlichen C-terminalen REC-Domänen von Hybrid-Histidinkinasen und den variablen regulatorischen Antwortproteinen wird in Phosphorelaysystemen eine große Variabilität und Spezifität der Signalverarbeitung ermöglicht (Loomis *et al.*, 1997).

Das Fehlen von Transmembrandomänen schließt eine Assoziation des Signalproteins mit extrazellulären Faktoren nicht aus. Die HIKs können in der Membran verankert oder an dieser angelagert sein und so extrazelluläre Signale direkt erkennen oder Veränderungen der Fluidität oder Ladung der Membran detektieren. Dafür müssen HIKs nicht zwangsläufig

extrazelluläre Liganden binden, was das bekannte Beispiel der bakteriellen Histidinkinase EnvZ aus *E. coli* verdeutlicht. EnvZ ist ein integrales Membranprotein, hat Funktionen in der Osmoregulation und die putative Sensordomäne im periplasmatischen Raum. Interessanterweise wird die Regulationsfähigkeit des Proteins durch Inaktivierung dieser Domäne nicht beeinflusst, was auf einen anderen Sensormechanismus als einer Bindung eines Liganden hindeutet (Leonardo und Forst, 1996). Da wechselnde externe Osmolarität die Membranintegrität beeinflusst, kann EnvZ mit anderen membranassoziierten Proteinen in Wechselwirkung treten. Ähnliche Mechanismen werden für die Osmoregulation in *S. cerevisiae* angenommen. Die HIK Sln1p benötigt trotz extrazellulärer Sensordomäne ihre integralen Membrandomänen für die Signaltransduktion (Ostrander und Gorman, 1999). Die Grundlagen über die Funktionsweise intrazellulärer HIKs sind noch nicht gänzlich verstanden. Die HIKs können auch an Transmembranrezeptoren, separate Bindeproteine oder kleine Liganden wie Aminosäuren, Zucker oder andere niedermolekulare Bindungspartner gekoppelt sein (Loomis *et al.*, 1997).

Die unterschiedlichen Sensordomänen in den Sequenzen aller HIKs (mit Ausnahme von MoSln1p) deuten an, dass die HIKs trotz großer Homologien untereinander sehr diverse Funktionen haben können (Abb. 16). GAF-Domänen sind bekannt dafür, von Natrium aus der Umwelt moduliert zu werden (Cann, 2007a). Natrium unterdrückt *in vitro* die Aktivität der Adenylylcyclasen CyaB1p und CyaB2p aus dem Cyanobakterium *Anabaena* sp. und auch die Aktivität der Phosphodiesterase Pde2A durch Interaktion mit deren GAF-Domänen (Cann, 2007b). Ähnliche Funktionen der Proteine mit GAF-Domänen aus *M. oryzae* (MoHik3p, MoHik6p und MoHik7p) waren basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit von Wachstumsversuchen der entsprechenden Mutantenstämme bei der Zugabe von Natrium nicht abzuleiten (Daten nicht gezeigt).

PHY-Domänen sind strukturell verwandt mit den GAF-Domänen, sie haben jedoch eine zusätzliche Haarnadelschleife („hairpin-loop“, Cann, 2007b). Sie werden als Lichtrezeptoren angesehen und sind sowohl in Bakterien als auch in Pilzen verbreitet (Montgomery und Lagarias, 2002). Die einzige HIK mit einer PHY-Domäne (MoHik7p) konnte durch die ersten Ergebnisse aus Wachstumsversuchen der entsprechenden Mutante in Verbindung mit einer Funktion als Lichtrezeptor gebracht werden. Es war ein klarer Tag/Nacht-Rhythmus der Wachstumszone in Form von hellerem und dunklerem Myzel zu sehen (Daten nicht gezeigt).

PKc-Domänen katalysieren den Transfer der  $\gamma$ -Phosphorylgruppe des ATP zu Ser/Thr/Tyr-Resten, weshalb sie HIKs mit anderen Kinasen oder Effektorproteinen in Verbindung bringen können (Johnson, 2009; Johnson und Barford, 1993). MoHik6p wäre somit direkt in der Lage, an der Signalweiterleitung in verschiedenen MAPK-Kaskadenbeteiligt sein.

HAMP-Domänen sind in Signalproteinen von Pro- und Eukaryoten weit verbreitet, wobei der Fokus der Forschung bisher eher auf den strukturellen als den funktionellen Aspekten lag. Die einzige Aminosäuresequenz, aus der eine HAMP-Domäne vorhergesagt werden konnte, ist die von MoHik1p (Abb. 16). Diese HAMP-Domänen werden im Bezug auf die Wirkungsweise von Fludioxonil diskutiert (Buschart *et al.*, 2012). Die HAMP-Domänen von membrandurchspannenden oder -gebundenen Proteinen sind auf zytosolischer Seite der Membran lokalisiert, wo sie membranübergreifende oder intrazelluläre bzw. intermolekulare Interaktionen vermitteln (Parkinson, 2010; Pollard *et al.*, 2009; Swain und Falke, 2007; Tao *et al.*, 2002).

PAS-Domänen haben einen charakteristischen konservierten hydrophoben Kern, sind affin für die Veränderungen des Sauerstoffgehalts und können als Sensoren für Licht und Sauerstoff beschrieben werden (Taylor und Zhulin, 1999; Pellequer *et al.*, 1999). MoHik5p und MoHik9p haben mehrere PAS-Domänen (Abb. 16). Eine Funktion der Proteine mit PAS-Domänen, z.B. MoHik5p und MoHik9p, im HOG-Signalweg ist anhand der Beobachtungen in den Wachstumsversuchen der Mutantenstämme und der Western Blot-Analysen möglich (Abb. 25, Abb. 26). Ein Modell des HOG-Signalwegs mit Beteiligung von MoHik5p und MoHik9p wird in späteren Teilen der Diskussion dargestellt (Abb. 32).

### 6.2.2 Phylogenetische Analyse von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen aus Pilzen

Die Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen von Pilzen zeichnen sich durch eine hohe Diversität aus. Ihre Komplexität liegt in der divergierenden Signaldomänenstruktur begründet, damit einhergehend verschiedenen Regulationsmöglichkeiten und ihrer stark variierenden Anzahl in verschiedenen Spezies. Allgemein auffällig ist, dass in den Genomen filamentös wachsender Pilze mehr HIK-codierende Gene codiert sind im Vergleich zu hefeartigen Pilzen (Bahn, 2008). Die meisten pflanzenpathogenen Ascomyceten sind in drei Klassen der Euascomyceten zu finden - den Dothideomyceten (Loculoascomyceten), den Leotiomyceten (Discomyceten) und den Sordariomyceten (Pyrenomyceten) (Berbee, 2001). Von diesen drei Klassen wurden verschiedene phytopathogene Modellorganismen für die Analysen ausgewählt: *B. fuckeliana*, *C. heterostrophus*, *G. moniliformis*, *M. graminicola* und *M. oryzae*. Außerdem wurden die beiden Saprophyten *N. crassa* (ein Sordariomycet) und *E. nidulans* (ein Plectomycet) und zwei Vertreter der Saccharomyceten, *C. albicans* und *S. cerevisiae*, in die Untersuchungen einbezogen.

Durch die phylogenetische Analyse der Proteinsequenzen konnte die elfgliedrige Gruppenstruktur der HIKs von Pilzen, welche durch Catlett *et al.* (2003) erstmals aufgestellt

wurde, mit den untersuchten Sequenzen ergänzt werden. Die verschiedenen Gruppen und deren Elemente sind mit Ausnahme der Gruppen III und VI bislang noch immer unzureichend untersucht (Meena *et al.*, 2010; Boyce *et al.*, 2011). Der berechnete phylogenetische Baum veranschaulicht, trotz teilweise hoher Homologien einzelner konservierter Proteindomänen, die phylogenetische Diversität dieser Signalproteine. Überdies verdeutlicht er die Wichtigkeit der unterschiedlichen Signaldomänen (Abb. 17). Einige der Gruppen, beispielsweise die Gruppen III, IV und X, beinhalten Sequenzen von HIKs, die in filamentösen Ascomyceten hochkonserviert sind. Diese hohe Ähnlichkeit wird durch die kleinen Astlängenwerte dargestellt (Abb. 17). Die Sequenzen innerhalb der Gruppen repräsentieren die höchstwahrscheinlich evolutionär ortholog entstandenen Proteine mit ähnlichen Eigenschaften und Funktionen. Hingegen ist bei den Gruppen I oder XI anhand der größeren Astlängenwerte eine höhere Divergenz zu erkennen, welche auf die Gene zurückzuführen ist, die sich innerhalb dieser beiden Gruppen vereinzelt herausgebildet haben. Deren Genprodukte sind vermutlich nicht für grundlegende Funktionen wie Osmoregulation verantwortlich. Die verschiedenen Gene haben sich vermutlich evolutionär zur Anpassung an die spezifischen Lebenszyklen, besonders die von Pathogenen, entwickelt (Catlett *et al.*, 2003). Auffällig ist, dass in der Gruppe I die meisten Proteinsequenzen des Saprophyten *E. nidulans* eingeordnet wurden, während in der Gruppe XI Sequenzen der phytopathogenen Pilze *B. fuckeliana*, *M. graminicola* und *C. heterostrophus* dominieren (Abb. 17). Die Elemente und Funktionen zu den Proteinsequenzen der Gruppen I und XI sind trotz ihrer hohen Anzahl in den genannten Organismen noch nicht näher charakterisiert worden.

In dieser Arbeit wurde erstmals eine Darstellung aller HIKs aus *M. oryzae* in einem phylogenetischen Baum angefertigt und eine Zuordnung der einzelnen Proteine in die entsprechenden Gruppen vorgenommen. Die Proteinsequenz von MoHik1p konnte wie erwartet der Gruppe III zugeordnet werden (Vetcher *et al.*, 2007; Yoshimi *et al.*, 2005). Alle in dieser Gruppe eingeordneten Proteinsequenzen sind hochkonserviert und haben charakteristische N-terminale HAMP-Domänen, welche bereits im vorigen Abschnitt näher diskutiert wurden. Charakteristisch für die Gruppe VI ist indes die N-terminale Transmembrandomäne, weswegen auch die Sequenz von MoSln1p hier eingegliedert ist. Diese Gruppe beinhaltet je ein Sln1p-Homolog von jeder untersuchten Spezies. Dies verdeutlicht weiter die Relevanz dieses Sensorproteins in Pilzen, ähnlich wie bei den Elementen der Gruppe III (z.B. MoHik1p). Auch die Proteinsequenzen der HIKs MoHik2p-MoHik9p konnten alle erfolgreich einzelnen Gruppen zugeordnet werden (Abb. 17). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte biologische Charakterisierung der HIKs aus *M. oryzae* kann somit einen ersten Ansatz zum Verständnis dieser bisher unzureichend untersuchten Gruppen leisten.

Die Proteinsequenz von MoHik8p, das im Rahmen dieser Arbeit als essenziell für die Konidiogenese sowie Pathogenität eruierte Protein, wird in die Gruppe XI eingeordnet. Diese Gruppe setzt sich aus auffällig vielen HIK-Proteinsequenzen aus phytopathogenen Pilzen zusammen. Das kann darin begründet liegen, dass eine Erhöhung der Anzahl an Gruppe XI-Histidinkinasen mit einer Steigerung der Anpassungsfähigkeit an verschiedene ökologische Nischen einhergeht, beispielsweise beim Wechsel vom *ex planta*- zum *in planta*-Wachstum. Die am häufigsten vertretenen HIK-Proteinsequenzen dieser Gruppe stammen aus den beiden Dothideomyceten (Loculoascomyceten) *C. heterostrophus* und *M. graminicola*. Weiterhin sind die Sequenzen von MoHik4p und MoHik9p in dieser Gruppe zu finden. Die Mutante  $\Delta$ *Mohik4* ist zwar nicht apathogen wie  $\Delta$ *Mohik8*, aber erheblich in ihrer Virulenz reduziert (Abb. 27). Der Mutantenstamm  $\Delta$ *Mohik9* ist nahezu voll virulent, das Protein MoHik9p hat aber, wie in dieser Arbeit aufgezeigt, diverse Funktionen in der Zellwandintegrität und der Signaltransduktion von Hypoxie (Abb. 22, Abb. 25). Dies ist in der Diskussion zur Beteiligung von MoHik5p und MoHik9p an der Zellwandintegrität und Signaltransduktion von Hypoxie genauer dargelegt und erweist sich als passend zur Theorie der Steigerung der Anpassungsfähigkeit an komplexe ökologische Nischen durch paralog vermehrte Proteine. Zur Gruppe V gehört auch die Sequenz von MoHik5p, einem weiteren Pathogenitätsfaktor aus *M. oryzae*. In jeder Spezies mit Ausnahme von *S. cerevisiae* ist eine HIK aus dieser Gruppe codiert, ebenso wie in den Gruppen III und VI. Das deutet abermals auf die Unabdingbarkeit dieses Proteins hin und kann wiederum als Beleg für den Verlust der Fähigkeit zur Konidiogenese und der Pathogenität des Mutantenstamms  $\Delta$ *Mohik5* gewertet werden.

### 6.2.3 **MoHIK5 und MoHIK8 sind essenziell für die Konidiogenese und die Appressorienbildung**

Die Differenzierungsvorgänge in *M. oryzae* in der Präpenetrationsphase, von der Adhäsion der Konidie auf der Blattoberfläche bis zum Eindringen in das Blattgewebe, sind ebenso von Relevanz für die Pathogenität von *M. oryzae* wie die Infektion an sich und das nachfolgende invasive Wachstum beim Kolonisieren der Pflanze. Veränderungen in der Konidiogenese wurden für die bereits in der Literatur bekannten Mutanten mit den inaktivierten HIK-codierenden Genen *MoSLN1* und *MoHIK1* nicht beschrieben (Zhang *et al.*, 2010; Motoyama *et al.*, 2005b). Im Rahmen dieser Arbeit konnten diesbezüglich auch keine Besonderheiten bei  $\Delta$ *Mosln1* und  $\Delta$ *Mohik1* beobachtet werden. Lediglich die Anzahl der produzierten Konidien war bei  $\Delta$ *Mosln1* im Vergleich zum WT deutlich vermindert (Abb. 18). Auffällig war hingegen die Konidienform der Mutantenstämme  $\Delta$ *Mohik5* und  $\Delta$ *Mohik8* (Abb. 19). Nicht nur die Anzahl der Konidien war gegenüber dem WT und den restlichen Mutantenstämmen stark verringert, auch morphologische Veränderungen wurden deutlich. Die Konidien von  $\Delta$ *Mohik5*

und  $\Delta Mohik8$  waren nicht wie für *M. oryzae* üblich dreizellig und ellipsoid, sondern ein- bis zweizellig und kugelförmig (Abb. 19).

Mutantenstämme mit zweizelligen Konidien, wie  $\Delta Moigd1$ , wurden bereits in *M. oryzae* beschrieben (Balhadere *et al.*, 1999). Diese wurden mittels REMI („restriction enzyme mediated insertional)-Mutagenese erzeugt und waren in zwei anstatt drei Zellkompartimente unterteilt, obwohl sie noch immer die typische ellipsoide Form hatten. Bereits diese Veränderung hatte Effekte wie leicht verminderte Virulenz oder Beeinträchtigungen im vegetativen Wachstum zur Folge. In dieser Mutante war die Keimschlauch- und Appressoriendifferenzierung nicht wesentlich beeinflusst, sondern lediglich etwas zeitverzögert (Balhadere *et al.*, 1999). Des Weiteren sind mehrere „con“-Mutantenstämme bekannt, die in unterschiedlichen Phasen der Konidiogenese beeinträchtigt sind (Shi und Leung, 1995; Shi *et al.*, 1998). Während die Stämme  $\Delta Mocon5$  und  $\Delta Mocon6$  gar keine Konidien differenzieren, bilden  $\Delta Mocon1$  und  $\Delta Mocon2$  verglichen mit dem WT eine wesentlich verminderte Anzahl morphologisch veränderter Konidien. Bei  $\Delta Mocon1$  sind die Konidien sehr dünn und in die Länge gezogen, bei  $\Delta Mocon2$  werden Konidien nur in Abwesenheit von direkter Lichtbestrahlung gebildet. Auch bei  $\Delta Mocon4$  und  $\Delta Mocon7$  ist die Form der Konidien dünn und länglich (Shi *et al.*, 1998). In den meisten Fällen wurden die für diese Effekte verantwortlichen *con*-Gene nicht gezielt weiter untersucht oder charakterisiert. Nur für *MoCON7* konnte gezeigt werden, dass das Gen einen Transkriptionsfaktor codiert, dessen Genprodukte in Zusammenhang mit der infektiionsrelevanten Morphogenese und der Zellwandbiosynthese in *M. oryzae* gebracht werden können (Odenbach *et al.*, 2007). Mutationen im Genlocus von *MoSMO1* oder auch *MoTEA4* resultieren in einer starken morphologischen Veränderung der Konidien, jedoch sind auch bei diesen Mutanten noch mehrere Zellkompartimente innerhalb der Konidien zu sehen (Hamer *et al.*, 1989; Patkar *et al.*, 2010). Das Phänomen von einzelligen kugelrunden lebensfähigen Konidien war bisher noch nicht für *M. oryzae* beschrieben. Die Stämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  sind die ersten, die eine derartige Morphologie zeigen.

Der Keimungsprozess und die Differenzierung der Appressorien erfolgt auf der Blattoberfläche und dieser Vorgang benötigt außer Wasser keine weiteren exogenen Nährstoffe (Thines *et al.*, 2000). Die Nährstoffe und Bausteine für das Wachstum des Keimschlauchs und die Appressorienbildung sind schon vor der Keimung in den Konidien vorhanden. Zwei Entwicklungsphasen sind charakteristisch für die Präpenetrationsphase. Zum einen ist die Erkennung der richtigen Oberfläche wichtig, um den Keimungsprozess zu starten. Ein Keimschlauch bildet sich und wiederum wird durch Oberflächensignale die Morphogenese zur Differenzierung der Appressorien eingeleitet (Bourett und Howard, 1990). Zum anderen sind während der Reifung des Appressoriums Veränderungen der Zellwandstruktur, die Biosyn-

these von Melanin und die Synthese von Glycerin die entscheidenden Differenzierungsprozesse (Thines *et al.*, 2000). Die *de novo* Synthese von Glycerin, um durch Osmose den für die Penetration der Kutikula essenziellen Turgor aufzubauen, ist noch nicht ausreichend verstanden. Der HOG-Signalweg als Kontrollmechanismus des zellulären Turgors scheint interessanterweise nicht in diesen Vorgang im Appressorium eingebunden zu sein. In Appressorien von Mutantenstämmen  $\Delta Mohog1$  ist der gleiche Turgor festzustellen wie im WT (Dixon *et al.*, 1999). Bei der Signaltransduktion im *PMK1*-Signalweg im Verlauf der Appressorienbildung spielt der „second messenger“ cAMP eine große Rolle. Durch die Adenylylcyclase MoMac1p wird cAMP synthetisiert (Choi und Dean, 1990) und bindet an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A. Das löst deren Aktivierung aus und dies führt schließlich zur Induktion der Appressorienbildung (Bruno *et al.*, 2004).

