

**Johannes Gutenberg-Universität Mainz**  
Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung

**Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen  
der Pflanzen-Pathogen Interaktion  
im Modellorganismus *Zymoseptoria tritici***

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Annamaria Brauchler**  
geb. in Eugensruhm

Mainz, Dezember 2016

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 01.03.2017

Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen  
der Pflanzen-Pathogen Interaktion  
im Modellorganismus *Zymoseptoria tritici*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Zymoseptoria tritici</i> als Schädling im Weizenanbau.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Der Modellorganismus <i>Zymoseptoria tritici</i>.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Der Infektionsmechanismus von <i>Zymoseptoria tritici</i>.....</b>	<b>3</b>
1.3.1 Die symptomlose Phase der Infektion .....	4
1.3.2 Die nekrotrophe Phase der Infektion .....	6
<b>1.4 Der Sekundärmetabolismus filamentöser Pilze .....</b>	<b>8</b>
1.4.1 Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten .....	9
1.4.2 Die Regulation des Sekundärmetabolismus.....	10
1.4.2.1 Der globale Regulator AreAp .....	11
1.4.3 Die Aktivierung stiller Sekundärmetaboliten-Gencluster.....	12
<b>1.5 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Material .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Chemikalien und Medienbestandteile.....	15
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	16
2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	18
2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.3.2 Zentrifugen und Laborschüttler.....	18
2.1.4 Kulturmedien .....	19
2.1.4.1 Selektionsmedien .....	20
2.1.5 Organismen.....	21
2.1.5.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	21
2.1.5.2 <i>Escherichia coli</i> .....	21
2.1.5.3 <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	21
2.1.5.4 <i>Triticum aestivum</i> .....	22
2.1.6 Enzyme .....	22
2.1.7 Reaktionskits .....	22
2.1.8 Primer .....	23

2.1.9 Plasmide.....	23
2.1.10 Software.....	24
2.1.10.1 Datenbanken .....	24
2.1.10.2 Programme.....	24
2.1.11 Mikroskopie und Dokumentation .....	24
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>25</b>
2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	25
2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	25
2.2.1.2 Plasmidpräparation aus <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.2.1.3 Isolierung von RNA aus <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	25
2.2.1.4 Isolierung von RNA aus <i>Triticum aestivum</i> .....	26
2.2.1.5 Bestimmung der Qualität und Konzentration von Nukleinsäuren.....	26
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	27
2.2.2.1 PCR für Klonierungszwecke.....	27
2.2.2.2 PCR zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden.....	27
2.2.2.3 Kolonie-PCR zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen.....	28
2.2.2.4 Quantitative real-time PCR.....	29
2.2.3 Restriktion von Nukleinsäuren .....	29
2.2.3.1 Dephosphorylierung von Restriktionsschnittstellen.....	29
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	30
2.2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen .....	30
2.2.5 Methoden zur Klonierung von DNA .....	30
2.2.5.1 Ligation.....	30
2.2.6 Transformation .....	31
2.2.6.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	31
2.2.6.3 Transformation von <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	32
2.2.7 Southern Blot Analyse .....	34
2.2.7.1 Restriktion, Präzipitation und gelelektrophoretische Auftrennung genomischer DNA .....	34
2.2.7.2 Transfer der Nukleinsäuren.....	34
2.2.7.3 Hybridisierung .....	35
2.2.7.4 Detektion.....	35
2.2.8 Klonierungsstrategien .....	36
<b>2.3 Methoden zur phänotypischen Charakterisierung.....</b>	<b>36</b>
2.3.1 Herstellung von Sporensuspensionen .....	36
2.3.2 Wachstumsvergleich auf Festmedien .....	37
2.3.2.1 Untersuchung des Wachstums in Gegenwart verschiedener Stickstoff-Quellen .....	37
2.3.2.2 Kaliumchlorat-Assay .....	37
2.3.3 Phytopathogenitäts-Assay gegen Weizenpflanzen .....	38

2.3.4 Keimungstest .....	38
<b>2.4 Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus.....</b>	<b>39</b>
2.4.1 Fermentation in Schüttelkolben .....	39
2.4.2 Fermentation im 20 L Maßstab.....	39
2.4.3 Herstellung von Rohextrakten aus Myzel und Kulturfiltrat.....	40
2.4.4 High Performance Liquid Chromatographie.....	40
2.4.5 HPLC-MS-Messungen .....	42
2.4.6 Säulenchromatographie zur Trennung von Substanzen.....	43
2.4.7 Reinigung von Substanzen mittels Semipräparativer-HPLC .....	43
2.4.8 Quantifizierung von Substanzen.....	44
2.4.9 Test auf Phytotoxizität gegen Weizenblätter .....	44
2.4.10 Induktion der Expression von PR-Proteinen in <i>Triticum aestivum</i> .....	44
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Die Aktivierung stiller Sekundärmetaboliten-Gencluster .....</b>	<b>46</b>
3.1.1 Auswahl geeigneter Fermentationsparameter und Zielgene als Regulatoren von Sekundärmetaboliten-Genclustern.....	46
<b>3.2 Der globale Regulator ZtAreAp .....</b>	<b>48</b>
3.2.1 Die Inaktivierung von <i>ZtareA</i> .....	48
3.2.2 Regulation der Genexpression von <i>ZtareA</i> in Abhängigkeit der Stickstoffquelle .....	49
3.2.3 Phänotypische Untersuchung von $\Delta ZtareA$ .....	50
3.2.3.1 Wachstum auf unterschiedlichen Stickstoffquellen .....	50
3.2.3.2 Regulation der Genexpression der Nitrat- und Nitritreduktasegene durch <i>ZtAreAp</i> .....	52
3.2.3.3 Untersuchung der Keimungsfähigkeit von $\Delta ZtareA$ .....	54
3.2.3.4 Phytopathogenitäts-Assay .....	56
3.2.3.5 Die Genexpression von <i>ZtareA</i> im Infektionsverlauf.....	57
3.2.4 Untersuchung des Metabolitenspektrums von $\Delta ZtareA$ .....	58
3.2.4.1 Fermentation von $\Delta ZtareA$ im 20 L Maßstab.....	59
3.2.4.2 Isolierung von RS2652 und RS2706.....	61
3.2.4.3 Strukturaufklärung und Aktivität von RS2652 .....	62
3.2.4.4 Strukturaufklärung und Aktivität von RS2706 .....	63
3.2.4.5 Untersuchungen zur Biosynthese von p-Hydroxybenzoesäure .....	63
3.2.4.6 Die Genexpression von <i>Ztcyp53</i> im Infektionsverlauf.....	67
3.2.4.7 Die Induktion der pflanzlichen Immunantwort durch p-Hydroxybenzoesäure .....	67
3.2.4.8 Metabolisierung von Salicylsäure durch <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	68
<b>3.3 Charakterisierung der Polyketidsynthase-Gene aus <i>Zymoseptoria tritici</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>3.4 Genexpressionsanalyse der Polyketidsynthasen in <i>Zymoseptoria tritici</i> während des Infektionszyklus .....</b>	<b>72</b>
3.4.1 Inaktivierung ausgewählter Polyketidsynthasen .....	75