Die bereits in der Konidiogenese auffälligen Mutantenstämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  waren auch in Bezug auf die Differenzierung der Keimschläuche und Infektionsstrukturen außergewöhnlich. Bei beiden Mutantenstämmen sind bei auskeimenden Konidien zunächst zwei sich gegenüberliegende Keimschläuche zu sehen, die wesentlich länger sind als beim WT (Abb. 21). Während  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  auf hydrophoben Oberflächen oder mit der Zugabe von 1,16-HDD keine mit dem WT vergleichbaren Infektionsstrukturen ausbilden konnten, waren bei den anderen HIK-Mutantenstämmen keine großen Unterschiede zum WT festzustellen (Abb. 20, Abb. 21). Natürlich kann das Ausbleiben von Penetrationsstrukturen auch durch fehlende bzw. gestörte physiologische Gegebenheiten oder durch andere pleiotrope Effekte in den missgebildeten Konidien von  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  begründet sein. Eine Ausnahme war der Stamm  $\Delta MosIn1$ . Dieser konnte auf hydrophoben Deckgläsern zwar einige Appressorien bilden, deren Anzahl war jedoch verglichen mit dem WT stark reduziert und die Appressorien erscheinen leicht deformiert. Ohne den Stimulus der hydrophoben Oberfläche und nur mit Zugabe von 1,16-HDD waren gar keine Appressorien zu erkennen. Physikalische Reize wie die hydrophobe Oberfläche resultierten in der Mutante  $\Delta MosIn1$  zwar noch in einem Differenzierungsprozess, welcher jedoch gestört ist. Da durch chemische Stimuli wie 1,16-HDD in  $\Delta MosIn1$  keine Induktion der Appressorienbildung möglich war, könnte die induktive Wirkung von 1,16-HDD in Zusammenhang mit dem Membranprotein MoIn1p oder mit von diesem beeinflussten Proteinen oder Signalwegen gebracht werden.

Es kann eine Funktion der drei HIKs MoIn1p, MoHik5p und MoHik8p in dem komplexen Netzwerk des *PMK1*-Signalwegs für Appressoriendifferenzierung vermutet werden. Die Beteiligungen der HIKs an Phosphorylierungen oder Interaktionen der Proteinkinasen MoPmk1p, MoMck1p, MoMps1p oder eine Beeinflussung der regulatorischen Untereinheit der PKA (MoSum1p) sind denkbar. Es ist möglich, diese Vermutungen anhand globaler



Phosphoproteomanalysen zu untersuchen. Methoden wie SILAC („stable isotopic labeling by amino acids in culture“; Mann, 2006) oder eine quantitative Massenspektroskopie mit iTRAQ („Isobaric tags for relative and absolute quantitation“, etwa mit einer Titandioxid Exchange Säule; Mertins *et al.*, 2012) könnten zum Einsatz kommen, um in dem WT und den entsprechenden Mutantenstämmen die Phosphorylierungsmuster und damit verbunden mögliche Interaktionspartner und beteiligte Signalkaskaden näher zu analysieren. Die Proteine MoMck1p und MoMps1p sind nicht nur als Teil des *PMK1*-Signalwegs an der Differenzierung von Appressorien beteiligt, sondern auch in Prozessen involviert, die Zellwandintegrität gewährleisten (Jeon *et al.*, 2008). Dies könnte auch für MoHik5p zutreffen und wird im nächsten Abschnitt näher erläutert.

#### 6.2.4 *MoHIK5* und *MoHIK9* sind wichtig für die Zellwandbiogenese

Die Porengröße der pilzlichen Zellwand ist ein limitierender Faktor für die Aufnahme von Molekülen oder Umweltfaktoren. Sie bestimmt weiterhin, neben Transport- und Kanalproteinen, welche intrazellulären Syntheseprodukte ins extrazelluläre Milieu sekretiert werden können (Money, 1990).

In den Mutantenstämmen  $\Delta$ *Mohik5* und  $\Delta$ *Mohik9* werden autolytische Prozesse früher beobachtet als im WT. Diese Beobachtungen werden gestützt durch die Resultate des Protoplastentests. Die Zellwände der Hyphen von  $\Delta$ *Mohik5* und  $\Delta$ *Mohik9* werden durch die Behandlung mit lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum* wesentlich schneller und effektiver lysiert als die Zellwände des WTs (Abb. 22). Eben diese Phänomene der frühen Autolyse und der Sensitivität gegen lytische Enzyme wurden für  $\Delta$ *Momps1* und  $\Delta$ *Momck1* bereits beschrieben (Xu *et al.*, 1998; Jeon *et al.*, 2008). Dies unterstreicht deren putative Rolle für die Zellwandintegrität, denn MoMps1p und MoMck1p sind homologe Proteine zu Slp2p und Bck1p aus *S. cerevisiae* die wiederum in die Biogenese der Hefezellwand eingebunden sind (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2005). Die Integrität der Zellwand ist ohne die Genprodukte von *MoHIK5* und *MoHIK9* stark verändert bzw. deren Funktion als Schutzbarriere scheint geschwächt. In Ermangelung von Appressorien in  $\Delta$ *Mohik5* können keine etablierten Untersuchungen zur Zellwandintegrität der Appressorienzellwand mittels Glycerin- (Howard *et al.*, 1991) oder PEG-gestützten Tests (Jeon *et al.*, 2008) durchgeführt werden. Ein Zytorrhysetest nach Howard *et al.* (1991) wurde für  $\Delta$ *Mohik9* und auch für die anderen HIK-Mutanten durchgeführt, jedoch waren keine deutlichen Unterschiede im Turgor der Appressorien der Mutantenstämmen im Vergleich zum WT festzustellen (Daten nicht gezeigt). Um die Beteiligung von MoHik5p in der Zellwandintegrität vegetativen Myzels von  $\Delta$ *Mohik5* zu untersuchen, könnten die PEG-gestützten Tests nicht wie von Jeon *et al.* (2008) anhand

von Appressorien, sondern wie bei Arbeiten zu *Achlya bisexualis* mit vegetativen Hyphen durchgeführt werden (Money, 1990).

### 6.2.5 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen sind wichtig für Signaltransduktion und Anpassung an Umweltveränderungen

Die Wachstumsanalyse der HIK-Mutanten auf verschiedenen Festmedien lieferte erste Anhaltspunkte zu den möglichen Funktionen der inaktivierten Gene bzw. deren Genprodukte in der Physiologie von *M. oryzae*.

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutantenstämme  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  war gegenüber dem WT deutlich reduziert, wobei dieser Effekt bei  $\Delta Mohik5$  am stärksten ausgeprägt war (Abb. 23, Abb. 24). Eine Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit in den Mutanten  $\Delta Mopmk1$ ,  $\Delta Most7$  und  $\Delta Most11$  ist in der Literatur gut dokumentiert (Zhao *et al.*, 2005). Erklärungen hierfür sind bisher aber nicht in der Literatur zu finden. Die Auswirkungen einer Geninaktivierung auf physiologische und für das Wachstum relevante Prozesse sind insbesondere bei Signalproteinen für die Vitalität des Organismus entscheidend. Es erscheint evident, dass Inaktivierungen bestimmter Stoffwechselforgänge oder Differenzierungsprozesse eine merkliche Beeinträchtigung der Wachstumsgeschwindigkeit zur Folge haben.

Eine Temperatursensitivität war bei den Wachstumstests mit HIK-Mutanten nur in geringem Maße zu beobachten. Eine Zugehörigkeit einzelner HIKs zum Signalnetzwerk für Erkennung oder Anpassung an wechselnde Temperaturen lässt sich mit den Testergebnissen dieser Arbeit nicht treffen. Die Veränderungen in der Membranfluidität bzw. im Phospholipidgehalt, wie bereits im ersten Teil der Diskussion erläutert, haben auf die im Zytosol lokalisierten HIKs MoHik2p-MoHik9p keinen Einfluss.

Durch die Zugabe von Kupfer können Defekte der Melaninbiosynthese in Pilzen komplementiert werden. Dies wurde bereits in *C. neoformans* und *Colletotrichum lindemuthianum* beschrieben (Torres-Guerrero und Edman, 1994; Parisot *et al.*, 2002) und ist auf die Beteiligung von Phenoloxidasen (Laccasen) zurückzuführen, die in den meisten Pilzen vermutlich Kupferzentren beinhalten. Eine im Vergleich zum WT dunklere Färbung des Myzels der Mutantenstämme  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik2$  und  $\Delta Mohik5$  bei Kupferzugabe könnten auf eine durch Kupfer ausgelöste Steigerung der Melaninproduktion in diesen Stämmen hindeuten (Abb. 23). Die Melanisierung der Mutantenstämme  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik2$  und  $\Delta Mohik5$  entspricht ohne Kupferzugabe der des WTs. In *C. neoformans* wird Dihydroxyphenylalanin (DOPA) durch die Phenoloxidase zum entsprechenden Chinon oxidiert, welches durch

Autoxidation zu Melanin reagiert (Torres-Guerrero und Edman, 1994). Eine solche Melanisierung liegt aber nicht in der Wechselwirkung von Kupferatomen an den beteiligten Enzymen der Biosynthese von Melanin begründet, denn die aktiven Zentren der Phenoloxidasen sollten im Normalzustand alle mit Kupferatomen gesättigt sein. Zusätzliche Kupferatome können also keinen Effekt wie die Steigerung der Aktivität auf die Enzyme der Melaninbiosynthese haben. Die dunkle Färbung des Myzels der Mutantenstämme muss also aus anderen Effekten, wie etwa Ionenstress durch zu viel  $\text{CuSO}_4$ , hervorgehen. Um erste Hinweise einer möglichen Verbindung zur Melaninbiosynthese zu erhalten, könnten künftig die Transkriptmengen der Melaninbiosynthesegene *MoALB* oder *MoBUF1* des WTs mit den entsprechenden Transkriptmengen in den Stämmen  $\Delta\text{MosIn1}$ ,  $\Delta\text{Mohik2}$  und  $\Delta\text{Mohik5}$  anhand von q-PCR-Analysen verglichen werden.

Der Einfluss von NaCl und Sorbit war bei keiner getesteten HIK-Mutante so signifikant wie bei  $\Delta\text{MosIn1}$  oder  $\Delta\text{Mohik1}$  (genauere Erläuterungen zu  $\Delta\text{MosIn1}$  und  $\Delta\text{Mohik1}$  sind bereits im ersten Teil der Diskussion dargelegt). Da die Signalerkennung und somit die Anpassung an die Stresssituationen in den entsprechenden Mutantenstämmen ohne große Einschränkung funktioniert, ist eine Beteiligung von MoHik2p-MoHik9p am HOG-Signalweg für Salz- oder Zuckerstress nicht anzunehmen.

Das Wissen über den Stickstoffmetabolismus von phytopathogenen Pilzen im Verlauf der Wirtskolonisierung ist nicht sehr umfangreich. Nekrotrophe Pathogene sind bekannt dafür, ein breiteres Spektrum an Stickstoffquellen zu nutzen als biotrophe Organismen, die sich von lebendem Pflanzengewebe ernähren und nur Zugang zu Stickstoffquellen im Apoplasten oder in der haustorialen Matrix haben (Snoeijs *et al.*, 2000). Nitrat aus der Umwelt wird normalerweise durch Mikroorganismen zu Ammoniak reduziert ( $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{HNO} \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3$ ), das anschließend direkt für physiologische Reaktionen weiterverwendet wird. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von  $\text{NH}_3$  in der Biosynthese der Aminosäure Glutamin (Marzluf, 1997). Das Amid von Glutamin findet vielfältige Verwendung als Baustein in vielen biochemischen Synthesen von Aminosäuren, Aminoazuckern, Nukleotiden und Koenzymen (Bender, 2012). Nitrat in für den WT subletalen Mengen hatte auf die Vitalität der HIK-Mutanten, mit Ausnahme der Doppelmutante  $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{sln1}$ , keinen Einfluss. Der Stamm  $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{sln1}$  konnte unter Nitratstress nicht wachsen. Das könnte ähnliche Gründe haben wie die im Vergleich zum WT und den Einzelmutanten  $\Delta\text{Mohik1}$  und  $\Delta\text{MosIn1}$  ausgeprägte Sensitivität von  $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{sln1}$  gegenüber Salz- und Zuckerstress (Abb. 10). Die Stämme  $\Delta\text{Mohik1}$  und  $\Delta\text{MosIn1}$  könnten beide für den Metabolismus von Nitrat von Bedeutung sein. Bei einer Einzelinaktivierung von *MoHIK1* oder *MoSLN1* könnte, wie schon bei Salz- und Zuckerstress, die jeweils andere HIK die wichtigsten Funktionen aufrechterhalten.

### 6.2.6 MoHik5p, MoHik9p und Signaltransduktion von Hypoxie im HOG-Signalweg

Die HIKs MoSin1p, MoHik5p und MoHik9p wurden im Verlauf dieser Arbeit als mögliche Komponenten eines Hypoxie-Signaltransduktionssystems identifiziert. Der Zustand der Hypoxie wurde mit den Reagenzien  $\text{CoCl}_2$  oder  $\text{NaNO}_2$  imitiert (Lee *et al.*, 2007; Salnikov *et al.*, 2004). Cobalt ist unter anderem Bestandteil von Vitamin B12 (Cobalamin) und als Spurenelement für viele physiologische Prozesse essenziell. In höheren Mengen ist es für Organismen toxisch, in subletalen Mengen werden hypoxieähnliche physiologische Zustände bzw. Reaktionen im Organismus ausgelöst. Dies liegt darin begründet, dass Cobalt sauerstoffabhängige Enzyme inhibiert, Eisen- oder Schwefelzentren in Enzymkomplexen oxidiert und zur Induktion der HIF-1 („hypoxia inducible factor-1“)-abhängigen Genexpression von Säugerzellen führt (Befani *et al.*, 2013). Die Genexpressionsmuster in *Cryptococcus neoformans* bei Hypoxie gleichen ebenfalls denen unter dem Einfluss von Cobalt (Lee *et al.*, 2007). Des Weiteren führt Cobalt zu einer Reduktion von intrazellulärem Vitamin C-Gehalt (Salnikov *et al.*, 2004). Bisher wurde Cobalt nicht nur in Studien zu Säugerzellen, sondern auch für pilzliche Organismen wie *C. neoformans* als Hypoxie-induzierendes Reagenz eingesetzt (Ingavale *et al.*, 2008).

Nitrit wird innerhalb der Zelle durch die Nitritreduktase zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert, wobei die Nitritreduktase durch hohe Sauerstoffkonzentrationen gehemmt wird. Während eine hohe Sauerstoffkonzentration zur Hemmung der Nitritreduktase führt, hat Hypoxie eine Steigerung der NO-Bildung zur Folge (Rong *et al.*, 2013). Die Zugabe von  $\text{NaNO}_2$  in subletalen Mengen in das Testmedium kann den gleichen Effekt auslösen wie das Absinken des Sauerstoffgehaltes. Die Nitritreduktase ist aktiv und bildet mit  $\text{NaNO}_2$  als Substrat vermehrt NO. Durch NO werden unterschiedliche hypoxische Reaktionen in der Zelle ausgelöst bzw. beeinflusst. Zum einen bilden sich reaktive Stickstoffspezies (RNS, „reactive nitrogen species“). Die Targets solcher RNS sind die Eisen- oder Schwefelzentren in Enzymkomplexen, aber auch DNA, Thiolgruppen an Proteinen und Lipide (De Groot und Fang, 1995). Zum anderen ist die Hemmung der Komplexe der Atmungskette durch Nitrit dokumentiert (Joseph-Horne *et al.*, 2001; Drapier, 1997).

Bei Zugabe der hypoxischen Reagenzien in den für den WT subletalen Mengen war die Vitalität der HIK-Mutantenstämme  $\Delta\text{Mosin1}$ ,  $\Delta\text{Mohik5}$  und  $\Delta\text{Mohik9}$  im Vergleich zum WT am stärksten von allen zur Verfügung stehenden Mutanten eingeschränkt (Abb. 23, Abb. 24). Eine vergleichbare Sensitivität gegenüber den hypoxischen Reagenzien wurde bei den HOG-Signalweg-Mutantenstämmen beobachtet (Abb. 8, Abb. 9). Eine Beteiligung des HOG-Signalwegs an der Signaltransduktion von Hypoxie in *M. oryzae* war bisher nicht beschrie-

ben. Arbeiten mit *C. neoformans* verweisen jedoch bereits auf die Rolle der Gruppe III-HIK Tco1p und die des HOG-Signalwegs in Bezug auf zelluläre Resistenz gegenüber Hypoxie. Analog zu  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  sind Mutanten ohne Tco1p nicht in der Lage adäquat bei hypoxischen Bedingungen zu wachsen (Chun *et al.*, 2007).

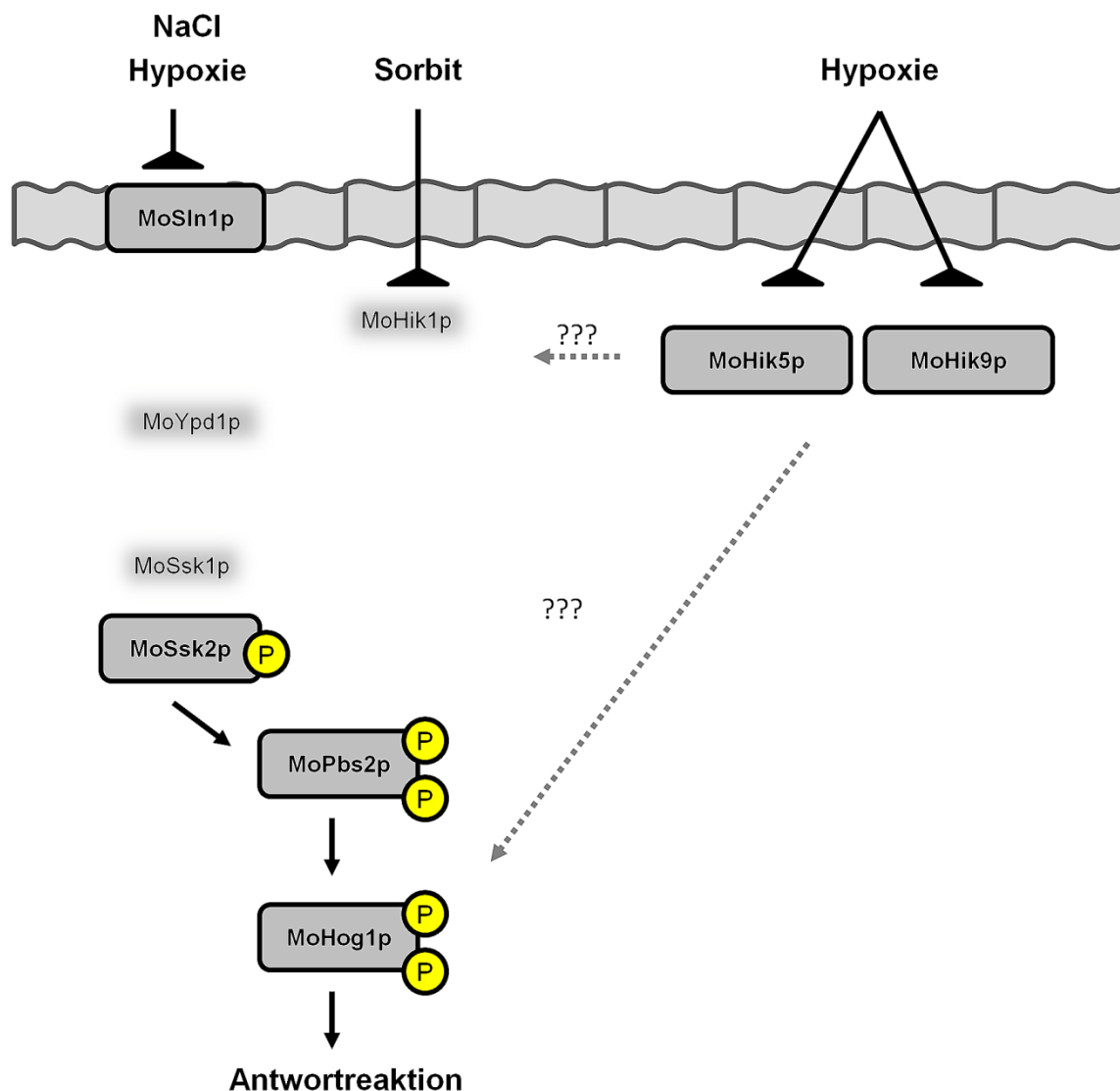
Die Einordnung von MoSln1p, MoHik5p und MoHik9p in ein Modell des HOG-Signalwegs für Hypoxie (Abb. 32) erfolgte anhand der Wachstumsversuche unter Zugabe von  $CoCl_2$  oder  $NaNO_2$  sowie anhand von Western Blot-Analysen mit dem Phospho-p38 MAPK Antikörper. Die Western Blot-Analysen bestätigten die ersten Vermutungen, dass der HOG-Signalweg in die physiologische Reaktion auf Hypoxie eingebunden ist (Abb. 26). Niedrige Sauerstoffkonzentration (imitiert durch Applikation von  $NaNO_2$ ) bewirkt vermutlich eine Störung des Phosphorelaysystems und folglich eine Aktivierung des HOG-Signalwegs durch Phosphorylierung von MoHog1p (Abb. 32).