3.4.1.1 Phänotypische Untersuchung der <i>loss of function</i> Mutanten .....	75
3.4.1.2 Pathogenitäts-Assay mit den Polyketidsynthese-Inaktivierungsmutanten .....	77
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1 Der Sekundärmetabolismus von <i>Zymoseptoria tritici</i> .....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Fermentative Methoden zur Aktivierung stiller Sekundärmetaboliten-Gencluster in <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	79
4.1.2 Genetische Modifikation von Regulatoren des Sekundärmetabolismus .....	81
<b>4.2 Der globale Regulator <i>ZtAreAp</i> in <i>Zymoseptoria tritici</i> .....</b>	<b>82</b>
4.2.1 Die Regulation der Genexpression von <i>ZtareA</i> .....	83
4.2.2 <i>ZtAreAp</i> reguliert die Genexpression von Nitrat- und Nitritreduktasen.....	83
4.2.3 Der Verlust von <i>ZtAreAp</i> beeinflusst die Konidienkeimung, die Pathogenität und die Pigmentierung.....	85
4.2.3.1 Die Bedeutung von Stickstoffmangel und <i>ZtAreAp</i> im Infektionsverlauf.....	88
4.2.4 Isolierung von p-Hydroxybenzoesäure aus <i>ΔZtareA</i> .....	90
4.2.4.1 Detoxifizierung pflanzlicher Phenolsäuren durch <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	92
4.2.4.2 Die Umwandlung von Benzoesäure zu p-Hydroxybenzoesäure wird von <i>ZtCYP53p</i> katalysiert.....	94
4.2.4.3 Genexpression von <i>Ztcyp53</i> im Infektionsverlauf.....	97
4.2.4.4 p-Hydroxybenzoesäure ist nicht an der Induktion der Genexpression von PR-Proteinen in Weizen beteiligt.....	98
4.2.4.5 Mögliche Manipulation der pflanzlichen Immunantwort durch die Metabolisierung von Salicylsäure .....	100
<b>4.3 Untersuchung der <i>in vivo</i> Genexpression der Polyketidsynthasen aus <i>Zymoseptoria tritici</i> im Infektionsverlauf .....</b>	<b>101</b>
4.3.1 <i>Ztpks1</i> ist essentiell für die dunkle Pigmentierung von Pyknidien .....	103
4.3.2 Untersuchung der <i>Ztpks2 loss of function</i> Mutante.....	105
4.3.3 <i>Ztpks4</i> ist entbehrlich für die Pathogenität.....	107
4.3.4 Untersuchung der <i>Ztpks10 loss of function</i> Mutante.....	108
<b>5. Ausblick.....</b>	<b>110</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>112</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>132</b>
<b>Anhang I: Oligonukleotid-Primer.....</b>	<b>132</b>
<b>Anhang II: Klonierungsstrategien .....</b>	<b>136</b>
<b>Anhang III: Southern Blot Analysen .....</b>	<b>138</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>141</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

AIM	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Induktions-Medium
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BS	Benzoessäure
BAR	Bialaphos-Resistenz
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
B4MO	Benzoat-4-Monooxygenase
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
Cef	Cefotaxim
CS	p-Coumarinsäure
CSPD	Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate
CYP	Cytochrom P450
Da	Dalton
DHN	Dihydroxynaphthalin
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpi	engl. <i>days post infection</i>
dNTP's	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
gDNA	genomische DNA
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDM	Histon-Demethylase
HMT	Histonmethyltransferase
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
HPT	Hygromycin-Phosphotransferase
Hygr	Hygromycin B
H <sub>2</sub> O <sub>deion</sub>	deionisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ultrafiltriertes und deionisiertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
KKR	Kohlenstoff-Kataboliten Repression
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
μF	Mikrofarad

---

MM	Minimalmedium
N-MM	Stickstoff Mangelmedium
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NMR	engl. <i>nitrogen metabolite repression</i>
NRP	nichtribosomales Peptid
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
<i>p.a.</i>	<i>pro analysis</i> , analysenrein
PAMP	engl. <i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCD	engl. <i>programmed cell death</i> , programmierter Zelltod
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
p-HBS	p-Hydroxybenzoesäure
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsynthase
PR	engl. <i>pathogenesis related</i>
PVP	Polyvinylpyrolidon
q-PCR	quantitative real-time PCR
QTL	engl. <i>Quantitative Trait Locus</i>
rel.	relative
Rif	Rifampicin
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SAR	engl. <i>systemic acquired resistance</i>
STB	engl. <i>Septoria tritici blotch</i>
Strep	Streptomycin
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Tet	Tetrazyklin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	engl. <i>untranslated region</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
ZS	Zimtsäure
6-MSA	6-Methylsalicylat
6-MSAS	6-Methylsalicylat Synthetase

---

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b>	Der Infektionszyklus von <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	7
<b>Abbildung 2:</b>	Globale Regulatoren pilzlicher Sekundärmetaboliten-Cluster .....	10
<b>Abbildung 3:</b>	Schematische Darstellung der Funktion von AreAp in Ascomyceten.....	12
<b>Abbildung 4:</b>	Relative Transkriptmenge von <i>ZtareA</i> bei Kultivierung auf N-MM mit Nitrat bzw. Glutamat.....	50
<b>Abbildung 5:</b>	Wachstum in Gegenwart unterschiedlicher Stickstoffquellen.....	51
<b>Abbildung 6:</b>	Relative Transkriptmengen von <i>Znit1</i> und <i>Znii1</i> bei Kultivierung auf N-MM mit Nitrat bzw. Glutamat.....	53
<b>Abbildung 7:</b>	Wachstum von $\Delta ZtareA$ und $\Delta ZtareA+ZtareA$ auf $KClO_3$ .....	54
<b>Abbildung 8.A:</b>	Untersuchung der Fähigkeit von $\Delta ZtareA$ zur dimorphen Transition auf unterschiedlichen Medien.....	55
<b>Abbildung 8.B:</b>	Keimungsassay von Sporen des $\Delta ZtareA$ - und des Wildtyp-Stammes.....	55
<b>Abbildung 9:</b>	<i>In vitro</i> Keimungsassay zur Bestimmung der Keimungsrate von $\Delta ZtareA$ .....	56
<b>Abbildung 10:</b>	Pathogenitäts-Assay von $\Delta ZtareA$ auf Weizenpflanzen .....	57
<b>Abbildung 11:</b>	<i>In planta</i> Genexpressionsanalyse von <i>ZtareA</i> während des Infektionsverlaufes in Weizen.....	58
<b>Abbildung 12.A:</b>	HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte von $\Delta ZtareA$ und des WT-Stammes in MM + 10 % WE im 500 ml Maßstab.....	59
<b>Abbildung 12.B:</b>	Phytotoxizitäts-Assay mit den Kulturfiltratextrakten aus der Fermentation von $\Delta ZtareA$ und des Wildtyps in MM + 10 % WE.....	59
<b>Abbildung 13:</b>	Parameter einer Fermentation von $\Delta ZtareA$ in MM + 10 % WE.....	60
<b>Abbildung 14:</b>	Parameter einer Fermentation des <i>Z. tritici</i> Wildtyps in MM+10 % WE...	61
<b>Abbildung 15:</b>	Aufreinigungsschema von RS2652 und RS2706 aus dem Kulturfiltratextrakt der Fermentation von $\Delta ZtareA$ in MM + 10 % WE.....	62
<b>Abbildung 16:</b>	Phytotoxizitäts-Assay mit p-Hydroxybenzoesäure.....	63

<b>Abbildung 17:</b>	Umwandlung von Benzoesäure und Zimtsäure zu p-Hydroxybenzoesäure.....	64
<b>Abbildung 18:</b>	Regulation der Genexpression der Benzoat-4-Monooxygenase <i>Ztcyp53</i> in Abhängigkeit des Substrates Benzoesäure.....	66
<b>Abbildung 19:</b>	Untersuchung der Genregulation von <i>Ztcyp53</i> in Gegenwart von Nitrat und Glutamat .....	66
<b>Abbildung 20:</b>	<i>In vivo</i> Genexpressionsanalyse von <i>Ztcyp53</i> im Infektionsverlauf.....	67
<b>Abbildung 21:</b>	Einfluss von p-Hydroxybenzoesäure auf die Genexpression Pathogen-assoziiierter Proteine (PR-Proteine) in <i>Triticum aestivum</i> .....	68
<b>Abbildung 22:</b>	Metabolisierung von Salicylsäure durch <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	69
<b>Abbildung 23:</b>	Übersicht konservierter Proteindomänen der Polyketidsynthesen aus <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	72
<b>Abbildung 24:</b>	Genexpressionsanalyse der Polyketidsynthesen aus <i>Zymoseptoria tritici</i> während des Infektionsverlaufes in Weizen.....	74
<b>Abbildung 25:</b>	Expressionsprofil ausgewählter Polyketidsynthase-Gene aus <i>Zymoseptoria tritici</i> im Infektionsverlauf.....	74
<b>Abbildung 26:</b>	Vergleich der Pigmentierung von $\Delta Ztpks1$ und dem WT-Stamm.....	76
<b>Abbildung 27.A:</b>	Wachstumsvergleich von $\Delta Ztpks4$ und dem WT-Stamm auf verschiedenen Festmedien.....	76
<b>Abbildung 27.B:</b>	<i>In vitro</i> Keimungsassay zur Bestimmung der Keimungsrate von $\Delta Ztpks4$	76
<b>Abbildung 28.A:</b>	Pathogenitäts-Assay von $\Delta Ztpks1$ gegen Weizen.....	77
<b>Abbildung 28.B:</b>	Lichtmikroskopische Aufnahme der Pyknidien des WT-Stammes IPO323 und von $\Delta Ztpks1$ .....	77
<b>Abbildung 29:</b>	Hypothetisches Modell des Abbauweges pflanzlicher Phenolsäuren durch <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	95
<b>Abbildung 30:</b>	Southern Blot Analyse zur Bestätigung homologer Rekombinationsergebnisse im Genom der generierten Mutanten.....	138-140