Die beiden Sensorproteine MoHik5p und MoHik9p haben mehrere PAS-Domänen (Abb. 16), welche generell als Sensoren für Licht und Sauerstoff angesehen werden (Taylor und Zhulin, 1999; Pellequer *et al.*, 1999). Eine Erkennung von Sauerstoffmangel durch die PAS-Domänen von MoHik5p und MoHik9p resultiert möglicherweise in deren Dephosphorylierung. Das Phosphorelaysystem wird derartig beeinflusst, dass die MAPK-Kaskade des HOG-Signalwegs aktiviert und damit die Phosphorylierung von MoHog1p ausgelöst wird. Eine Hog1p-vermittelte Antwortreaktion auf Hypoxie ist die Konsequenz.

Analog zu den Versuchen mit MoSln1p und MoHik1p bei NaCl- oder Sorbitstress im ersten Teil dieser Arbeit wird das Phosphorylierungsmuster in den Mutantenstämmen wahrscheinlich nach Inaktivierung von nur einer HIK (z.B. MoHik5p) durch andere HIKs (z.B. MoSln1p oder MoHik9p) aufrechterhalten. Die anderen HIKs kompensieren sozusagen den Verlust einer HIK. Eine Bestätigung hierfür wird wieder in den Ergebnissen der Western Blot-Analysen beobachtet. Da eindeutige Chemolumineszenzsignale von MoHog1p bei Hypoxie ( $NaNO_2$ ) in Proben des WT und der Mutantenstämmen  $\Delta MosIn1$ ,  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  zu beobachten waren, nicht aber in Proben der Mutantenstämmen  $\Delta Moypd1$ ,  $\Delta Mossk1$ ,  $\Delta Mossk2$ ,  $\Delta Mopbs2$  und  $\Delta Mohog1$ , konnte eine Beteiligung von MoSln1p, MoHik5p und MoHik9p nicht eindeutig bewiesen werden. Hingegen sind MoYpd1p, MoSsk1p, MoSsk2p, MoPbs2p und MoHog1p essenziell für die Signaltransduktion bei Hypoxie im HOG-Signalweg.

Die Beteiligung von MoSln1p, MoHik5p und MoHik9p wurde mit Hilfe der Sensitivität gegenüber  $NaNO_2$  oder  $CoCl_2$  in den Wachstumstests (Abb. 25) und den Sequenzanalysen postuliert (Abb. 16). Anhand der Wachstumsversuche in Kombination mit den Western Blot-

und auch den Sequenzanalysen konnte ein einfaches Modell des HOG-Signalwegs bei der Signaltransduktion von Hypoxie aufgestellt werden (Abb. 32).



**Abb. 32:** Ein Modell, das die Signaltransduktion von NaCl, von Sorbit und bei Hypoxie mit dem HOG-Signalweg in *Magnaporthe oryzae* beschreibt. NaCl wird durch die HIK MoSln1p und Sorbit durch MoHik1p erkannt. Die Signaltransduktion von Hypoxie erfolgt durch MoSln1p, MoHik5p und MoHik9p. Durch die Dephosphorylierung von MoSsk1p wird in allen drei Fällen die MAPK-Kaskade aktiviert und MoHog1p phosphoryliert. Es folgt die Antwortreaktion.

Obwohl Wasserstoffperoxid in vielen pathogenen Pilzen wie *C. albicans* als Hog1p-Aktivator bekannt ist (Alonso-Monge *et al.*, 2003), wird der HOG-Signalweg in *M. oryzae* unter dem Einfluss von  $H_2O_2$  nicht aktiviert (Motoyama *et al.*, 2008). Dies verdeutlicht die Diversität des HOG-Signalwegs und dessen unterschiedliche Funktionen von Spezies zu Spezies trotz der Homologien. Durch die Zugabe von  $H_2O_2$  waren die HIK-Mutantenstämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  in ihrem Wachstum beeinflusst. Bei den Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg war dies nicht der Fall (Abb. 24). Die Sensitivität von  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik9$  gegenüber  $H_2O_2$

bestärkt die Annahme einer möglichen Funktion der PAS-Domänen als Sauerstoffsensoren. Das Signal erhöhter Sauerstoffkonzentration kann von den PAS-Domänen der HIKs MoHik5p und MoHik9p erkannt und, im Gegensatz zu Hypoxie, über einen HOG-unabhängigen Signalweg weitergeleitet und verarbeitet werden. Kontrollierte Versuche in Sauerstofftestkammern bei definierten Sauerstoffkonzentrationen scheinen geeignet in weiteren Untersuchungen sowohl von Hyper-, als auch Hypoxie in *M. oryzae* neue Erkenntnisse zu gewinnen. Diese Experimente sollten in Zusammenhang mit Transkriptom-, Western Blot- oder Phosphoproteomanalysen durchgeführt werden, um die phänotypischen Beobachtungen zu verifizieren.

### 6.2.7 HIKs sind Virulenzfaktoren - MoHik5p und MoHik8p sind Pathogenitätsfaktoren

Die Untersuchungen zu Virulenz und Pathogenität belegen die Wichtigkeit der Signalproteine für die pathogene Lebensweise von *M. oryzae*. Alle HIK-Mutanten mit Ausnahme von  $\Delta$ *Mohik7* und  $\Delta$ *Mohik9* waren in den Pflanzentests weniger virulent als der WT (Abb. 27). Sie können somit als Virulenzfaktoren angesehen werden. Virulenz bezeichnet die relative Fähigkeit eines Mikroorganismus, eine Krankheit bzw. die Krankheitssymptome auszulösen (Casadevall und Pirofski, 2001). Ein Virulenzfaktor ist ein Element (z.B. ein Protein oder Stoffwechselprodukt), das die Ausprägung und Stärke der Virulenz eines Pathogens beeinflusst. HIKs haben in Phosphorelaysystemen oder Signalkaskaden wichtige Funktionen in Differenzierungsprozessen, die für die Entwicklung und Vitalität verantwortlich sind (Li *et al.*, 2010). Sie sind in pathogenen Pilzen als Teil von Zweikomponenten- und Phosphorelaysystemen in der Zellwandbiosynthese eingebunden, in Fungizidresistenz, in morphologischen Differenzierungsprozessen und werden eben auch als Virulenzfaktoren beschrieben (Nemecek *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten MoHik5p und MoHik8p als bisher noch nicht beschriebene Pathogenitätsfaktoren in *M. oryzae* identifiziert werden. Die Mutantenstämme  $\Delta$ *Mohik5* und  $\Delta$ *Mohik8* sind bei den Pflanzensprühtests vollkommen apathogen (Abb. 28). Da das invasive *in planta*-Wachstum ist jedoch nicht beeinträchtigt ist (Abb. 28), kann gefolgert werden, dass nur der Penetrationsprozess oder die Differenzierungsprozesse in der Präpenetrationsphase gestört sind. Diese Beobachtungen lassen sich mit der atypischen Konidienform und den fehlenden Appressorien von den Mutanten  $\Delta$ *Mohik5* und  $\Delta$ *Mohik8* erklären. Der Verlust der Pathogenität ist auf die Störungen in den Differenzierungsprozessen im Infektionszyklus vor der Penetrationsphase zurückzuführen. Die Proteine MoHik5p und MoHik8p sind essenziell für die pathogene Entwicklung in *M. oryzae* und stellen damit geeignete Angriffspunkte für protektiv einsetzbare Fungizide dar. Durch Inhibition dieser Proteine wird der Infektionszyk-

lus von *M. oryzae* unterbrochen, so dass die Wirtspflanze nicht mehr kolonisiert werden kann. Dadurch wird der Einsatz von MoHik5p und MoHik8p als neue Fungizidtargets für protektive Pflanzenschutzmittel durchaus denkbar, muss aber validiert werden. Es muss durch geeignete Studien entweder *in vitro* am gereinigten Protein oder *in vivo* anhand von Mutantenstämmen überprüft werden, ob die Proteine bzw. deren Funktion von Wirkstoffen adressierbar sind. So könnten ökologisch verträgliche, nicht-fungitoxische Wirkstoffe gefunden werden, die nur die infektionsrelevante Morphogenese phytopathogener Pilze an den HIKs MoHik5p und MoHik8p hemmen, nicht aber die für das Ökosystem wichtige Mikroorganismen beeinträchtigen.



## 7 AUSBLICK

Diese Arbeit bildet eine zuverlässige Basis für weitere Untersuchungen zum Verständnis von Signaltransduktions- und Differenzierungsprozessen phytopathogener Pilze. Die im ersten Teil gegebene umfassende Beschreibung des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* sollte in mehrere Richtungen erweitert werden, um fundiertes Wissen über die Osmoregulation phytopathogener Pilze und die Wirkmechanismen von Agrarfungiziden wie Fludioxonil zu erlangen.

Die vorgelegten Analysen konzentrieren sich auf das Phosphorelaysystem und die MAPK-Kaskade des HOG-Signalwegs von *M. oryzae*. Als nächster Schritt empfiehlt sich die Suche nach Transkriptionsfaktoren, die durch den HOG-Signalweg reguliert werden. Das Verständnis transkriptioneller und posttranskriptioneller Ereignisse sollte mittels „RNA-Seq“ oder „ChIP-on-Chip“-Experimenten bei Salzstress, Hypoxie- oder Fungizideinwirkung analysiert werden. Um die Auswirkungen der Geninaktivierungen auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene zu verifizieren, ist es sinnvoll die Analysen zusätzlich mit den Mutantenstämmen durchzuführen. So wird die Modellierung des HOG-Signalwegs für unterschiedliche Umweltstimuli möglich.

Der Wirkmechanismus von Fludioxonil kann mit *in vitro*-Studien weiterverfolgt werden. Die homologe Expression der beteiligten Proteine des Phosphorelaysystems und ein Nachweis der Protein-Protein- und Protein-Wirkstoff-Interaktionen mittels „Microscale Thermophoresis (Nanotemper)“ sind durchführbar. Eine Expression und Isolierung der Proteine würde auch deren Co-Kristallisation mit dem Fungizid ermöglichen und somit zum Auffinden der Bindestelle von Fludioxonil beitragen.

Die im zweiten Teil der Arbeit mit der Charakterisierung der HIK-codierenden Gene aus *M. oryzae* vorgestellten Überlegungen zu Beteiligungen der HIKs an verschiedenen Signalwegen zur Konidiogenese, Appressorienbildung oder dem HOG-Signalweg sind zu verifizieren. Es ist möglich, die Vermutungen anhand globaler Phosphoproteomanalysen zu untersuchen. Methoden wie „SILAC“ oder eine quantitative Massenspektroskopie mittels „iTRAQ“ eignen sich zur näheren Analyse der Phosphorylierungsmuster und damit verbunden möglicher Interaktionspartner und beteiligter Signalkaskaden in dem WT und den entsprechenden Mutantenstämmen.

Die Entwicklung von Testsystemen für ein Screening nach protektiven Pflanzenschutzmitteln mit den Proteinen MoHik5p und MoHik8p wäre sicher aussichtsreich. Dabei sollten sowohl *in vivo*- also auch *in vitro*-Systeme in Betracht gezogen werden. Die Etablierung Target-basier-

ter *in vivo*-Testsysteme mit HIK-Mutantenstämmen von *M. oryzae* ist möglich, wie z.B. die Resistenz von  $\Delta Mohik1$  und anderen Mutantenstämmen gegenüber Fludioxonil gezeigt hat.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Das aus wissenschaftlicher und ökonomischer Sicht wichtigste Pflanzenpathogen *M. oryzae* entwickelte im Laufe der Evolution konservierte aber auch einzigartige Mechanismen zur Signaltransduktion. Das Erforschen dieser Mechanismen und Prozesse ist essenziell für das Verständnis von Differenzierungsprozessen bei der Pathogen-Wirt-Interaktion.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Signalweg zur Osmoregulation, der „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg, erstmals anhand physiologischer Experimente in entsprechenden Mutantenstämmen in *M. oryzae* untersucht. Dabei konnten klare Unterschiede zum HOG-Signalweg von *S. cerevisiae* aufgezeigt werden.

Das in *M. oryzae* bisher noch nicht beschriebene Gen *MoYPD1*, welches das Phosphotransferprotein MoYpd1p kodiert, wurde erfolgreich inaktiviert. Diese Inaktivierung ist in *S. cerevisiae* und vielen anderen Pilzen letal und resultierte bei *M. oryzae* in einer apathogenen Albinomutante, deren Konidiogenese gestört ist. Insbesondere die Funktion des Phosphotransferproteins MoYpd1p, sowohl im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs als auch im Wirkmechanismus des Fungizids Fludioxonil, konnte eindeutig mittels Y2H- und Western Blot-Analysen nachgewiesen werden.

Es wurden entscheidende Fortschritte für das Verständnis des Aufbaus und der Funktion des HOG-Signalwegs sowohl als physiologisches Regulationssystem für Umweltreize als auch als Fungizidtarget im Pflanzenschutz erzielt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase (HIK) MoSln1p als Signalsensor für Salzstress und MoHik1p als Signalsensor für Zuckerstress fungiert. Die Beteiligung der Histidinkinasen MoHik5p und MoHik9p als Sensorproteine für Hypoxie im HOG-Signalweg ist durchaus denkbar und wurde durch erste Ergebnisse bekräftigt.

So konnte der HOG-Signalweg in mehreren Modellen dargestellt werden. Die Modelle der Signalerkennung und –transduktion von osmotischem Stress, von Hypoxie und der Wirkmechanismus von Fludioxonil wurden erstmals in diesem Umfang für *M. oryzae* ausgearbeitet.

Der zweite Teil dieser Arbeit repräsentiert die erste umfassende Untersuchung aller zehn HIK-codierender Gensequenzen, die im Genom von *M. oryzae* identifiziert werden konnten. Diese Signalproteine waren bisher noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Studien. Die Untersuchung beginnt mit einer phylogenetischen Einordnung aller untersuchten Proteinsequenzen in die verschiedenen Gruppen von Histidinkinasen in Pilzen. Eine

ausführliche phänotypische Charakterisierung aller HIK-codierender Gene folgt und wurde anhand von Mutanten durchgeführt, in denen diese Gene einzeln inaktiviert wurden.

Die Beteiligung von MoHik5p und MoHik9p als mögliche Sauerstoffsensoren im HOG-Signalweg konnte dokumentiert werden und die anschließenden Western Blot-Analysen bestätigten erstmals die Aktivierung des HOG-Signalwegs bei hypoxieähnlichen Zuständen.

Des Weiteren wurden mit MoHik5p und MoHik8p zwei neue Pathogenitätsfaktoren in *M. oryzae* identifiziert. Die apathogenen Mutantenstämme  $\Delta Mohik5$  und  $\Delta Mohik8$  sind in der Konidiogenese gestört und nicht in der Lage Appressorien zu differenzieren. Der Einsatz dieser Proteine als Fungizidtarget im protektiven Pflanzenschutz in der Zukunft ist somit denkbar.

## ANHANG I – SEQUENZINFORMATIONEN UND OLIGONUKLEOTIDE

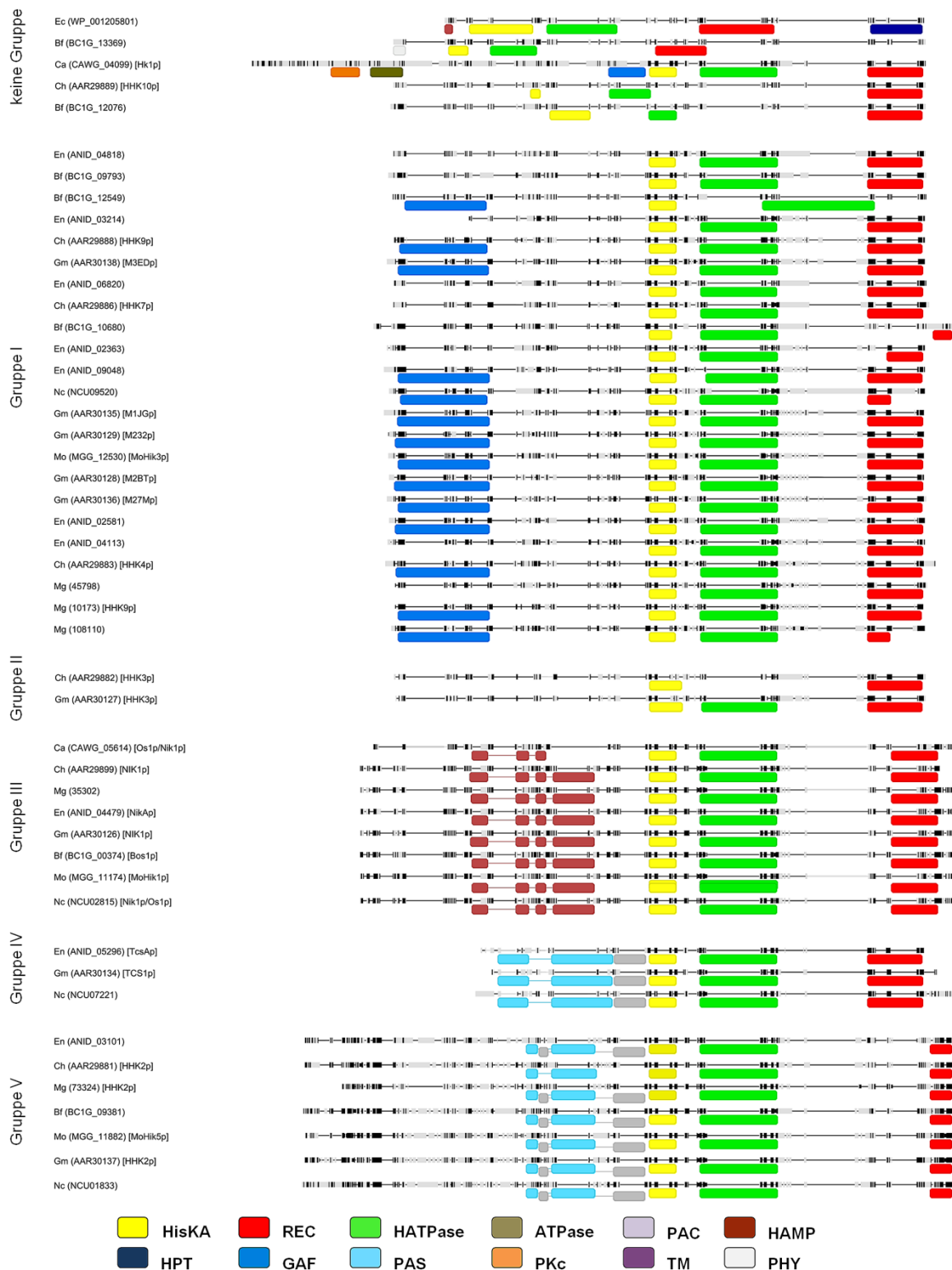
**Tab. 2: Zugangsnummern und Trivialnamen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen zur phylogenetischen Analyse.** Es sind die Bezeichnungen der untersuchten Organismen (Teleomorph) mit den zugehörigen Zugangsnummern zu den Sequenzen aus der jeweils verwendeten Datenbank aufgelistet. Die Trivialnamen der Proteine wurden, falls bekannt, in Klammern angegeben.

<i>B.fuckeliana</i>	<i>C.albicans</i>	<i>C.heterostrophus</i>	<i>E.nidulans</i>	<i>G.moniliformis</i>	<i>M.oryzae</i>	<i>M.graminicola</i>	<i>N.crassa</i>	<i>S.cerevisiae</i>
BC1G_11971	CAWG_05614 (Os1p/Nik1p)	AAR29880 (HHK1p)	ANID_04479 (NikAp)	AAR30119 (HHK13p)	MGG_07312 (MoSln1p)	73324 (HHK2p)	NCU02815 (Nik1p/Os1p)	YIL147C (Sln1p)
BC1G_13015	CAWG_04099 (Hk1p)	AAR29881 (HHK2p)	ANID_05296 (TcsAp)	AAR30120 (M1NBp)	MGG_11174 (MoHik1p)	72887 (HHK1p)	NCU01823	
BC1G_12076	CAWG_01453 (Sln1p)	AAR29882 (HHK3p)	ANID_01800 (TcsBp/Sln1p)	AAR30121 (HHK16p)	MGG_01342 (MoHik2p)	35302	NCU01833	
BC1G_01106		AAR29883 (HHK4p)	ANID_02581	AAR30122 (HHK1p)	MGG_12530 (MoHik3p)	41717	NCU00939	
BC1G_13369		AAR29884 (HHK5p)	ANID_02363	AAR30123 (HHK6p)	MGG_13891 (MoHik4p)	52186	NCU02057	
BC1G_08283		AAR29885 (HHK6p)	ANID_03101	AAR30124 (PHY1p)	MGG_11882 (MoHik5p)	63909 (Sln1p)	NCU03164	
BC1G_00374 (Bos1p)		AAR29886 (HHK7p)	ANID_03102	AAR30125 (HHK5p)	MGG_06696 (MoHik6p)	71504 (HHK6p)	NCU04615 (Sln1p)	
BC1G_09381		AAR29887 (HHK8p)	ANID_03214	AAR30126 (NIK1p)	MGG_12377 (MoHik7p)	52186	NCU04834 (Phy1p)	
BC1G_11490		AAR29888 (HHK9p)	ANID_04113	AAR30127 (HHK3p)	MGG_01227 (MoHik8p)	45798	NCU05790 (Phy2p)	
BC1G_12549		AAR29889 (HHK10p)	ANID_04447	AAR30128 (M2BTp)	MGG_02665 (MoHik9p)	10501 (HHK14p)	NCU07221	
BC1G_08461 (Sln1p)		AAR29890 (HHK11p)	ANID_04818	AAR30129 (M232p)		42381 (M3YPp)	NCU09520	
BC1G_15817		AAR29891 (HHK12p)	ANID_06820	AAR30134 (TCS1p)		63861 (M3YPp)		
BC1G_12791		AAR29892 (HHK13p)	ANID_07945	AAR30135 (M1JGp)		78016		
BC1G_10680		AAR29893 (HHK14p)	ANID_09048	AAR30136 (M27Mp)		73800 (HHK17p)		
BC1G_07772		AAR29894 (HHK15p)	ANID_09008 (FphAp)	AAR30137 (HHK2p)		76299		
BC1G_09793		AAR29895 (HHK16p)		AAR30138 (M3EDp)		110667		
BC1G_16367		AAR29896 (HHK17p)				107160		
		AAR29897 (HHK18p)				10173 (HHK9p)		
		AAR29898 (HHK19p)				108110		
		AAR29899 (NIK1p)						
		AAR29900 (PHY1p)						

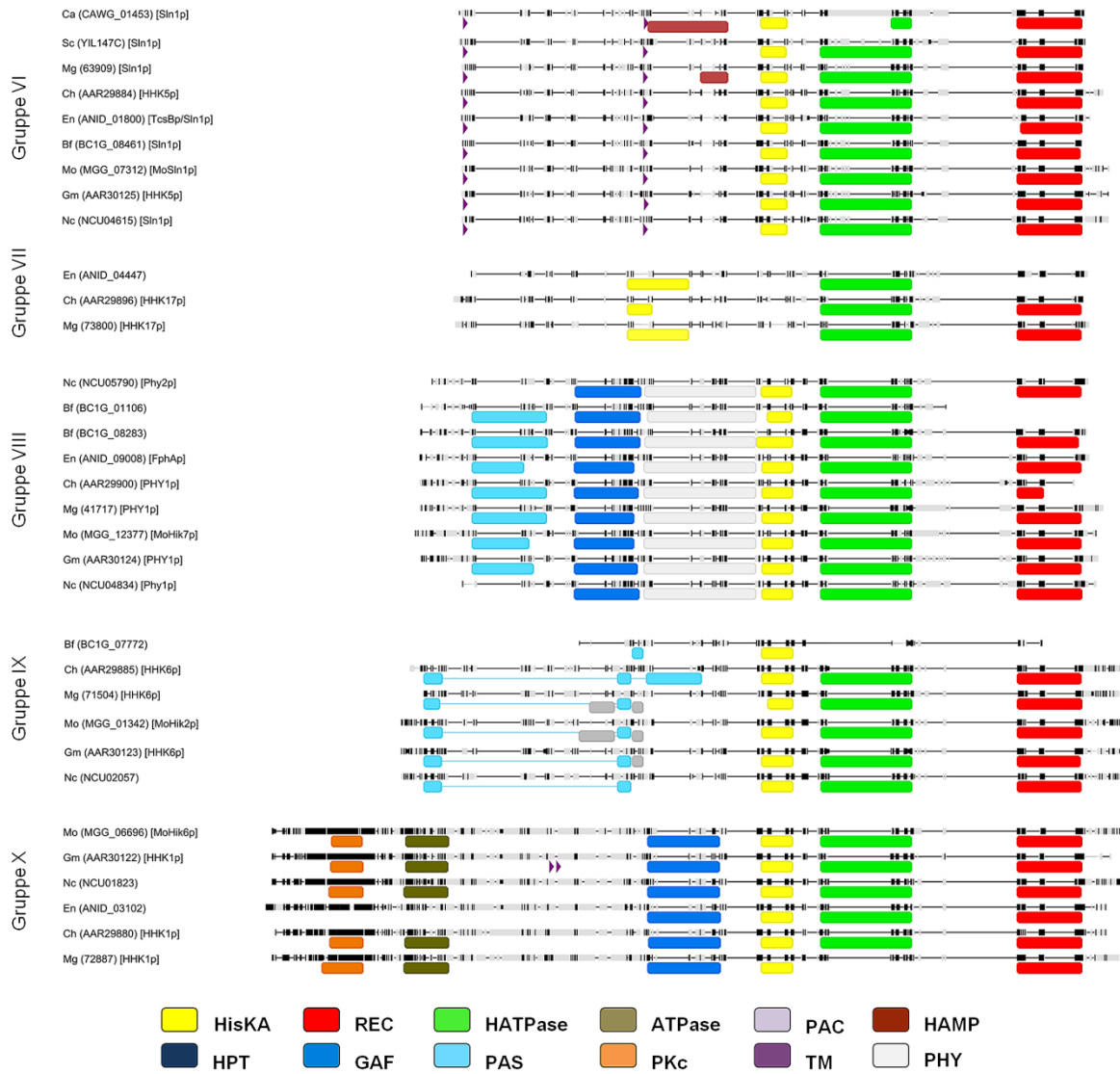
Zusätzlich wurde die Proteinsequenz einer Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase von *E.coli* (WP\_00120580) verwendet.

### Datenbanken:

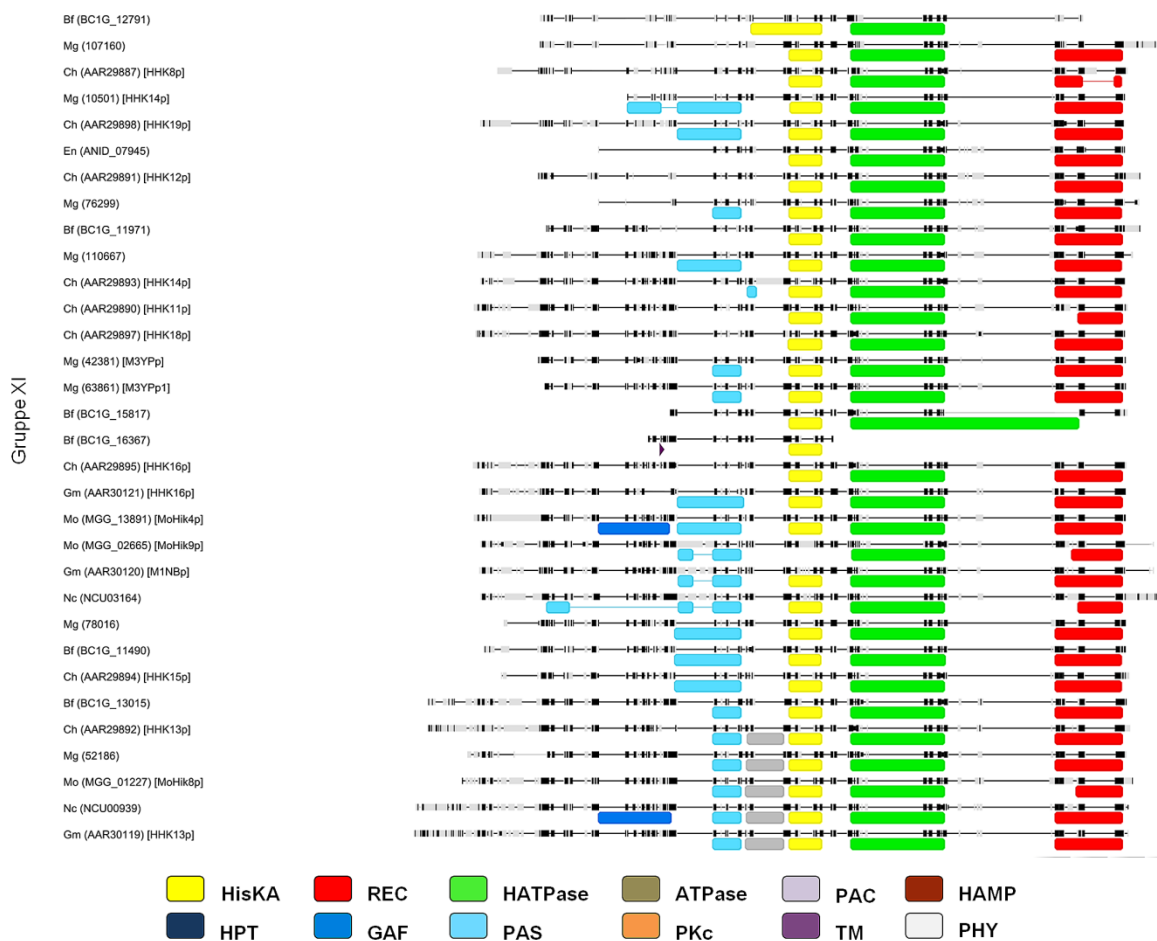
- *B. fuckeliana*: Broad Institut (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>)
- *C. albicans*: Broad Institut (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>)
- *C. heterostrophus*: NCBI Protein-ID (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- *E. coli*: NCBI Protein-ID (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- *E. nidulans*: Broad Institut (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>)
- *G. moniliformis*: NCBI Protein-ID (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- *M. graminicola*: JGI protein ID (<http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Mycgr3>)
- *M. oryzae*: Broad Institut (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>)
- *N. crassa*: Broad Institut (<http://www.broadinstitute.org/scientific-community/data>)
- *S. cerevisiae*: SGD (<http://www.yeastgenome.org/>)



**Abb. 33: Domänenvisualisierung der zur phylogenetischen Analyse verwendeten Sequenzen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen.** Es sind jeweils die Zugangsnummern zur Proteinsequenz der entsprechend verwendeten Datenbank und wenn möglich der Trivialname des korrespondierenden Proteins angegeben. Bf (*Botryotinia fuckeliana*), Ca (*Candida albicans*), Ch (*Cochliobolus heterostrophus*), Ec (*Escherichia coli*), En (*Emericella nidulans*), Gm (*Gibberella moniliformis*), Mg (*Mycosphaerella graminicola*), Mo (*Magnaporthe oryzae*), Nc (*Neurospora crassa*), Sc (*Saccharomyces cerevisiae*). HisKA = Histidinkinase-Domäne, REC = regulatorische Domäne, HATPase = Histidin-ATPase-Domäne, ATPase = ATPase-Domäne, PKc = Proteinkinase-Domäne, GAF = GAF-Domäne, HAMP = HAMP-Domäne, HPT = Histidin Phosphotransferdomäne, PAS = PAS-Domäne, PAC = PAC-Domäne, PHY = Phytochrom-Domäne, TM = Transmembrandomäne.



Fortsetzung Abb. 33: Domänenvisualisierung der zur phylogenetischen Analyse verwendeten Sequenzen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen.



Fortsetzung Abb. 33: Domänenvisualisierung der zur phylogenetischen Analyse verwendeten Sequenzen der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen.



**Tab. 3: Primer zur Untersuchung des HOG-Signalwegs in *Magnaporthe oryzae*.** Die Sequenzen sind vom 5'-Ende zum 3'-Ende angegeben.

Name	Sequenz (5'→ 3')
<i>SLN1</i> -PCR-for	GGCCGCTGCGCTACTGTGAG
<i>SLN1</i> -PCR-rev	GCCGAGCCTATGATGAGATGAAGAG
<i>SLN1</i> -DIG-for	GTTATCCGGCCCGACTACAG
<i>SLN1</i> -DIG-rev	GCTTGCCGCCCTGGTGATAA
<i>SLN1</i> -Y2H-for	CCATGGCAATTCCTGGAAAGGTTTCAGGATCG
<i>SLN1</i> -Y2H-rev	GAATTCTCACGTCGCCACAGCAG
<i>SLN1</i> -Y2H-for2	GAATTCATGATTCCTGGAAAGGTTTCAGGATCG
<i>SLN1</i> -Y2H-rev2	ATCGATTCACGTCGCCACAGCAG
<i>HIK1</i> -PCR-for	CGGGCTGTGTGCGATTGAGTC
<i>HIK1</i> -PCR-rev	AAGATTGAGGCTAAGCGGATGGTT
<i>HIK1</i> -DIG-for	GGTTGACGAGCCTCTTGAAATAG
<i>HIK1</i> -DIG-rev	GGATGGCCAGAAGGTCGTGTT
<i>HIK1</i> -Y2H-for	CATATGTTCAAGAGGACCATGAACG
<i>HIK1</i> -Y2H-rev	CCCGGTTATAGGCATCCTGGTTCAGAG
<i>YPD1</i> -5'PCR-for	GCCCCAACCGTCAAGTCAGAT
<i>YPD1</i> -5'PCR-rev	GGGAAGGGTACAAGGCAGATAGG
<i>YPD1</i> -3'PCR-for	GAGGAGCCAAGCGAGGATGTG
<i>YPD1</i> -3'PCR-rev	GCGAGCCGTGCGTGGTGTC
<i>YPD1</i> -komp-PCR-for	CCCGGCTCATTGCTTCCTTCC
<i>YPD1</i> -Y2H-for	CATATGCCCGATTTTGGAGC
<i>YPD1</i> -Y2H-rev	CTGCAGTAAGGATCGATCACG
<i>SSK1</i> -PCR-for	CCAGGCTCGCTCGGACTAAATAAG
<i>SSK1</i> -PCR-rev	GATCCAAAAGAAGCGGCGGTATCAG
<i>SSK1</i> -DIG-for	CCCCAAGACGTGTGCGATACC
<i>SSK1</i> -DIG-rev	CGAATAAGCCGTTGCAAGGGGAAGC
<i>SSK1</i> -Y2H-for	CATATGACCAGGCGGCG
<i>SSK1</i> -Y2H-rev	GAATTCACGCAGCGACAGTT
<i>SSK2</i> -PCR-for	CGCAATCCACTCGGGGTCAC
<i>SSK2</i> -PCR-rev	CGGTGCGCCAAAGTCATTCTTAG
<i>SSK2</i> -DIG-for	GGCGAAGACGAAAGGCTGATGC
<i>SSK2</i> -DIG-rev	CCTCGGGGGTTGGTATGTGTTGG
<i>PBS2</i> -PCR-for	CCCCGGCGCAGATTTGTCAATC
<i>PBS2</i> -PCR-rev	GTTGGGCGCCCGTCACTTG
<i>PBS2</i> -DIG-for	CCCGCCACGAACCGACAGT
<i>PBS2</i> -DIG-rev	GCATGCCGAGACAGGACCAGTG
<i>HOG1</i> -PCR-for	CTCGCCCCAATTCTCATCGTCTTAACGA
<i>HOG1</i> -PCR-rev	CAGTAGAGTAAGCCAGCCGCCTAGCTCTAGC
<i>HOG1</i> -DIG-for	CACGATACCACGATTACACC
<i>HOG1</i> -DIG-rev	GACCTCATACTCTGCATCTC
<i>EF1<math>\alpha</math></i> -RT-for	CAGGCGATGTGGGCAGTGTG
<i>EF1<math>\alpha</math></i> -RT-rev	GTATCCTCAAGCCCGGTATGGTC
<i>ALB1</i> -RT-for	CGCGCCGACTCTACCAACGTTG
<i>ALB1</i> -RT-rev	CAAGCCCGCCAAGGAAGTCAAC
<i>BUF1</i> -RT-for	CGTCGCCGCCATCAAGAAGAACG
<i>BUF1</i> -RT-rev	CGCGGGCGACAAAGAACTGGC
<i>YPD1</i> -RT-for	GACGTTCGAACAGATCCT
<i>YPD1</i> -RT156-for	ATGTACTCTGTAAGGACTCTG
<i>YPD1</i> -RT-rev	CTCGAAAGCTCTTTCAAGTC

**Tab. 4: Primer zur Untersuchung von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae*.**  
Die Sequenzen sind vom 5'-Ende zum 3'-Ende angegeben.