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Standardgradient zur Analyse von Rohextrakten an der Agilent 1100 Series Anlage.....	41
<b>Tabelle 2:</b>	Standardgradient zur Analyse von Phenolsäuren an der analytischen HPLC der Agilent 1100 Series Anlage [A].....	42
<b>Tabelle 3:</b>	Standardgradient zur Analyse von Phenolsäuren an der analytischen HPLC der Shimadzu Prominence Anlage [S].....	42
<b>Tabelle 4:</b>	Gradient der Flash-Chromatographie an Kieselgel.....	43
<b>Tabelle 5:</b>	Kandidatengene zur möglichen Aktivierung stiller Gencluster in <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	48
<b>Tabelle 6:</b>	Polyketidsynthasen in <i>Zymoseptoria tritici</i> .....	71
<b>Tabelle 7:</b>	Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Inaktivierungsvektoren nach der <i>gene disruption</i> Methode.....	132
<b>Tabelle 8:</b>	Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Inaktivierungsvektoren mit dem Gibson-Assembly.....	133
<b>Tabelle 9:</b>	Oligonukleotid-Primer für die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für den Southern Blot.....	134
<b>Tabelle 10:</b>	Oligonukleotid-Primer für die Genexpressionsanalyse in <i>Z. tritici</i> .....	135

## 1. Einleitung

### 1.1 *Zymoseptoria tritici* als Schädling im Weizenanbau

Der phytopathogene Ascomycet *Zymoseptoria tritici* (früher *Septoria tritici*, Teleomorph *Mycosphaerella graminicola*) gehört zur Klasse der Dothideomyceten und ist einer der ökonomisch bedeutendsten Schädlinge im Weizenanbau (Palmer und Skinner, 2002; Ponomarenko *et al.*, 2011; Quaedvlieg *et al.*, 2011). Er ist der Erreger der *Septoria* Blattdürre (engl. *Septoria tritici blotch*, STB) von Weizen (*Triticum aestivum* L.) und ist in humiden Gebieten mit gemäßigter Klimazone weltweit verbreitet (Jones und Cooke, 1969; Eyal und Levy, 1987; Mehrabi *et al.*, 2006).

In Deutschland zählt die *Septoria* Blattdürre, neben Mehltau (verursacht durch *Erysiphe graminis*), der Kopf- und Knollenfäule (*Fusarium graminearum*) sowie dem Gelb- und Braunrost (*Puccinia striiformis* bzw. *recondita*), zu den wichtigsten Pilzkrankheiten im Weizenanbau (Dean *et al.*, 2012; Volk, 2015). Der Befall mit STB kann zu jährlichen Ernteverlusten von 35 bis 50 % der Gesamternte führen. Der dadurch verursachte wirtschaftliche Schaden wird in Europa auf ca. 400 Mio. US-Dollar / Jahr und in den USA auf 275 Mio. US-Dollar / Jahr geschätzt (Ponomarenko *et al.*, 2011).

In Europa ist Weizen das am häufigsten angebaute Getreide und deckt etwa 20 % des Gesamtkalorien- und 25 % des Gesamtproteinbedarfs der Bevölkerung (Fones und Gurr, 2015). Prognosen der Vereinten Nationen sagten im Juli 2015 einen zukünftigen Anstieg der Weltbevölkerung auf 9,7 Mrd. Menschen bis zum Jahr 2050 und auf über 11 Mrd. Menschen bis zum Jahr 2100 voraus (UN, 2015). Die wachsende Weltbevölkerungszahl wird veränderte Anforderungen an die Menschheit zur Folge haben. So muss neben der drastisch steigenden Nachfrage nach Lebensmitteln auch neuer Lebensraum erschlossen werden, wodurch wiederum die pro Kopf nutzbare landwirtschaftliche Fläche verringert wird (FAO, 2015).

Um die Ernährungssicherung dennoch zu gewährleisten ist eine effizientere und nachhaltigere Nutzung vorhandener Ressourcen zwingend notwendig. Dazu müssen, neben der Etablierung verbesserter Anbaumethoden, die Ernte- und Qualitätsverluste minimiert und dadurch die Erträge gesteigert werden.

Neben abiotischen Faktoren wie Dürre, Extremtemperaturen und Unwetter sind Ernteverluste ebenso auf biotische Faktoren, wie phytopathogene Organismen, zurückzuführen (Oerke, 2006). Diese verursachen weltweit Ernteaufgänge von bis zu 40 % (FAO, 2015). Neben Bakterien, Insekten und Viren sind phytopathogene Pilze die zahlenmäßig meisten und ökonomisch bedeutendsten Schädlinge für viele Kulturpflanzen (Prescott *et al.*, 1986). Bekannte Vertreter sind neben *Z. tritici* bei Weizen, *Ustilago maydis* bei Mais sowie *Magnaporthe oryzae* bei Reis (Dean *et al.*, 2012).

Die weltweite Verbreitung von *Z. tritici* und die damit verbundenen Ernteverluste bei der Kultivierung von Weizen sind schon seit den frühen 1980er Jahren bekannt und Gegenstand intensiver Forschung (Eyal *et al.*, 1987; Mehrabi *et al.*, 2006).

Da die Ernteerträge STB-resistenter Weizensorten im Vergleich zu den fungizid-behandelten, anfälligen Kultursorten drastisch reduziert sind, bleibt die intensive Applikation von Fungiziden die bislang einzige Möglichkeit, um den immensen Ernteverlusten durch die *Septoria* Blattdürre entgegenzuwirken (Palmer und Skinner, 2002). Im Jahr 2014 wurden in Europa ca. 1,3 Milliarden US-Dollar für chemische Mittel zur Bekämpfung von Weizenpathogenen investiert, wobei 70 % davon allein zur Bekämpfung von *Z. tritici* aufgewendet wurden (Fones und Gurr, 2015; Torriani *et al.*, 2015).

Durch die hohen sexuellen Reproduktionsraten und der dadurch auftretenden großen genetischen Variabilität, kommt es bei der Anwendung antifungischer Agenzien vermehrt zu einer Resistenzbildung des Pilzes. Gegen alle bislang eingesetzten Fungizidgruppen wurden mittlerweile resistente *Z. tritici* Isolate gefunden, was ein anwachsend großes Problem bei der Bekämpfung der STB darstellt (Palmer und Skinner, 2002). Ein Beispiel für diese Entwicklung ist die Wirkstoffgruppe der Strobilurine, die bei der Bekämpfung von *Z. tritici* zunehmend an Bedeutung verliert (Morzfeld *et al.*, 2004).

Aktuell ist die Kombination aus Azolen und Succinatdehydrogenase-Inhibitoren die effektivste Methode um die verheerenden Auswirkungen der STB einzudämmen und die Ernteverluste zu reduzieren (Torriani *et al.*, 2015).

Aufgrund der begrenzten Effektivität der heute gegen *Z. tritici* eingesetzten Fungizide, aber auch aufgrund der Entwicklung neuer Resistenzmechanismen durch den Schädling, wird intensiv an der Entdeckung neuartiger, antifungischer Mittel geforscht.

Große Konzerne wie BASF Crop Protection, Bayer CropScience oder Syngenta arbeiten mit hoch technologisierten Verfahren daran, neue Fungizide gegen *Z. tritici* zu entwickeln (Torriani *et al.*, 2015).

Zudem ist die Aufklärung der molekularen und physiologischen Infektionsmechanismen von *Z. tritici* das Ziel vieler Forschungsvorhaben. Dabei ist es vorrangig, die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt auf molekularer Ebene zu verstehen (Rudd *et al.*, 2015). Mit dem Verständnis dieser Mechanismen können spezifischere, effizientere und umweltfreundlichere Fungizide entwickelt und die bisher eingesetzten Wirkstoffe ergänzt oder ersetzt werden (Bebber und Gurr, 2015).

### **1.2 Der Modellorganismus *Zymoseptoria tritici***

Im letzten Jahrzehnt entwickelte sich *Z. tritici* zum Modellorganismus zur Erforschung hemibiotropher Pilze (Shetty *et al.*, 2007). Grundlage dafür lieferte die im Jahr 2006 vom Joint Genome Institute veröffentlichte Genom-Sequenzierung vom *Z. tritici* Wildtypstamm IPO323. Im Jahr 2008 wurde die zweite Annotation der Gene und anschließend im Jahr 2011 die vollständige Genom-Sequenz veröffentlicht (Kema *et al.*, 2008; Goodwin *et al.*, 2011). Das Genom, mit einer Gesamtgröße von 39,7 Mb, unterteilt sich in ein 13 Chromosomen umfassendes Kerngenom sowie ein aus acht Chromosomen bestehendes Dispensom. Letzteres ist für das Überleben des Pilzes nicht zwingend erforderlich und kann während der sexuellen Reproduktion verloren gehen (Goodwin *et al.*, 2011). Aufgrund der Verfügbarkeit der Genomsequenz, in Kombination mit dem etablierten *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Transformationssystem, ist die genetische Manipulation von *Z. tritici* realisierbar (Zwiers und De Waard, 2001).

*Z. tritici* ist fakultativ pathogen, wodurch eine Kultivierbarkeit auf artifiziellen Medien möglich ist. Dies ermöglicht umfangreiche Untersuchungen des Pilzes auf molekularer und physiologischer Ebene unter Laborbedingungen.

### **1.3 Der Infektionsmechanismus von *Zymoseptoria tritici***

Der Infektionsprozess beginnt mit dem Landen von *Z. tritici* Sporen auf der Blattoberfläche der Wirtspflanze. Eine Primärinfektion erfolgt meist durch luftübertragene Ascosporen, die sich durch Wind über große Entfernungen verbreiten können. Eine Infektion kann auch durch Pyknidiosporen erfolgen, jedoch nur von infizierten Nachbarpflanzen durch direkten Blattkontakt oder der Übertragung durch Regen. Bei hoher Luftfeuchtigkeit keimen die Sporen auf der Blattoberfläche aus und die Hyphen dringen innerhalb von 24 - 48 Stunden in das Blattgewebe ein. Im Gegensatz zu anderen phytopathogenen Ascomyceten bildet *Z. tritici* keine spezialisierten Infektionsstrukturen (wie