Name	Sequenz (5'→ 3')
<i>HIK2</i> -PCR-for	GGCCGCCATGATTCTACAACGAC
<i>HIK2</i> -PCR-rev	GCGCCTCCAAGCTGTATGATG
<i>HIK2</i> -DIG-for	CCCAGCGCAAAGCCCCCTCTA
<i>HIK2</i> -DIG-rev	CCGTGGTCTTTTGGCCTTTTGTG
<i>HIK3</i> -PCR-for	GCCGCTTGCTTGCTTGCTTTAC
<i>HIK3</i> -PCR-rev	GGTAAAATCGCAAACCTCTG
<i>HIK3</i> -DIG-for	GGTTGTGTCGTCGACCAGTAG
<i>HIK3</i> -DIG-rev	CGACCTCCTGCCAAAGAAAATAAGCC
<i>HIK4</i> -PCR-for	GCCAGCAAACCTCCGCCAGATATG
<i>HIK4</i> -PCR-rev	CCGTATTTATCCTCCCTGCG
<i>HIK4</i> -DIG-for	GGATTTTGGCCCTTGTAGACAG
<i>HIK4</i> -DIG-rev	GTCTATTCCGTGAAAAACAAC
<i>HIK5</i> -PCR-for	GATTACAGCTGCTCAGAATTC
<i>HIK5</i> -PCR-rev	GAGTCGCTAAGACCATCATCG
<i>HIK5</i> -DIG-for	GTTGACATGTGCGGCATTTT
<i>HIK5</i> -DIG-rev	GCCGAGCCTATGATGAGATGAAGAG
<i>HIK6</i> -PCR-for	CAAGAACTTAGGCACATGCAAG
<i>HIK6</i> -PCR-rev	GAATCGGATTTGATCAGCAAAC
<i>HIK6</i> -DIG-for	CATCTGGGATGAGGACAGTC
<i>HIK6</i> -DIG-rev	CGACAGGCTCTTCGATTAG
<i>HIK7</i> -PCR-for	CCTTTCATCTCGACAAAATC
<i>HIK7</i> -PCR-rev	CATCGACACATTCTTGTGTAG
<i>HIK7</i> -DIG-for	GTTTACACAAACCAGTCAACCG
<i>HIK7</i> -DIG-rev	GTTGTTAACCAAGGACCGC
<i>HIK8</i> -PCR-for	CAGCTTTTCACTCCGTTTAC
<i>HIK8</i> -PCR-rev	CCCGTACACTTTTTTAATAGC
<i>HIK8</i> -DIG-for	GGAAGCAGTCAGCTACACTCC
<i>HIK8</i> -DIG-rev	CCTTCAAAGGGCCAACCTTG
<i>HIK8</i> -komp-for	CTATGCCATCGCGATCGTC
<i>HIK9</i> -PCR-for	GTACGTTACCCACAGTAATTCTGAG
<i>HIK9</i> -PCR-rev	GTTACCTGTAGCAAACCCG
<i>HIK9</i> -DIG-for	CCCAGTCAGTCAGTTTGTTC
<i>HIK9</i> -DIG-rev	GATTCAATCCCCCAAATTC

## ANHANG II – KLONIERUNGSSTRATEGIEN

### Konstruktion der *pCAMBIA*-(Gen)-Inaktivierungsvektoren

Für die Generierung von  $\Delta MosIn1$  wurde ein 4651 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *SLN1*-PCR-for/*SLN1*-PCR-rev von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+SLN1* mit *HindIII/SmaI*, wurde ein 2857 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *HindIII/SmaI* restringierte *BAR*-Sequenz aus *pCAMB+BAR* (*SaI*) ersetzt. Das mit *NotI/Spel* restringierte Fragment von *pGEMT+SLN1+BAR* wurde in den mit *PspOMI/Spel* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+SLN1+BAR* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mohik1$  wurde ein 3320 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK1*-PCR-for/*HIK1*-PCR-rev von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Der Vektor *pGEMT+HIK1* wurde mit *SmaI* restringiert und eine mit *HpaI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HpaI*) wurde inseriert. Das mit *NotI* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK1+HPT* wurde in den mit *PspOMI* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK1+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mohik2$  wurde ein 3133 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK2*-PCR-for/*HIK2*-PCR-rev von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Der Vektor *pGEMT+HIK2* wurde mit *HpaI* restringiert und eine mit *HpaI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HpaI*) wurde inseriert. Das mit *NotI* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK2+HPT* wurde in den mit *PspOMI* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK2+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mohik3$  wurde ein 3849 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK3*-PCR-for/*HIK3*-PCR-rev von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK3* mit *AvrII/BglII*, wurde ein 3631 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *AvrII/BglII* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HindIII*) ersetzt. Das mit *NotI/Spel* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK3+HPT* wurde in den mit *PspOMI/Spel* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert um den Vektor *pCAMB+HIK3+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mohik4$  wurde ein 4196 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK4*-PCR-for/*HIK4*-PCR-rev von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK4* mit *XbaI/XhoI*, wurde ein 3485 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *XbaI/XhoI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCB1636* ersetzt. Das mit *NotI/AvrII* restringierte Fragment von

*pGEMT+HIK4+HPT* wurde in den mit *PspOMI/AvrII* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK4+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik5* wurde ein 7222 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK5-PCR-for/HIK5-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK5* mit *SgrAI/BglII*, wurde ein 4000 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *XmaI/BglII* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HindIII*) ersetzt. Das mit *NotI/Spel* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK5+HPT* wurde in den mit *PspOMI/Spel* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK5+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik5/HIK5* wurde ein 7220 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK5-PCR-for/HIK5-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pJET+HIK5(komp)* mit *NotI/SwaI*, wurde ein 7554 bp großes Fragment der Promoterregion und der codierenden Sequenz in den mit *PspOMI/SmaI* restringierten Vektor *pCAMB+BAR* (*SaI*) ligiert um den Vektor *pCAMB+HIK5(komp)+BAR* zu erhalten. Der Vektor *pCAMB+HIK5(komp)+BAR* wurde genutzt, um die Mutante  $\Delta$ *Mohik5* zu transformieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik6* wurde ein 9486 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK6-PCR-for/HIK6-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK6* mit *NheI/PmlI*, wurde ein 6491 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *NheI/SmaI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HindIII*) ersetzt. Das mit *NotI/AfeI* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK6+HPT* wurde in den mit *PspOMI/Spel* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK6+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik7* wurde ein 6325 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK7-PCR-for/HIK7-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK7* mit *BglII/BamHI*, wurde ein 3523 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *BglII/BamHI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HindIII*) ersetzt. Das mit *NotI/XbaI* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK7+HPT* wurde in den mit *PspOMI/AvrII* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK7+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik8* wurde ein 5984 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK8-PCR-for/HIK8-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK8* mit *BglII/HpaI*, wurde ein 3630 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *BamHI/PmlI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HindIII*) ersetzt. Das mit *EcoRV/XbaI* restringierte Frag-

ment von *pGEMT+HIK8+HPT* wurde in den mit *SmaI/SpeI* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK8+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik8/HiK8* wurde ein 6824 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK8-komp-for/HiK8-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pJET+HIK8(komp)* mit *PvuII/SpeI*, wurde ein 6498 bp großes Fragment der Promoterregion und der codierenden Sequenz in den mit *PvuII/SpeI* restringierten Vektor *pCAMB+BAR* (*SaII*) ligiert um den Vektor *pCAMB+HIK8(komp)+BAR* zu erhalten. Der Vektor *pCAMB+HIK8(komp)+BAR* wurde genutzt, um die Mutante  $\Delta$ *Mohik8* zu transformieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohik9* wurde ein 5919 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HIK9-PCR-for/HiK9-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HIK9* mit *BglII/XbaI*, wurde ein 4115 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *BglII/AvrII* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*HindIII*) ersetzt. Das mit *NotI/SpeI* restringierte Fragment von *pGEMT+HIK9+HPT* wurde in den mit *PspOMI/SpeI* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HIK9+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Mohog1* wurde ein 3047 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *HOG1-PCR-for/HOG1-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+HOG1* mit *BglII/AvrII*, wurde ein 1516 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *BamHI/SpeI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT* (*SaII*) ersetzt. Das mit *NotI/SpeI* restringierte Fragment von *pGEMT+HOG1+HPT* wurde in den mit *PspOMI/SpeI* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+HOG1+HPT* zu generieren.

Für die Generierung der Doppelmutante  $\Delta$ *Mohik1/\Delta**sln1* wurde der Vektor *pCAMB+SLN1+BAR* genutzt, um die Mutante  $\Delta$ *Mohik1* zu transformieren.

Für die Generierung der Doppelmutante  $\Delta$ *Mohik1/\Delta**ypd1* wurde der Vektor *pCAMB+YPD1+HPT* mit *SmaI/HindIII* restringiert. Dessen *HPT*-Sequenz wurde durch eine *HindIII/SmaI* restringierte *BAR*-Sequenz aus *pCAMB+BAR* (*SaII*) ersetzt. Der Vektor *pCAMB+YPD1+BAR* wurde genutzt, um die Mutante  $\Delta$ *Mohik1* zu transformieren.

Für die Generierung von  $\Delta$ *Moypd1* wurden zwei PCR-Produkte mit den Primerpaaren *YPD1-5'-PCR-for/YPD1-5'-PCR-rev* (1039 bp) und *YPD1-3'-PCR-for/YPD1-3'-PCR-rev* (467 bp) von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Die Amplifikate wurden in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Der Vektor *pJET+3'-YPD1* wurde mit *BglII/XbaI* restringiert und das *3'-YPD1*-Fragment in den mit *BglII/SpeI* restringierten Vektor *pCAMB+HPT* (*SaII*) ligiert. Der Vektor *pJET+5'-YPD1* wurde mit

*BglII/XbaI* restringiert und in den mit *AvrII/BamHI* restringierten Vektor *pCAMB+3'-YPD1+HPT* ligiert, um den Vektor *pCAMB+YPD1+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Moypd1/YPD1$  wurde ein 2399 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *YPD1-komp-PCR-for/YPD1-3'-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+YPD1(komp)* mit *NcoI/PstI*, wurde ein 2450 bp großes Fragment der Promoterregion und der codierenden Sequenz in den mit *NcoI/PstI* restringierten Vektor *pCAMB+BAR (SalI)* ligiert um den Vektor *pCAMB+YPD1(komp)+BAR* zu erhalten. Der Vektor *pCAMB+YPD1(komp)+BAR* wurde genutzt, um die Mutante  $\Delta Moypd1$  zu transformieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mossk1$  wurde ein 3886 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *SSK1-PCR-for/SSK1-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+SSK1* mit *BglII/BamHI*, wurde ein 561 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *BglII/BamHI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCAMB+HPT (HindIII)* ersetzt. Das mit *NotI* restringierte Fragment von *pGEMT+SSK1+HPT* wurde in den mit *PspOMI* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+SSK1+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mossk2$  wurde ein 5787 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *SSK2-PCR-for/SSK2-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+SSK2* mit *Clal/XhoI*, wurde ein 3181 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *Clal/XhoI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCB1636* ersetzt. Das mit *NotI/Spel* restringierte Fragment von *pGEMT+SSK2+HPT* wurde in den mit *PspOMI/Spel* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+SSK2+HPT* zu generieren.

Für die Generierung von  $\Delta Mopbs2$  wurde ein 3739 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *PBS2-PCR-for/PBS2-PCR-rev* von genomischer DNA aus *M. oryzae* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pGEMTeasy* ligiert. Nach dem Restringieren des Vektors *pGEMT+PBS2* mit *Clal/XhoI*, wurde ein 1151 bp großes Fragment der codierenden Sequenz durch eine mit *Clal/XhoI* restringierte *HPT*-Sequenz aus *pCB1636* ersetzt. Das mit *Apal/Spel* restringierte Fragment von *pGEMT+PBS2+HPT* wurde in den mit *Apal/Spel* restringierten *pCAMBIA0380* ligiert, um den Vektor *pCAMB+PBS2+HPT* zu generieren.

### Konstruktion der Yeast Two Hybrid-Vektoren

Für die Konstruktion der Y2H-Vektoren *pGBKT7+SSK1* und *pGADT7+SSK1* wurden die entsprechenden Bereiche mit den konservierten Proteindomänen von MoSsk1p von cDNA aus *M. oryzae* mit dem Primerpaar *SSK1-Y2H-for/SSK1-Y2H-rev* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Der Vektor *pJET+SSK1+NdeI/EcoRI* wurde mit *NdeI/EcoRI* restringiert und das

Fragment der codierenden Sequenz wurde in die mit *NdeI/EcoRI* restringierten *pGBKT7* und *pGADT7* ligiert.

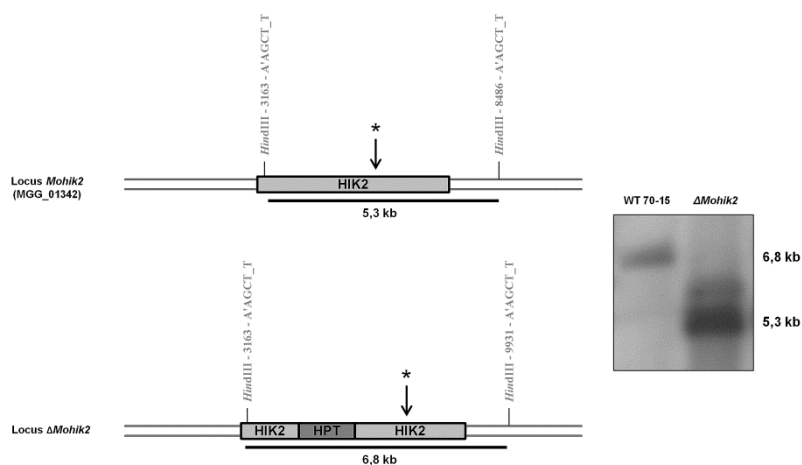
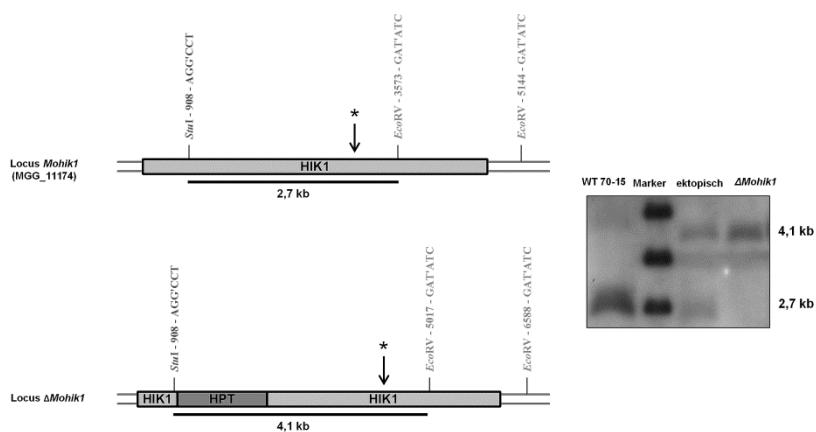
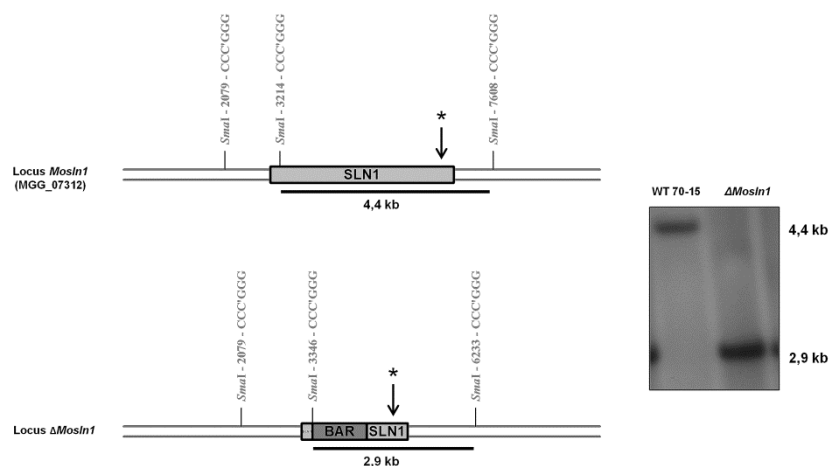
Für die Konstruktion der Y2H-Vektoren *pGBKT7+YPD1* und *pGADT7+YPD1* wurden die entsprechenden Bereiche mit den konservierten Proteindomänen von MoYpd1p von cDNA aus *M. oryzae* mit dem Primerpaar *YPD1-Y2H-for/YPD1-Y2H-rev* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Der Vektor *pJET+YPD1+NdeI/EcoRI* wurde mit *NdeI/EcoRI* restringiert und das Fragment der codierenden Sequenz wurde in die mit *NdeI/EcoRI* restringierten *pGBKT7* und *pGADT7* ligiert.

Für die Konstruktion des Y2H-Vektors *pGBKT7+SLN1* wurde der entsprechende Bereich mit den konservierten Proteindomänen von MoSl1p von gDNA aus *M. oryzae* mit dem Primerpaar *SLN1-Y2H-for/SLN1-Y2H-rev* amplifiziert. Der Sequenzabschnitt der putativen N-terminalen Transmembrandomäne wurde nicht amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Der Vektor *pJET+SLN1+NdeI/EcoRI* wurde mit *NdeI/EcoRI* restringiert und das Fragment der codierenden Sequenz wurde in den mit *NdeI/EcoRI* restringierten *pGBKT7* ligiert.

Für die Konstruktion des Y2H-Vektors *pGADT7+SLN1* wurde der entsprechende Bereich (wiederum ohne die N-terminale Transmembrandomäne) mit den konservierten Proteindomänen von MoSl1p von gDNA aus *M. oryzae* mit dem Primerpaar *SLN1-Y2H-for2/SLN1-Y2H-rev2* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Der Vektor *pJET+SLN1+NdeI/EcoRI* wurde mit *NdeI/EcoRI* restringiert und das Fragment der codierenden Sequenz wurde in den mit *NdeI/EcoRI* restringierten *pGADT7* ligiert.

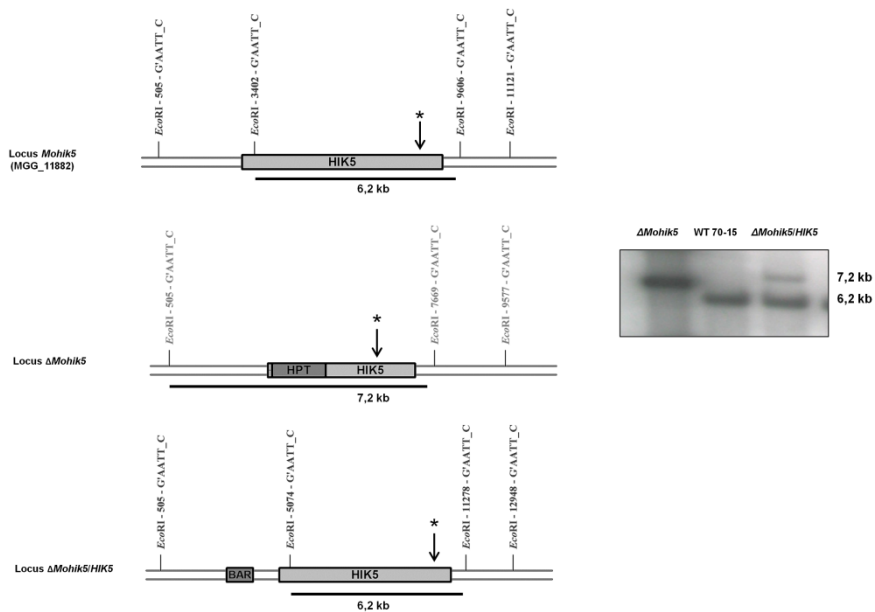
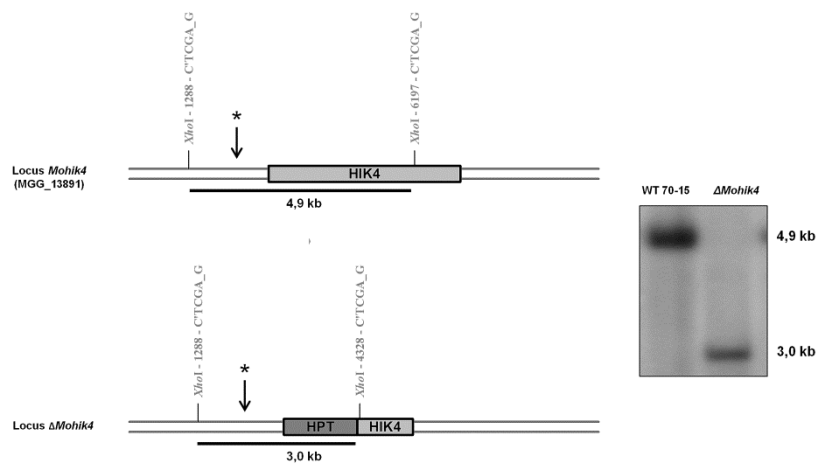
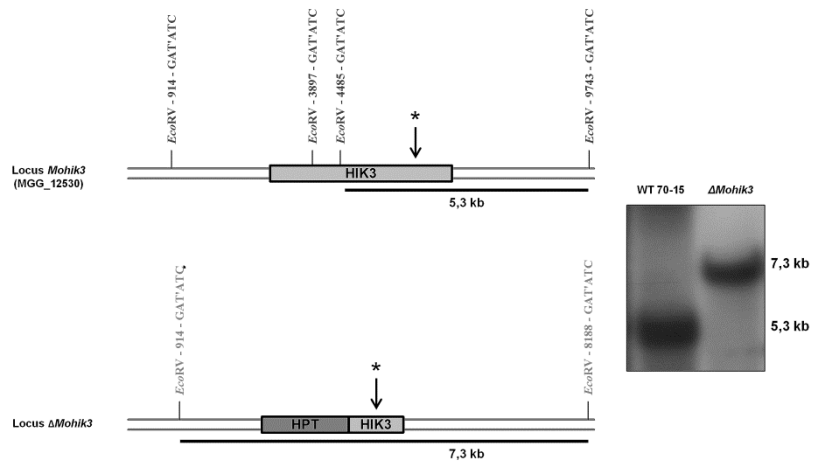
Für die Konstruktion des Y2H-Vektors *pGBKT7+HIK1* wurde der entsprechende Bereich mit den konservierten Proteindomänen von MoHik1p von gDNA aus *M. oryzae* mit dem Primerpaar *HIK1-Y2H-for/HIK1-Y2H-rev* amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor *pJET1.2/blunt* ligiert. Der Vektor *pJET+SLN1+NdeI/EcoRI* wurde mit *NdeI/SmaI* restringiert und das Fragment der codierenden Sequenz wurde in den mit *NdeI/SmaI* restringierten *pGBKT7* ligiert. Die Konstruktion des Y2H-Vektors *pGADT7+HIK1* war nicht möglich.