bspw. Appressorien bei *M. oryzae*) aus. Der Schädling gelangt durch die Stomata, den natürlichen Öffnungen auf der Blattoberfläche, in die Wirtspflanze hinein. Unabdingbar für das Eindringen und somit für die Kolonisierung der Wirtspflanze ist in *Z. tritici* die dimorphe Transition (engl.: *dimorphic switch*). Der Dimorphismus beschreibt bei Pilzen einen Prozess, bei dem als physiologische Antwort auf äußere Faktoren, wie z.B. Temperatur oder Nährstoffmangel, ein Übergang von einer einzelligen, hefeartigen Wachstumsform zu einem mehrzelligen, filamentösen Hyphenwachstum stattfindet. Der Wechsel zwischen den morphologisch unterschiedlichen Wachstumsformen wird als dimorphe Transition bezeichnet (Nadal *et al.*, 2008). In Laborversuchen kann der Übergang von der hefeartigen zu einer myzelartigen Wachstumsform in *Z. tritici* durch Nährstoffmangel, insbesondere Stickstoffmangel, induziert werden (Kema *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 2005; Mehrabi *et al.*, 2006). Auf stickstoffhaltigen Vollmedien vermehrt sich der Pilz hefeartig, in Form der blastischen Konidiogenese asexueller Pyknidiosporen. Aus den Pyknidiosporen können sich dann Keimschläuche mit polarem Spitzenwachstum bilden, wodurch es zum Übergang in die infektiöse, filamentöse Wachstumsform kommt (Mehrabi und Kema, 2006).

Während des gesamten invasiven Wachstums kolonisiert der Pilz das Mesophyllgewebe der Pflanze ausschließlich interzellulär und durchläuft den gesamten Reproduktionszyklus im Apoplasten, ohne in die Wirtszellen einzudringen (Cohen und Eyal, 1993; Palmer und Skinner, 2002; Ponomarenko *et al.*, 2011; Dean *et al.*, 2012).

### **1.3.1 Die symptomlose Phase der Infektion**

Nach dem Eindringen des Schädling in das Blattgewebe durch die Stomata, folgt zunächst eine latente Phase der Infektion, in der äußerlich keine Symptome auf der Wirtspflanze erkennbar sind. Häufig wird diese Anfangsphase als „biotrophe“ Phase bezeichnet und *Z. tritici* folglich als hemibiotropher Pilz klassifiziert. Diese Einordnung wurde besonders in den letzten Jahren von vielen Forschern hinterfragt, da sich die latente Anfangsphase der Infektion von einer klassischen Biotrophie unterscheidet. Biotrophe Pathogene ernähren sich von lebenden Zellen und sind auf einen lebendigen Wirt angewiesen (Laluk und Mengiste, 2010). Im Gegensatz dazu wurde gezeigt, dass *Z. tritici* kaum Nährstoffe aus dem Apoplasten der Pflanze aufnimmt und in dieser Phase keine messbare Zunahme der pilzlichen Biomasse stattfindet. Vermutlich werden zu diesem Zeitpunkt der Infektion Lipidspeicher aus den Sporen als Energiequelle genutzt (Keon *et al.*, 2007; Palmer und Skinner, 2002; Orton *et al.*, 2011). Die Lebensweise von

*Z. tritici* ähnelt laut einigen Wissenschaftlern in der symptomlosen Phase eher der von Endophyten, als der von Biotrophen (Solomon und Oliver, 2001; Thomma *et al.*, 2005; Keon *et al.*, 2007; Rudd *et al.*, 2015). Von Orton *et al.* (2011) wurde *Z. tritici* als Nekrotroph, mit einer außergewöhnlich langen latenten bzw. endophytischen Lebensphase klassifiziert. Die Bezeichnung hemibiotroph wird jedoch weiterhin noch häufig verwendet.

Warum der Infektionszyklus von *Z. tritici* eine solch ungewöhnlich lange Latenzperiode beinhaltet konnte noch nicht aufgeklärt werden. Es wurde lange Zeit vermutet, dass *Z. tritici* in der symptomlosen Phase mit dem Immunsystem der Weizenpflanze interagiert, um die Immunantwort der Pflanze abzuschwächen (Rudd *et al.*, 2015). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das von *Z. tritici* sekretierte Effektorprotein Mg3LysM eine bedeutende Rolle in dieser Phase der Infektion spielt. Mg3LysM bindet an das pilzliche Chitin und verhindert somit dessen Erkennung durch die Chitinrezeptoren TaCEPiP und TaCERK1 der Weizenpflanzen (Marshall *et al.*, 2011). Chitin gilt als *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), ein Strukturmotiv, das als Erkennungsmerkmal für das pflanzliche Immunsystem dient, um eindringende Pilze zu erkennen und die basale Immunantwort auszulösen. Die Expression von Mg3LysM wird in der Anfangsphase der Infektion (Tag 1 - 4) signifikant hochreguliert und verhindert somit die Erkennung von *Z. tritici* durch die Weizenpflanze und das darauffolgende Einleiten einer Immunantwort (Marshall *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2014; Rudd, 2015).

Rudd *et al.* (2015) untersuchten das Transkriptom von *Z. tritici* zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion und konnten zeigen, dass im Infektionsverlauf ca. an den Tagen 9 - 14 eine Veränderung des Expressionsprofils stattfindet. Bei 50 % aller identifizierten Transkripte, deren Expression zu diesem Zeitpunkt signifikant hochreguliert war, handelte es sich um Proteine mit einer Signalsequenz für die Sekretion. Davon kodieren 13 Gene Proteine mit einem Cysteinanteil der größer als 5 % ist. Dieses Sequenzmerkmal ist typisch für apoplastische Effektorproteine aus Pilzen (De Wit *et al.*, 2009). Des Weiteren wurde gegen Ende der symptomlosen Phase die Expression mehrerer Gene des Sekundärmetabolismus und einiger Proteasen-kodierenden Gene signifikant hochreguliert (Rudd *et al.*, 2015). Rudd *et al.* schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass in der späten symptomlosen Phase eine Interaktion zwischen *Z. tritici* und der Wirtspflanze stattfindet, in welcher der Schädling, möglicherweise durch die Sekretion von

Effektorproteinen und Sekundärmetaboliten, das Immunsystem der Pflanze induziert und den pflanzlichen Zelltod einleitet.