## ANHANG III – SOUTHERN BLOT-ANALYSEN

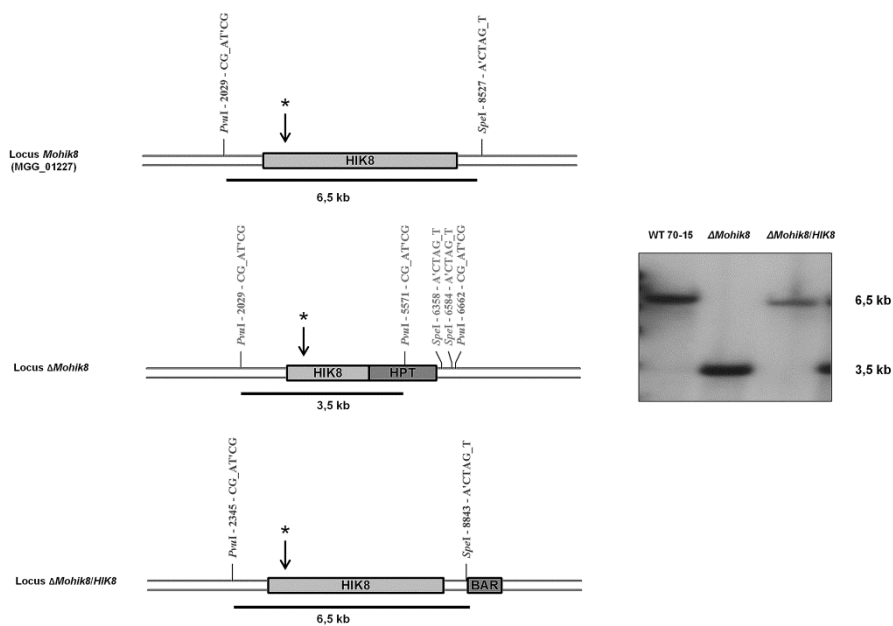
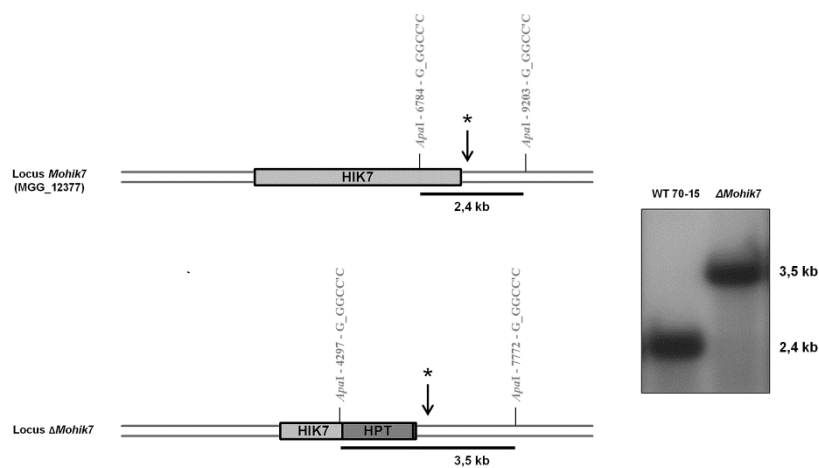
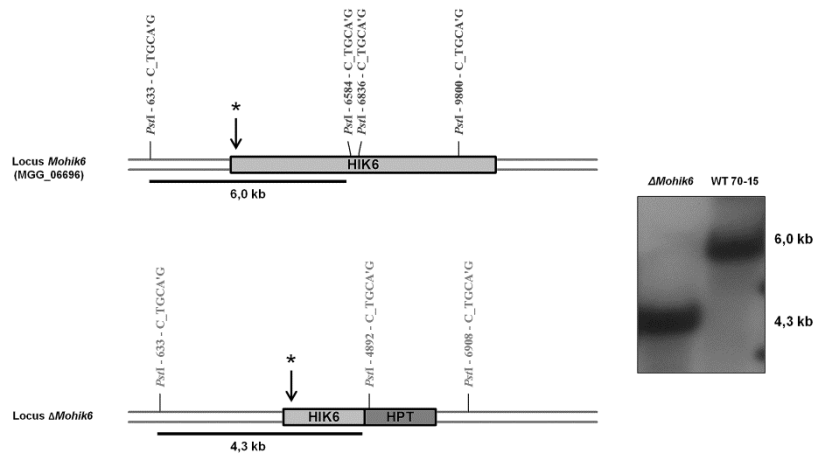


**Abb. 34:** Schematische Darstellung der manipulierten Bereiche der genomischen DNA des *Magnaporthe oryzae* WT und den erzeugten Mutantenstämmen. Die bearbeiteten Bereiche der genomischen DNA, die codierende Sequenz vom Start- bis zum Stopcodon, die Angabe der jeweilig verwendeten Restriktionsenzyme (Position und Sequenz) und der Hybridisierungsbereich der DNA-Sonde (\*) für die Southern Blot-Analyse sind dargestellt. Die Größenangaben neben den Abbildungen der Röntgenfilme geben die jeweilige Größe der Fragmente der Hybridisierungssignale an.

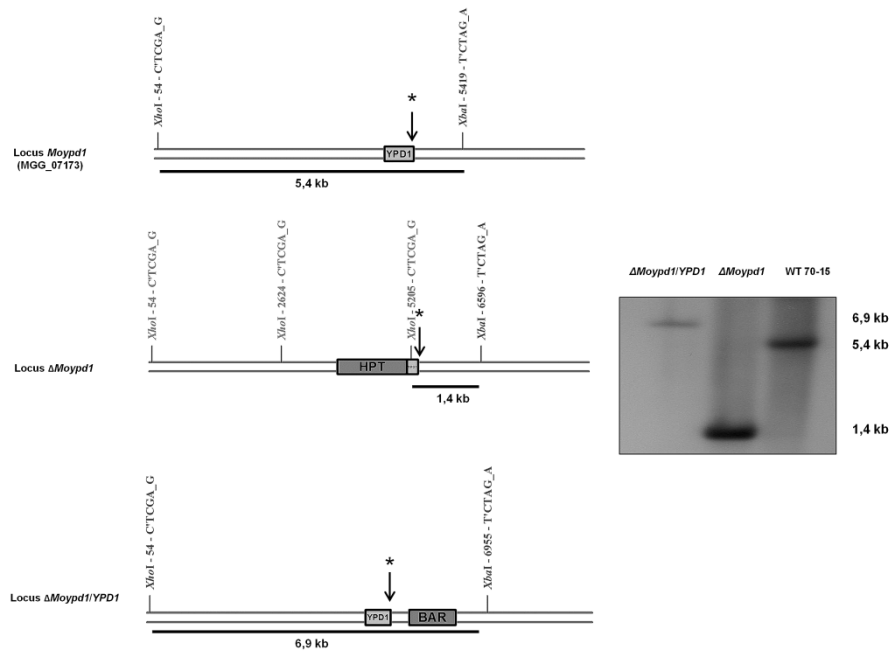
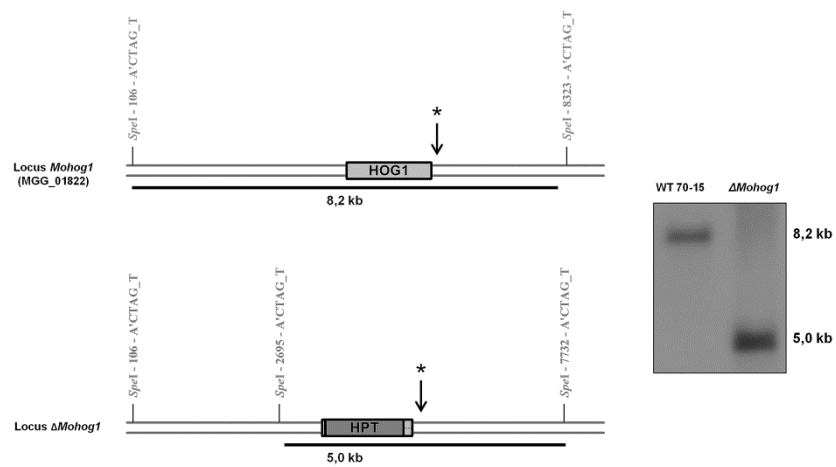
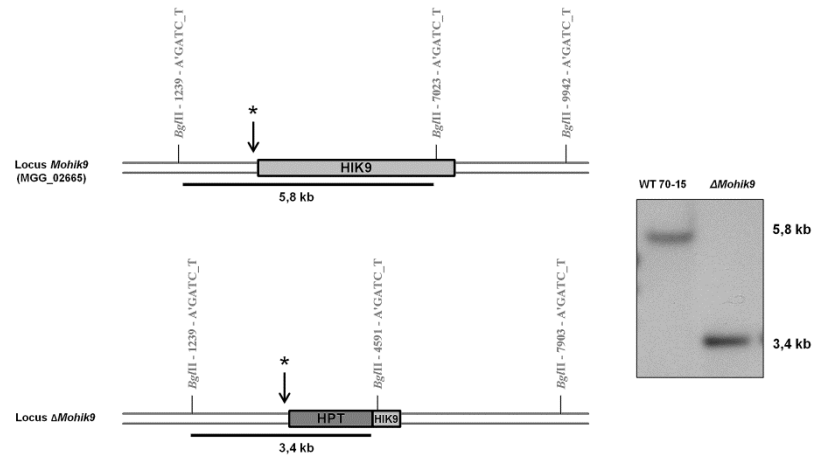




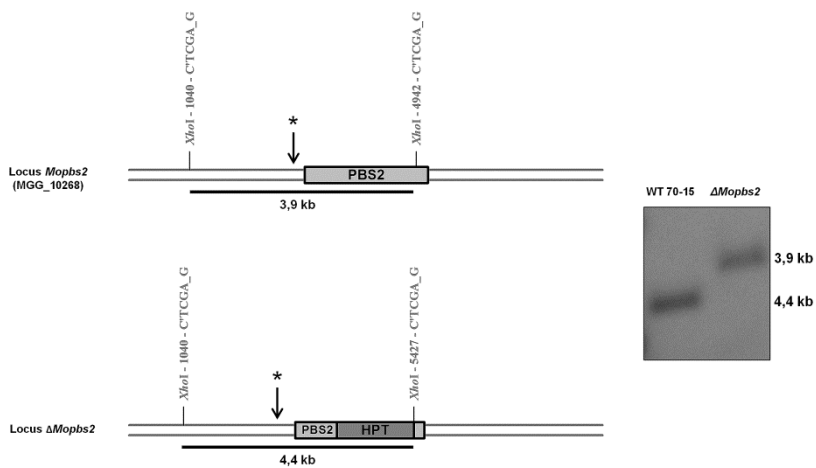
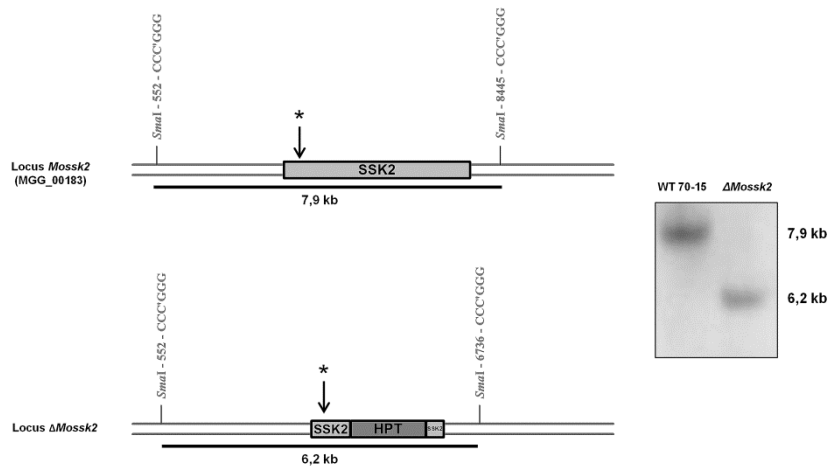
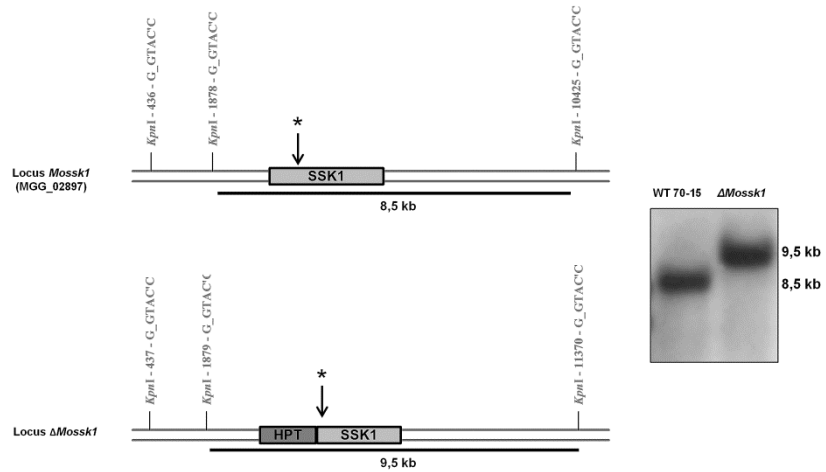
Fortsetzung Abb. 34: Schematische Darstellung der manipulierten Bereiche der genomischen DNA des *Magnaporthe oryzae* WT und den erzeugten Mutantenstämmen.



Fortsetzung Abb. 34: Schematische Darstellung der manipulierten Bereiche der genomischen DNA des *Magnaporthe oryzae* WT und den erzeugten Mutantenstämmen.



Fortsetzung Abb. 34: Schematische Darstellung der manipulierten Bereiche der genomischen DNA des *Magnaporthe oryzae* WT und den erzeugten Mutantenstämmen.



Fortsetzung Abb. 34: Schematische Darstellung der manipulierten Bereiche der genomischen DNA des *Magnaporthe oryzae* WT und den erzeugten Mutantenstämmen.

## ANHANG IV – WACHSTUMS- UND RESISTENZVERSUCHE

**Tab. 5: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen Festmedien.** Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde mit dem von Kulturen des WT's verglichen. Der Koloniedurchmesser nach 10 Tagen Inkubation bei 26°C wurde vermessen und die Standardabweichung bestimmt.

		MoWT	$\Delta$ Mosln1	$\Delta$ Mohik1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ sln1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ ypd1	$\Delta$ Moypd1	$\Delta$ Mossk1	$\Delta$ Mossk2	$\Delta$ Mopbs2	$\Delta$ Mohog1	$\Delta$ Moypd1/YPD1
Koloniedurchmesser [mm]	CM	79±3	65±2	72±2	76±2	76±2	72±1	76±2	78±3	77±2	78±1	47±2
	CM+0,8 M NaCl	47±2	29±0	38±2	11±1	24±1	23±1	15±1	19±2	14±1	21±1	38±2
	CM+0,8 M KCl	44±2	33±1	44±2	10±1	22±2	23±1	14±2	17±2	15±2	17±1	38±2
	CM+1 M Sorbit	53±2	44±2	16±1	14±2	15±2	12±2	13±1	14±1	11±1	13±2	37±1
	CM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	45±2	42±3	27±2	48±2	48±1	28±2	37±1	55±3	35±2	42±2	34±2
	CM+0,2 M NaNO <sub>2</sub>	46±2	11±1	25±2	11±2	12±2	25±2	10±1	28±2	0	0	30±2
	CM 32°C	65±2	45±2	51±2	55±2	58±2	55±2	42±1	57±3	54±2	43±3	52±3
	MM	72±2	61±2	70±2	71±2	69±2	67±2	75±2	75±2	73±2	74±2	45±2
	MM+0,5 M NaCl	31±2	0	30±1	0	31±1	30±1	28±1	29±2	26±2	29±1	35±3
	MM+0,5 M KCl	33±2	0	35±2	0	36±2	33±1	29±2	32±2	37±3	31±2	35±2
	MM+0,8M Sorbit	56±3	49±2	25±2	19±1	25±3	13±1	0	23±2	0	11±1	46±2
	MM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	40±2	30±2	22±2	0	31±2	0	20±1	40±2	32±2	29±1	29±1
	MM+0,1 M NaNO <sub>2</sub>	45±3	0	35±2	27±2	0	0	0	0	0	0	30±2
	MM 32°C	54±1	45±2	55±2	50±2	51±2	53±2	45±3	49±2	48±2	48±2	44±2

**Tab. 6: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten unter Stress auf verschiedenen Festmedien (normalisiert).** Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde mit dem von Kulturen des WT's verglichen. Die Normalisierung [%] wurde jeweils in Relation zu dem Wachstum nach 10 Tagen Inkubation bei 26°C auf reinem CM oder MM berechnet.

		MoWT	$\Delta$ Mosln1	$\Delta$ Mohik1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ sln1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ ypd1	$\Delta$ Moypd1	$\Delta$ Mossk1	$\Delta$ Mossk2	$\Delta$ Mopbs2	$\Delta$ Mohog1	$\Delta$ Moypd1/YPD1
Relativer Koloniedurchmesser [%]	CM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	CM+0,8 M NaCl	59	45	53	14	32	32	20	24	18	27	81
	CM+0,8 M KCl	56	51	61	13	29	32	18	22	19	22	81
	CM+1 M Sorbit	67	68	22	18	20	17	17	18	14	17	79
	CM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	57	65	38	63	63	39	49	71	45	54	72
	CM+0,2 M NaNO <sub>2</sub>	58	17	35	14	16	35	13	36	0	0	63
	CM 32°C	82	69	71	72	76	76	55	73	70	55	111
	MM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	MM+0,5 M NaCl	43	0	43	0	45	45	37	39	36	39	78
	MM+0,5 M KCl	46	0	50	0	52	49	39	43	51	42	78
	MM+0,8 M Sorbit	78	80	36	27	36	19	0	31	0	15	102
	MM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	56	49	31	0	45	0	27	53	44	39	64
	MM+0,1 M NaNO <sub>2</sub>	63	0	50	38	0	0	0	0	0	0	67
	MM 32°C	75	74	79	70	74	79	60	65	66	65	98

**Tab. 7: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten zur Fludioxonilresistenz.** Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde mit dem von Kulturen des WT's verglichen. Der Koloniedurchmesser nach 7 Tagen Inkubation bei 26°C wurde vermessen und die Standardabweichung bestimmt.

		MoWT	$\Delta$ MosIn1	$\Delta$ Mohik1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ sIn1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ ypd1	$\Delta$ Moypd1	$\Delta$ Mosk1	$\Delta$ Mosk2	$\Delta$ Mopbs2	$\Delta$ Mohog1	$\Delta$ Moypd1/YPD1
Koloniedurchmesser [mm]	CM	57±1	47±1	57±2	56±1	57±1	55±1	55±1	57±2	57±1	57±1	47±2
	CM+5 µg/ml Fludioxonil	32±1	23±2	50±1	46±2	49±3	47±1	46±1	49±2	48±1	48±2	35±1
	MM	49±2	41±1	48±1	51±2	52±2	45±1	47±2	46±1	48±1	48±2	39±2
	MM+5 µg/ml Fludioxonil	0	0	30±2	33±1	40±2	38±1	38±2	40±1	40±1	40±2	18±1

**Tab. 8: Wachstumsversuche mit den HOG-Signalweg-Mutanten zur Fludioxonilresistenz (normalisiert).** Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde mit dem von Kulturen des WT's verglichen. Die Normalisierung [%] wurde jeweils in Relation zu dem Wachstum nach 7 Tagen Inkubation bei 26°C auf reinem CM oder MM berechnet.

		MoWT	$\Delta$ MosIn1	$\Delta$ Mohik1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ sIn1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ ypd1	$\Delta$ Moypd1	$\Delta$ Mosk1	$\Delta$ Mosk2	$\Delta$ Mopbs2	$\Delta$ Mohog1	$\Delta$ Moypd1/YPD1
Koloniedurchmesser [%]	CM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	CM+5 µg/ml Fludioxonil	56	49	88	82	86	85	84	86	84	84	74
	MM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	MM+5 µg/ml Fludioxonil	0	0	63	65	77	84	81	87	83	83	46

**Tab. 9: Wachstumsversuche mit den HIK-Mutanten unter Stress auf verschiedenen Festmedien.** Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde mit dem von Kulturen des WT's verglichen. Der Koloniedurchmesser nach 10 Tagen Inkubation bei 26°C wurde vermessen und die Standardabweichung bestimmt.

		MoWT	$\Delta$ MosIn1	$\Delta$ Mohik1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ sIn1	$\Delta$ Mohik2	$\Delta$ Mohik3	$\Delta$ Mohik4	$\Delta$ Mohik5	$\Delta$ Mohik6	$\Delta$ Mohik7	$\Delta$ Mohik8	$\Delta$ Mohik9	$\Delta$ Mohik5/HiK5	$\Delta$ Mohik8/HiK8
Koloniedurchmesser [mm]	CM	79±3	65±2	72±2	76±2	69±2	74±3	72±2	49±1	75±3	76±2	62±2	72±3	54±2	69±2
	CM+0,8 M NaCl	47±2	29±0	38±2	11±1	34±3	43±2	44±2	25±2	40±3	46±2	37±2	36±2	37±2	42±2
	CM+1 M Sorbit	53±2	44±2	16±1	14±2	40±2	47±2	47±3	35±2	48±1	48±2	38±3	42±2	36±1	41±2
	CM+0,2 M NaNO <sub>2</sub>	46±2	11±1	25±2	11±2	20±2	30±2	0	12±2	44±3	42±2	30±2	15±1	25±2	42±3
	CM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	45±2	42±3	27±2	48±2	0	25±2	25±1	10±2	40±2	33±3	10±2	17±1	25±2	21±3
	CM+4 mM CuSO <sub>4</sub>	48±3	40±2	46±2	43±2	33±3	43±2	45±2	30±3	43±2	44±3	38±2	46±2	38±2	41±2
	CM 32°C	65±2	45±2	51±2	55±2	64±4	69±3	55±2	44±2	71±2	68±2	57±2	60±3	52±3	55±2
	MM	72±2	61±2	70±2	71±2	66±2	69±4	74±2	45±2	70±3	72±2	63±3	67±2	61±3	62±2
	MM+0,5 M NaCl	31±2	0	30±1	0	35±2	29±1	28±2	24±2	26±1	30±2	22±2	29±1	24±2	26±1
	MM+0,8 M Sorbit	56±3	49±2	25±2	19±1	51±2	52±2	48±2	35±1	55±2	54±2	45±2	51±2	35±2	51±2
	MM+0,1 M NaNO <sub>2</sub>	45±3	0	35±2	0	48±3	35±2	35±2	18±1	15±2	44±2	40±2	0	41±3	39±2
	MM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	40±2	30±2	22±2	0	20±1	36±2	27±2	12±2	31±3	26±2	11±1	20±1	20±1	37±2
	MM+2 mM CuSO <sub>4</sub>	67±2	46±1	59±2	72±2	56±2	59±3	50±1	28±2	54±2	59±1	51±2	42±2	40±2	56±2
	MM 32°C	54±1	45±2	55±2	50±2	55±2	53±3	55±2	44±1	53±2	53±2	62±2	51±2	44±2	49±2
	MM+5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	55±1	41±2	30±1	39±2	39±2	48±1	56±2	18±1	55±2	50±1	29±2	23±2	39±2	43±2

**Tab. 10: Wachstumsversuche mit den HIK-Mutanten unter Stress auf verschiedenen Festmedien (normalisiert).** Das Wachstumsverhalten von Kulturen der Mutantenstämme wurde mit dem von Kulturen des WT's verglichen. Die Normalisierung [%] wurde jeweils in Relation zu dem Wachstum nach 10 Tagen Inkubation bei 26°C auf reinem CM oder MM berechnet.

		MoWT	$\Delta$ Mesi1	$\Delta$ Mohik1	$\Delta$ Mohik1/ $\Delta$ si1	$\Delta$ Mohik2	$\Delta$ Mohik3	$\Delta$ Mohik4	$\Delta$ Mohik5	$\Delta$ Mohik6	$\Delta$ Mohik7	$\Delta$ Mohik8	$\Delta$ Mohik9	$\Delta$ Mohik5/Hik5	$\Delta$ Mohik8/Hik8
Relativer Koloniedurchmesser [%]	CM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	CM+0,8 M NaCl	59	45	53	14	49	58	61	51	53	61	60	49	69	61
	CM+1 M Sorbit	67	68	22	18	58	64	65	71	64	63	61	58	67	59
	CM+0,2 M NaNO <sub>2</sub>	58	17	35	14	29	41	0	24	59	55	48	21	46	61
	CM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	57	65	38	63	0	34	35	20	53	43	16	23	46	30
	CM+4 mM CuSO <sub>4</sub>	61	62	64	57	48	58	63	61	57	58	61	63	70	59
	CM 32°C	82	69	71	72	93	93	76	90	95	89	92	82	96	80
	MM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	MM+0,5 M NaCl	43	0	43	0	53	42	38	53	37	42	35	43	39	42
	MM+0,8 M Sorbit	78	80	36	27	77	75	65	78	79	75	71	76	57	82
	MM+0,1 M NaNO <sub>2</sub>	63	0	50	0	73	51	47	40	21	61	63	0	67	63
	MM+1 mM CoCl <sub>2</sub>	56	49	31	0	30	52	36	27	44	36	17	30	33	60
	MM+2 mM CuSO <sub>4</sub>	93	75	84	101	85	86	68	62	77	82	81	63	66	90
	MM 32°C	75	74	79	70	83	77	74	98	76	74	98	76	72	79
	MM+5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	76	67	43	55	59	70	76	40	79	69	46	34	64	69

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aggarwal, M., und Mondal, A.K.** (2006). Role of N-terminal hydrophobic region in modulating the subcellular localization and enzyme activity of the bisphosphate nucleotidase from *Debaryomyces hansenii*. *Eukaryot Cell* **5**, 262-271.
- Aiba, H., Nakasai, F., Mizushima, S., und Mizuno, T.** (1989). Phosphorylation of a bacterial activator protein, OmpR, by a protein kinase, EnvZ, results in stimulation of its DNA-binding ability. *J Biochem* **106**, 5-7.
- Akers, A., Köhle, H.H., und Gold, R.E.** (1990). Uptake, transport and mode of action of BAS 480 F, a new triazole fungicide. In Brighton Crop Protection Conference, *Pests and Diseases* (Thorton Heath, UK: British Crop Protection Council).
- Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., und Posas, F.** (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *Embo J* **22**, 2433-2442.
- Alm, E., Huang, K., und Arkin, A.** (2006). The evolution of two-component systems in bacteria reveals different strategies for niche adaptation. *PLoS Comput Biol* **2**, e143.
- Alonso-Monge, R., Navarro-Garcia, F., Roman, E., Negredo, A.I., Eisman, B., Nombela, C., und Pla, J.** (2003). The Hog1 mitogen-activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**, 351-361.
- Altschul, S.F., und Gish, W.** (1996). Local alignment statistics. *Methods Enzymol* **266**, 460-480.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., und Lipman, D.J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.
- Anand, G.S., Goudreau, P.N., und Stock, A.M.** (1998). Activation of methylesterase CheB: evidence of a dual role for the regulatory domain. *Biochemistry* **37**, 14038-14047.
- Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R., und Daszak, P.** (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evolut* **19**, 535-544.
- Aoyama, K., Mitsubayashi, Y., Aiba, H., und Mizuno, T.** (2000). Spy1, a histidine-containing phosphotransfer signaling protein, regulates the fission yeast cell cycle through the Mcs4 response regulator. *J Bacteriol* **182**, 4868-4874.
- Appleby, J.L., Parkinson, J.S., und Bourret, R.B.** (1996). Signal transduction via the multi-step phosphorelay: not necessarily a road less traveled. *Cell* **86**, 845-848.
- Azuma, N., Kanamaru, K., Matsushika, A., Yamashino, T., Mizuno, T., Kato, M., und Kobayashi, T.** (2007). *In vitro* analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 2493-2502.
- Bahn, Y.S.** (2008). Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell* **7**, 2017-2036.
- Bahn, Y.S., Kojima, K., Cox, G.M., und Heitman, J.** (2005). Specialization of the HOG pathway and its impact on differentiation and virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Mol Biol Cell* **16**, 2285-2300.
- Bahn, Y.S., Xue, C., Idnurm, A., Rutherford, J.C., Heitman, J., und Cardenas, M.E.** (2007). Sensing the environment: lessons from fungi. *Nat Rev Microbiol* **5**, 57-69.
- Balhadère, P.V., Foster, A.J., und Talbot, N.J.** (1999). Identification of Pathogenicity Mutants of the Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea* by Insertional Mutagenesis. *MPMI* **12**, 129-142.



- Banno, S., Noguchi, R., Yamashita, K., Fukumori, F., Kimura, M., Yamaguchi, I., und Fujimura, M.** (2007). Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. *Curr Genet* **51**, 197-208.
- Bartizal, K., Gill, C.J., Abruzzo, G.K., Flattery, A.M., Kong, L., Scott, P.M., Smith, J.G., Leighton, C.E., Bouffard, A., Dropinski, J.F., und Balkovec, J.** (1997). *In vitro* preclinical evaluation studies with the echinocandin antifungal MK-0991 (L-743,872). *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2326-2332.
- Bastmeyer, M., Deising, H.B., und Bechinger, C.** (2002). Force exertion in fungal infection. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **31**, 321-341.
- Becker, W.F., von Jagow, G., Anke, T., und Steglich, W.** (1981). Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an E-beta-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Lett* **132**, 329-333.
- Beese, S.E., Negishi, T., und Levin, D.E.** (2009). Identification of positive regulators of the yeast fps1 glycerol channel. *PLoS Genet* **5**, e1000738.
- Befani, C., Mylonis, I., Gkoutinaku, I.M., Georgoulas, P., Hu, C.J., Simos, G., und Liakos, P.** (2013). Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* **45**, 2359-2368.
- Bender, D.A.** (2012). Amino acid metabolism. (Oxford: John Wiley & Sons, Ltd).
- Berbee, M.L.** (2001). The phylogeny of plant and animal pathogens in the Ascomycota. *Physiol Mol Plant Path* **59**, 165-187.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., und Sunnerhagen, P.** (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**, 1743-1756.
- Bilsland-Marchesan, E., Arino, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., und Posas, F.** (2000). Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* **20**, 3887-3895.
- Blat, Y., und Eisenbach, M.** (1994). Phosphorylation-dependent binding of the chemotaxis signal molecule CheY to its phosphatase, CheZ. *Biochemistry* **33**, 902-906.
- Bourett, T.M., und Howard, R.J.** (1990). *In vitro* development of penetration structures in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Can J Bot* **68**, 329-342.
- Bourett, T.M., und Howard, R.J.** (1992). Actin in penetration pegs in the fungal rice blast pathogen, *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* **168**, 20-26.
- Boyce, K.J., Schreider, L., Kirszenblat, L., und Andrianopoulos, A.** (2011). The two-component histidine kinases DrkA and SlnA are required for *in vivo* growth in the human pathogen *Penicillium marneffeii*. *Mol Microbiol* **82**, 1164-1184.
- Brinkman, F.S., Macfarlane, E.L., Warren, P., und Hancock, R.E.** (2001). Evolutionary relationships among virulence-associated histidine kinases. *Infect Immun* **69**, 5207-5211.
- Bruno, K.S., Tenjo, F., Li, L., Hamer, J.E., und Xu, J.R.** (2004). Cellular localization and role of kinase activity of *PMK1* in *Magnaporthe grisea*. *Eukaryot Cell* **3**, 1525-1532.
- Burg, M.B., und Ferraris, J.D.** (2008). Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem* **283**, 7309-7313.
- Burnette, W.N.** (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* **112**, 195-203.
- Buschart, A., Gremmer, K., El-Mowafy, M., van den Heuvel, J., Mueller, P.P., und Bilitewski, U.** (2012). A novel functional assay for fungal histidine kinases group III reveals the role of HAMP domains for fungicide sensitivity. *J Biotechnol* **157**, 268-277.
- Cann, M.J.** (2007a). A subset of GAF domains are evolutionarily conserved sodium sensors. *Mol Microbiol* **64**, 461-472.
- Cann, M.J.** (2007b). Sodium regulation of GAF domain function. *Biochem Soc Trans* **35**, 1032-1034.

- Capra, E.J., und Laub, M.T.** (2012). Evolution of two-component signal transduction systems. *Annu Rev Microbiol* **66**, 325-347.
- Casadevall, A., und Pirofski, L.A.** (2001). Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. *J. Infect. Dis.* **184**, 337-344.
- Catlett, N.L., Yoder, O.C., und Turgeon, B.G.** (2003). Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryot Cell* **2**, 1151-1161.
- Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., und Meyerowitz, E.M.** (1993). *Arabidopsis* ethylene-response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.
- Chang, C., und Meyerowitz, E.M.** (1994). Eukaryotes have "two-component" signal transducers. *Res Microbiol* **145**, 481-486.
- Choi, W., und Dean, R.A.** (1997). The adenylate cyclase gene *MAC1* of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. *Plant Cell* **9**, 1973-1983.
- Chowdhury, S., Smith, K.W., und Gustin, M.C.** (1992). Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* **118**, 561-571.
- Chumley, F.G., und Valent, B.** (1990). Genetic Analysis of Melanin-Deficient, Nonpathogenic Mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe In* **3**, 135-143.
- Chun, C.D., Liu, O.W., und Madhani, H.D.** (2007). A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog* **3**, 22.
- Cobb, M.H., und Goldsmith, E.J.** (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* **270**, 14843-14846.
- Cobb, M.H., und Goldsmith, E.J.** (2000). Dimerization in MAP-kinase signaling. *Trends Biochem Sci* **25**, 7-9.
- Couch, B.C., und Kohn, L.M.** (2002). A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae*, from *M. grisea*. *Mycologia* **94**, 683-693.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., und Elofsson, A.** (1997). Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**, 673-676.
- De Groote, M.A., und Fang, F.C.** (1995). NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 2**, S162-165.
- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N., und Talbot, N.J.** (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244.
- de Nadal, E., Ammerer, G., und Posas, F.** (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 833-845.
- de Nadal, E., Casadome, L., und Posas, F.** (2003). Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**, 229-237.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., und Foster, G.D.** (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol* **13**, 414-430.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E., und Birren, B.W.** (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**, 980-986.
- Deising, H.B., Werner, S., und Wernitz, M.** (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes Infect* **2**, 1631-1641.
- Dihazi, H., Kessler, R., und Eschrich, K.** (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *J Biol Chem* **279**, 23961-23968.

- Dongo, A., Bataille-Simoneau, N., Campion, C., Guillemette, T., Hamon, B., Iacomi-Vasilescu, B., Katz, L., und Simoneau, P.** (2009). The group III two-component histidine kinase of filamentous fungi is involved in the fungicidal activity of the bacterial polyketide ambruticin. *Appl Environ Microbiol* **75**, 127-134.
- Drapier, J.C.** (1997). Interplay between NO and [Fe-S] clusters: relevance to biological systems. *Methods* **11**, 319-329.
- Dutta, R., Qin, L., und Inouye, M.** (1999). Histidine kinases: diversity of domain organization. *Mol Microbiol* **34**, 633-640.
- Eisenman, H.C., und Casadevall, A.** (2012). Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol* **93**, 931-940.
- Felsenstein, J.** (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 78.
- Fiedler, S., und Wirth, R.** (1988). Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal Biochem* **170**, 38-44.
- Fillinger, S., Ajouz, S., Nicot, P.C., Leroux, P., und Bardin, M.** (2012). Functional and structural comparison of pyrrolnitrin- and iprodione-induced modifications in the class III histidine-kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *PLoS One* **7**, e42520.
- Foster, A.J., Jenkinson, J.M., und Talbot, N.J.** (2003). Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. *Embo J* **22**, 225-235.
- Furukawa, K., und Hohmann, S.** (2013). Synthetic biology: lessons from engineering yeast MAPK signalling pathways. *Mol Microbiol* **88**, 5-19.
- Furukawa, K., Randhawa, A., Kaur, H., Mondal, A.K., und Hohmann, S.** (2012). Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Lett* **586**, 2417-2422.
- Galperin, M.Y.** (2005). A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**, 35.
- Galperin, M.Y., Higdon, R., und Kolker, E.** (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Mol Biosyst* **6**, 721-728.
- Garcia-Rodriguez, L.J., Valle, R., Duran, A., und Roncero, C.** (2005). Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* **579**, 6186-6190.
- Garcia, R., Rodriguez-Pena, J.M., Bermejo, C., Nombela, C., und Arroyo, J.** (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**, 10901-10911.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R.A., und Schiestl, R.H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Gilbert, R.D., und Dean, R.** (1996). Chemical signals responsible for appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Physiol Mol Plant Pathol* **48**, 335-346.
- Gotoh, Y., Eguchi, Y., Watanabe, T., Okamoto, S., Doi, A., und Utsumi, R.** (2010). Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **13**, 232-239.
- Grebe, T.W., und Stock, J.B.** (1999). The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol* **41**, 139-227.
- Green, M.R., und Sambrook, J.** (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Hagiwara, D., Matsubayashi, Y., Marui, J., Furukawa, K., Yamashino, T., Kanamaru, K., Kato, M., Abe, K., Kobayashi, T., und Mizuno, T.** (2007). Characterization of the NikA histidine kinase implicated in the phosphorelay signal transduction of *Aspergillus nidulans*, with special reference to fungicide responses. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 844-847.
- Hamer, J.E., Valent, B., und Chumley, F.G.** (1989). Mutations at the *SMO* genetic locus affect the shape of diverse cell types in the rice blast fungus. *Genetics* **122**, 351-361.