Diese Annahme konnte von Ben M'Barek *et al.* (2015) durch die Entdeckung zweier putativer Nekrose-induzierender Proteinen aus *Z. tritici* (ZtNIP1p und ZtNIP2p) zum ersten Mal bestätigt werden. Besagte Proteine wurden aus Submerskulturen einer Fermentation mit dem *Z. tritici* Wildtyp (WT)-Stamm IPO323 isoliert und induzierten nach Injektion in intakte Weizenpflanzen deren Zelltod. Die Expression der korrespondierenden Gene wurde *in planta* in der späten symptomlosen Phase hochreguliert und in der nekrotrophen Phase wieder herunterreguliert. Die genaue Wirkweise der NIPs ist noch ungeklärt, deren Existenz gibt jedoch einen ersten Hinweis auf die Wechselwirkung zwischen Effektoren aus *Z. tritici* und dem Wirt-Zelltod (Ben M'Barek *et al.*, 2015; Kettles und Kanyuka, 2016).

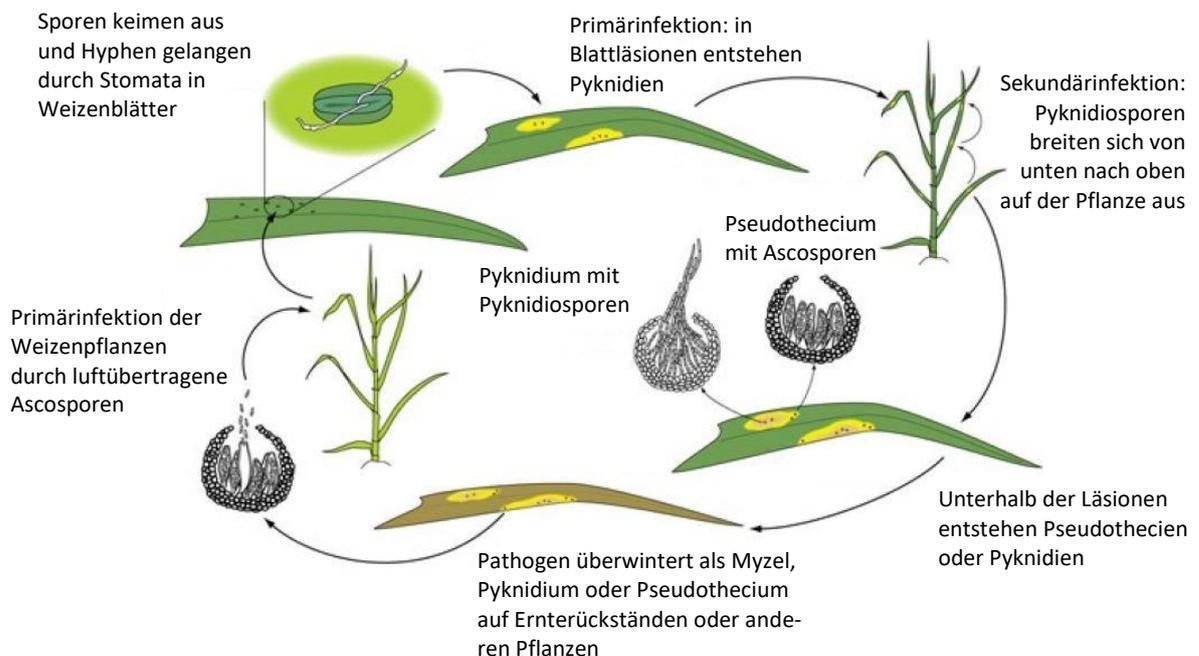
### **1.3.2 Die nekrotrophe Phase der Infektion**

Nach bis zu vier Wochen, jedoch in der Regel nach 14 - 21 Tagen, kollabieren die Mesophyllzellen in den Weizenblättern und es werden chlorotische Läsionen auf der Blattoberfläche sichtbar. Die chlorotischen Läsionen gehen im Laufe der Zeit in Nekrosen über, die durch das Absterben der Mesophyllzellen zustande kommen (Palmer und Skinner, 2002; Orton *et al.*, 2011). Diese Form des Zellsterbens ist vergleichbar mit dem pflanzlichen, programmierten Zelltod (*programmed cell death*, PCD), der in Folge der hypersensitiven Reaktion beobachtet wird (Keon *et al.*, 2007). Die hypersensitive Reaktion gehört zur Immunantwort von Pflanzen und ist eine besondere Form des programmierten Zelltods. Nach der Erkennung eines Pathogens durch die Wirtspflanze erfolgt zuerst der sog. *oxidative burst*, eine massive Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) um die Infektionsstelle. Im Anschluss folgt das Einleiten der pflanzlichen Apoptose. Dadurch soll dem Pathogen die Möglichkeit der Ausbreitung sowie die Nährstoffquelle genommen und die Infektion eingedämmt werden (Morel und Dangl, 1997). Untersuchungen deuten darauf hin, dass in Weizen neun bis zehn Tage nach Infektion durch *Z. tritici* die Expression verschiedener Gene, welche an der Biosynthese des Signalmoleküls Jasmonsäure beteiligt sind, hochreguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass diese Änderung im Expressionsprofil mit der Anwesenheit von *Z. tritici* assoziiert ist. Jasmonsäure ist ein Phytohormon, welches neben Salicylsäure als *Elicitor* dient und Abwehrmechanismen, wie z.B. die Synthese von Phytoalexinen und

antimikrobiellen Phenolsäuren, oder die Produktion von ROS (insbesondere Wasserstoffperoxid) auslösen kann (Rudd *et al.*, 2015).