- Harlocker, S.L., Bergstrom, L., und Inouye, M.** (1995). Tandem binding of six OmpR proteins to the ompF upstream regulatory sequence of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 26849-26856.
- Hebert, T.T.** (1971). The perfect stage of *Pyricularia grisea*. *Phytopathology* **61**, 83-87.
- Henningsen, M.** (2003). Moderne Fungizide: Pilzbekämpfung in der Landwirtschaft. *Chemie in unserer Zeit* **37**, 98-111.
- Hewitt, G.** (2000). New modes of action of fungicides. *Pesticide Outlook* **11**, 28-32.
- Hill, J., Donald, K.A., und Griffiths, D.E.** (1991). DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. *Nucleic Acids Res* **19**, 5791.
- Hoch, J.A.** (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Curr Opin Microbiol* **3**, 165-170.
- Hohmann, S.** (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-372.
- Hohmann, S.** (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **583**, 4025-4029.
- Howard, R.J.** (1994). Cell biology of pathogenesis. Wallingford: CAB International.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H., und Money, N.P.** (1991). Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *PNAS* **88**, 11281-11284.
- Howard, R.J., und Valent, B.** (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **50**, 491-512.
- Hughes, V., Muller, A., Stark, M.J., und Cohen, P.T.** (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *Saccharomyces cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur J Biochem* **216**, 269-279.
- Ingavale, S.S., Chang, Y.C., Lee, H., McClelland, C.M., Leong, M.L., und Kwon-Chung, K.J.** (2008). Importance of mitochondria in survival of *Cryptococcus neoformans* under low oxygen conditions and tolerance to cobalt chloride. *PLoS Pathog* **4**, e1000155.
- Islas-Flores, I., Sanchez-Rodriguez, Y., Brito-Argaez, L., Peraza-Echeverria, L., Rodriguez-Garcia, C., Couoh-Uicab, Y., James, A., Tzec-Sima, M., Canto-Canche, B., und Peraza-Echeverria, S.** (2011). The Amazing Role of the Group III of Histidine Kinases in Plant Pathogenic Fungi, an Insight to Fungicide Resistance. *Asian J Biochem* **6**, 1-14.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., und Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Jeon, J., Park, S.Y., Chi, M.H., Choi, J., Park, J., Rho, H.S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Park, J.Y., Yi, M., Yang, S., Kwon, M.J., Han, S.S., Kim, B.R., Khang, C.H., Park, B., Lim, S.E., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H.S., Kim, H., Kang, S., Choi, W.B., und Lee, Y.H.** (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nat Genet* **39**, 561-565.
- Johnson, L.N.** (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **37**, 627-641.
- Johnson, L.N., und Barford, D.** (1993). The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 199-232.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., und Thornton, J.M.** (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* **8**, 275-282.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D.W., und Wood, P.M.** (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim Biophys Acta* **1504**, 179-195.
- Kankanala, P., Czymmek, K., und Valent, B.** (2007). Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus. *Plant Cell* **19**, 706-724.
- Kempf, B., und Bremer, E.** (1998). Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch Microbiol* **170**, 319-330.
- Kim, S., Park, S.Y., Kim, K.S., Rho, H.S., Chi, M.H., Choi, J., Park, J., Kong, S., Goh, J., und Lee, Y.H.** (2009). Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Genet* **5**, e1000757.

- Kojima, K., Bahn, Y.S., und Heitman, J.** (2006). Calcineurin, Mpk1 and Hog1 MAPK pathways independently control fludioxonil antifungal sensitivity in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **152**, 591-604.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., und Okuno, T.** (2004). Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Mol Microbiol* **53**, 1785-1796.
- Koretke, K.K., Lupas, A.N., Warren, P.V., Rosenberg, M., und Brown, J.R.** (2000). Evolution of two-component signal transduction. *Mol Biol Evol* **17**, 1956-1970.
- Kramer, B., Thines, E., und Foster, A.J.** (2009). MAP kinase signalling pathway components and targets conserved between the distantly related plant pathogenic fungi *Mycosphaerella graminicola* and *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genet Biol* **46**, 667-681.
- Kramer, E.M., und Myers, D.R.** (2012). Five popular misconceptions about osmosis. *Am J Phys* **80**, 694.
- Kück, U., und Hoff, B.** (2010). New tools for the genetic manipulation of filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 51-62.
- Kunova, A., Pizzatti, C., und Cortesi, P.** (2012). Impact of tricyclazole and azoxystrobin on growth, sporulation and secondary infection of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Pest Manag Sci* **69**, 278-284.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lander, E.S., und das "International Human Genome Sequencing Consortium"** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Langfelder, K., Streibel, M., Jahn, B., Haase, G., und Brakhage, A.A.** (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol* **38**, 143-158.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., und Higgins, D.G.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Lazo, G.R., Stein, P.A., und Ludwig, R.A.** (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology* **9**, 963-967.
- Lee, H., Bien, C.M., Hughes, A.L., Espenshade, P.J., Kwon-Chung, K.J., und Chang, Y.C.** (2007). Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **65**, 1018-1033.
- Lee, J.W., Ko, Y.J., Kim, S.Y., und Bahn, Y.S.** (2011). Multiple roles of Ypd1 phosphotransfer protein in viability, stress response, and virulence factor regulation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **10**, 998-1002.
- Leonardo, M.R., und Forst, S.** (1996). Re-examination of the role of the periplasmic domain of EnvZ in sensing of osmolarity signals in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **22**, 405-413.
- Levental, I., Grzybek, M., und Simons, K.** (2010). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* **49**, 6305-6316.
- Li, G., Zhou, X., und Xu, J.R.** (2012). Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae*. *Curr Opin Microbiol* **15**, 678-684.
- Li, D., Agrellos, O.A., und Calderone, R.** (2010). Histidine kinases keep fungi safe and vigorous. *Curr Opin Microbiol* **13**, 424-430.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., und Fassler, J.S.** (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *Embo J* **17**, 6952-6962.
- Liu, H., Suresh, A., Willard, F.S., Siderovski, D.P., Lu, S., und Naqvi, N.I.** (2007). Rgs1 regulates multiple Galpha subunits in *Magnaporthe* pathogenesis, asexual growth and thigmotropism. *Embo J* **26**, 690-700.
- Lu, J.M., Deschenes, R.J., und Fassler, J.S.** (2003). *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for *SLN1*-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot Cell* **2**, 1304-1314.

- Lukat, G.S., McCleary, W.R., Stock, A.M., und Stock, J.B.** (1992). Phosphorylation of bacterial response regulator proteins by low molecular weight phospho-donors. *PNAS* **89**, 718-722.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., und Saito, H.** (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* **369**, 242-245.
- Marcel, S., Sawers, R., Oakeley, E., Angliker, H., und Paszkowski, U.** (2010). Tissue-adapted invasion strategies of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **22**, 3177-3187.
- Marzluf, G.A.** (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**, 17-32.
- Meena, N., Kaur, H., und Mondal, A.K.** (2010). Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *J Biol Chem* **285**, 12121-12132.
- Mertins, P., Udeshi, N.D., Clauser, K.R., Mani, D.R., Patel, J., Ong, S.E., Jaffe, J.D., und Carr, S.A.** (2012). iTRAQ labeling is superior to mTRAQ for quantitative global proteomics and phosphoproteomics. *Mol Cell Proteomics* **11**, M111 014423.
- Miermont, A., Uhlendorf, J., McClean, M., und Hersen, P.** (2011). The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *J Signal Transduct* **2011**, 930940.
- Mollapour, M., und Piper, P.W.** (2007). Hog1 mitogen-activated protein kinase phosphorylation targets the yeast Fps1 aquaglyceroporin for endocytosis, thereby rendering cells resistant to acetic acid. *Mol Cell Biol* **27**, 6446-6456.
- Money, N.P.** (1990). Measurement of pore size in the hyphal cell wall of *Achlya bisexualis*. *Exp Mycol* **14**, 234-242.
- Montgomery, B.L., und Lagarias, J.C.** (2002). Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci* **7**, 357-366.
- Motoyama, T., Kadokura, K., Ohira, T., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., und Kudo, T.** (2005b). A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action. *Fungal Genet Biol* **42**, 200-212.
- Motoyama, T., Ochiai, N., Morita, M., Iida, Y., Usami, R., und Kudo, T.** (2008). Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity. *Curr Genet* **54**, 185-195.
- Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., und Kudo, T.** (2005a). An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Curr Genet* **47**, 298-306.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., und Yamada-Okabe, H.** (1998). Isolation of *CaSLN1* and *CaNIK1*, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* **144 ( Pt 2)**, 425-432.
- Nemecek, J.C., Wuthrich, M., und Klein, B.S.** (2006). Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science* **312**, 583-588.
- Newton, A.C.** (2001). Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev* **101**, 2353-2364.
- Niu, X., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., und Pardo, J.M.** (1995). Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. *Plant Physiol* **109**, 735-742.
- Nordlander, B., Krantz, M., und Hohmann, S.** (2008). Hog1-mediated metabolic adjustments following hyperosmotic shock in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In Stress activated protein kinases. Topics in *Current Genetics* **20**, (Springer).
- Odds, F.C., Brown, A.J., und Gow, N.A.** (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* **11**, 272-279.
- Odenbach, D., Breth, B., Thines, E., Weber, R.W., Anke, H., und Foster, A.J.** (2007). The transcription factor Con7p is a central regulator of infection-related morphogenesis in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Microbiol* **64**, 293-307.
- O'Rourke, S.M., Herskowitz, I., und O'Shea, E.K.** (2002). Yeast go the whole HOG for the hyperosmotic response. *Trends Genet* **18**, 405-412.

- Ostrander, D.B., und Gorman, J.A.** (1999). The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *J Bacteriol* **181**, 2527-2534.
- Parisot, D., Dufresne, M., Veneault, C., Lauge, R., und Langin, T.** (2002). *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Mol Genet Genomics* **268**, 139-151.
- Parkinson, J.S.** (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* **73**, 857-871.
- Parkinson, J.S.** (2010). Signaling mechanisms of HAMP domains in chemoreceptors and sensor kinases. *Annu Rev Microbiol* **64**, 101-122.
- Patkar, R.N., Suresh, A., und Naqvi, N.I.** (2010). MoTea4-mediated polarized growth is essential for proper asexual development and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. *Eukaryot Cell* **9**, 1029-1038.
- Pellequer, J.L., Brudler, R., und Getzoff, E.D.** (1999). Biological sensors: More than one way to sense oxygen. *Curr Biol* **9**, R416-418.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- Pollard, A.M., Bilwes, A.M., und Crane, B.R.** (2009). The structure of a soluble chemoreceptor suggests a mechanism for propagating conformational signals. *Biochemistry* **48**, 1936-1944.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., und Saito, H.** (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**, 865-875.
- Prista, C., Loureiro-Dias, M.C., Montiel, V., Garcia, R., und Ramos, J.** (2005). Mechanisms underlying the halotolerant way of *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Res* **5**, 693-701.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Arino, J., Serrano, R., und Posas, F.** (2001). Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *Embo J* **20**, 1123-1133.
- Reiser, V., Raitt, D.C., und Saito, H.** (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* **161**, 1035-1040.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., und Hohmann, S.** (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**, 8290-8300.
- Rong, Z., Wilson, M.T., und Cooper, C.E.** (2013). A model for the nitric oxide producing nitrite reductase activity of hemoglobin as a function of oxygen saturation. *Nitric Oxide* **33**, 74-80.
- Saito, H., und Tatebayashi, K.** (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem* **136**, 267-272.
- Saitou, N., und Nei, M.** (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**, 406-425.
- Salnikow, K., Donald, S.P., Bruick, R.K., Zhitkovich, A., Phang, J.M., und Kasprzak, K.S.** (2004). Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* **279**, 40337-40344.
- Schiestl, R.H., und Gietz, R.D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**, 339-346.
- Schloemer, R.H., und Garrett, R.H.** (1974). Uptake of nitrite by *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **118**, 270-274.
- Shi, Z., Christian, D., und Leung, H.** (1998). Interactions between spore morphogenetic mutations affect cell types, sporulation, and pathogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 199-207.
- Shi, Z., und Leung, H.** (1995). Genetic analysis of sporulation in *Magnaporthe grisea* by chemical and insertional mutagenesis. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 949-959.

- Snoeiijers, S.S., Pérez-García, A., Joosten, M., H., A. J., und De Wit, P.J.G.M.** (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *Eur J Plant Pathol* **106**, 493-506.
- Steeg, P.S., Palmieri, D., Ouatas, T., und Salerno, M.** (2003). Histidine kinases and histidine phosphorylated proteins in mammalian cell biology, signal transduction and cancer. *Cancer Lett* **190**, 1-12.
- Stock, A.M., Robinson, V.L., und Goudreau, P.N.** (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem* **69**, 183-215.
- Swain, K.E., und Falke, J.J.** (2007). Structure of the conserved HAMP domain in an intact, membrane-bound chemoreceptor: a disulfide mapping study. *Biochemistry* **46**, 13684-13695.
- Sweigard, J.A., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L., und Valent, B.** (1997). A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genet Newslett* **44**, 52-53.
- Talbot, N.J.** (2003). On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol* **57**, 177-202.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., und Kumar, S.** (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* **28**, 2731-2739.
- Tanaka, C., und Izumitsu, K.** (2010). Two-Component Signaling System in Filamentous Fungi and the Mode of Action of Dicarboximide and Phenylpyrrole Fungicides. (Rijeka, Croatia: InTech).
- Tao, W., Malone, C.L., Ault, A.D., Deschenes, R.J., und Fassler, J.S.** (2002). A cytoplasmic coiled-coil domain is required for histidine kinase activity of the yeast osmosensor, SLN1. *Mol Microbiol* **43**, 459-473.
- Taylor, B.L., und Zhulin, I.B.** (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 479-506.
- Thines, E., Anke, H., und Weber, R.W.** (2004). Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi. *Mycol Res* **108**, 14-25.
- Thines, E., Eilbert, F., Sterner, O., und Anke, H.** (1997). Signal transduction leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea*: effects of second messengers diacylglycerols, ceramides and sphingomyelin. *FEMS Microbiology Letters* **156**, 91-94.
- Thines, E., Weber, R.W., und Talbot, N.J.** (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **12**, 1703-1718.
- Torres-Guererro, H., und Edman, J.C.** (1994). Melanin-deficient mutants of *Cryptococcus neoformans*. *J Med Vet Mycol* **32**, 303-313.
- Tucker, S.L., und Talbot, N.J.** (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **39**, 385-417.
- Ulrich, L.E., und Zhulin, I.B.** (2010). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Res* **38**, D401-407.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., und Shinozaki, K.** (2001). Plant histidine kinases: an emerging picture of two-component signal transduction in hormone and environmental responses. *Sci STKE* **2001**, 18.
- van Criekinge, W., und Beyaert, R.** (1999). Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol Proced Online* **2**, 1-38.
- Vargas-Perez, I., Sanchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., und Aguirre, J.** (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **6**, 1570-1583.
- Verreet, J.A.** (2013). Bedeutung des Pflanzenschutzes für die Welternährung. In *ALVA-Tagung* (Österreich).
- Vetcher, L., Menzella, H.G., Kudo, T., Motoyama, T., und Katz, L.** (2007). The antifungal polyketide ambruticin targets the HOG pathway. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3734-3736.



- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J.S., Le Pecheur, P., Kunduru, A.R., Leroux, P., and Legendre, L.** (2006). A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1042-1050.
- Webber, C.A., und Kadner, R.J.** (1997). Involvement of the amino-terminal phosphorylation module of UhpA in activation of uhpT transcription in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **24**, 1039-1048.
- Weber, R.W., Wakley, G.E., Thines, E., und Talbot, N.J.** (2001). The vacuole as central element of the lytic system and sink for lipid droplets in maturing appressoria of *Magnaporthe grisea*. *Protoplasma* **216**, 101-112.
- Webster, J., und Weber, R.W.S.** (2007). Introduction to Fungi. (New York: Cambridge University Press).
- Weiss, V., Claverie-Martin, F., und Magasanik, B.** (1992). Phosphorylation of nitrogen regulator I of *Escherichia coli* induces strong cooperative binding to DNA essential for activation of transcription. *PNAS* **89**, 5088-5092.
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K., und Ota, I.** (2002). Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* **1**, 163-173.
- Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**, 681-692.
- Wolanin, P.M., Thomason, P.A., und Stock, J.B.** (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol* **3**, Reviews 3013.
- Wurgler-Murphy, S.M., und Saito, H.** (1997). Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends Biochem Sci* **22**, 172-176.
- Xu, J.R., Staiger, C.J., und Hamer, J.E.** (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *PNAS* **95**, 12713-12718.
- Xu, Q., Porter, S.W., und West, A.H.** (2003). The yeast YPD1/SLN1 complex: insights into molecular recognition in two-component signaling systems. *Structure* **11**, 1569-1581.
- Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., und Yamada-Okabe, H.** (1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**, 7243-7247.
- Yi, M., Park, J.H., Ahn, J.H., und Lee, Y.H.** (2008). MoSNF1 regulates sporulation and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genet Biol* **45**, 1172-1181.
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., und Tanaka, C.** (2005). Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryot Cell* **4**, 1820-1828.
- Zhang, H., Liu, K., Zhang, X., Song, W., Zhao, Q., Dong, Y., Guo, M., Zheng, X., und Zhang, Z.** (2010). A two-component histidine kinase, MoSLN1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Curr Genet* **56**, 517-528.
- Zhang, W.J., Jiang, F.B., und Ou, J.F.** (2011). Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *IAEES* **1**, 125-144.
- Zhang, Z., und Hendrickson, W.A.** (2010). Structural characterization of the predominant family of histidine kinase sensor domains. *J Mol Biol* **400**, 335-353.
- Zhao, X., Kim, Y., Park, G., und Xu, J.R.** (2005). A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea*. *Plant Cell* **17**, 1317-1329.

---

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name: Stefan Paul Jacob  
Geburtsdatum: 05.10.1983  
Geburtsort: 67346 Speyer  
Familienstand: verheiratet, ein Kind

## Akademischer Werdegang

### Promotion

2011 – 2014: Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung e.V. (IBWF),  
Dissertation unter der Betreuung von Prof. Dr. E. Thines mit dem Titel:  
„Untersuchungen zur Bedeutung von Histidinkinasen in *Magnaporthe oryzae* und zum Wirkmechanismus des Fungizids Fludioxonil“

### Hochschulstudium

2009 - 2011: TU Kaiserslautern, Biosciences (Masterstudiengang)  
Schwerpunkt Mikrobiologie/Biotechnologie  
Abschluss "Master of Science (M.Sc.)"  
Titel der Masterarbeit: „Osmoregulation als Fungizidtarget“

2010 BASF SE, Global Research Crop Protection, APR/FM - LI470,  
Limburgerhof  
Industrieaufenthalt: „Methoden zur Aufklärung fungizider Wirk-  
mechanismen“

2007 - 2009: TU Kaiserslautern, Biowissenschaften (Bachelorstudiengang)  
Abschluss Bachelor of Science (B.Sc.)  
Titel der Bachelorarbeit: „Molekularbiologische Charakterisierung von  
Komponenten des „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweges im  
Reisbranderreger *Magnaporthe oryzae*“

2005 - 2007: TU Kaiserslautern, Biophysik (Diplomstudiengang)

### Schulbildung

1994 - 2004: Friedrich Magnus Schwerd-Gymnasium, Speyer  
Abschluss Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

1990 - 1994: Hermann-Gmeiner-Grundschule, Waldsee