Vermutlich wird in dieser Phase der Infektion, im Gegensatz zur symptomlosen Phase, das pflanzliche Immunsystem sehr stark aktiviert, was möglicherweise die hypersensitive Reaktion und den PCD herbeiführt (Enyedi *et al.*, 1992; Rudd, 2015). Dafür sprechen besonders die in dieser Phase massiv gesteigerte Akkumulation von Wasserstoffperoxid in der Weizenpflanze und das Auftreten von Nekrosen, was typische Symptome der hypersensitiven Reaktion sind (Shetty *et al.*, 2007).

In der nekrotrophen Phase der Infektion ernährt sich *Z. tritici* von den Nährstoffen, die aufgrund abnehmender Membranstabilität aus den toten Mesophyllzellen in den Apoplasten ausströmen. In dieser Phase kann eine massive Zunahme der Biomasse von *Z. tritici* gemessen werden. Innerhalb der Läsionen werden auf der Blattaußenseite Pyknidien unterhalb der Stomata sichtbar, aus denen Pyknidiosporen in die Umgebung freigesetzt werden und weitere Blätter infizieren können. Im sexuellen Reproduktionszyklus bilden sich in den substomatären Räumen Pseudothecien anstelle der Pyknidien, welche die Ascosporen enthalten (Kema *et al.*, 1996; Keon *et al.*, 2007; Orton *et al.*, 2011). Der Infektionszyklus von *Z. tritici* ist zusammenfassend in Abbildung 1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Der Infektionszyklus von *Zymoseptoria tritici*.** Verändert nach Ponomarenko *et al.*, 2011.

Eine Vielzahl nekrotropher Phytopathogene sezerniert Toxine, um den Zelltod der Wirtspflanze auszulösen und sich im Anschluss von den abgestorbenen Zellen zu ernähren (Möbius und Hertweck, 2009). Da *Z. tritici* außerhalb der Wirtszellen im Apoplasten lokalisiert ist und nicht in die Zelle eindringt, wird vermutet, dass der Pilz mit Hilfe von Phytotoxinen und Effektorproteinen, die in die Zelle diffundieren können, die Apoptose der Wirtszellen auslösen kann. Aus *Z. tritici* konnte bislang jedoch kein Sekundärmetabolit, der in einem Zusammenhang mit dem Zelltod der Wirtspflanze steht, isoliert und charakterisiert werden (Kema *et al.*, 1996; Rudd *et al.*, 2015).

Sehr viele Aspekte der Infektionsbiologie von *Z. tritici* konnten im Detail bis heute nicht aufgeklärt werden. Fragestellungen bezüglich der langen Anfangsphase, in der *Z. tritici* vom Wirt unentdeckt bleibt, den molekularen Interaktionen zwischen dem Pathogen und dem Wirt, dem Auslöser des Übergangs in die nekrotrophe Phase, der Induktion des pflanzlichen Zelltods und welche Rolle dabei pilzliche Effektoren und Toxine spielen, müssen nach wie vor experimentell adressiert werden, um einen Aufschluss über den genauen Infektionsvorgang zu geben (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).

#### **1.4 Der Sekundärmetabolismus filamentöser Pilze**

Die Fähigkeit der Sekundärmetaboliten-Produktion verschiedener Organismen entwickelte sich vermutlich innerhalb der letzten hundert Millionen Jahre. Sie dient unter anderem der Verteidigung des Habitats gegen konkurrierende Mikroorganismen und zum Schutz vor Umwelteinflüssen oder der Steuerung biologischer Funktionen. Sekundärmetabolite sind strukturell heterogene, niedermolekulare Verbindungen, welche im Gegensatz zu Primärmetaboliten nicht an unmittelbar lebenserhaltenden Stoffwechselprozessen beteiligt sind. Viele Bakterien, Pilze und Pflanzen sind in der Lage eine große Vielfalt höchst diverser Sekundärmetaboliten zu synthetisieren. Diese Stoffe werden nur unter bestimmten Bedingungen, z.B. in Ruhephasen, Stresssituationen oder während der Reproduktion gebildet und können vielseitige Funktionen haben (Brakhage, 2013).

Für die Virulenz phytopathogener Pilze können Toxine eine wichtige Bedeutung haben und sind häufig unabdingbar. Ein einziges Toxin kann mehrere oder sogar alle mit der Krankheit assoziierten Symptome in einer Wirtspflanze auslösen (Möbius und Hertweck, 2009).

Anhand der Biosynthesewege und basierend auf ihren Vorläufermolekülen aus dem Primärstoffwechsel lassen sich pilzliche Sekundärmetabolite in vier Kategorien

einteilen. Die vier großen chemischen Gruppen umfassen Polyketide (PK), nichtribosomale Peptide (engl.: *non-ribosomal peptides*, NRP), Isoprenoide und Alkaloide. Die meisten sekundären Stoffe gehören entweder zu den PK oder den NRP, wobei sich beide Gruppen durch eine große Variabilität bezüglich der chemischen Struktur und bioaktiven Eigenschaften auszeichnen. Zusätzlich gibt es noch Sekundärmetabolite, bei denen es sich um PK-NRP-Hybride handelt. Mykotoxine wie Aflatoxin B1, Fusarin C oder das cholesterinsenkende Lovastatin sind nur einige Vertreter der überaus heterogenen Gruppe der PK. Zu den NRP gehören unter anderem die Antibiotika Penicillin und Cephalosporin sowie das Immunsuppressivum Cyclosporin A (Keller *et al.*, 2005; Hoffmeister und Keller, 2007; Brakhage, 2013).

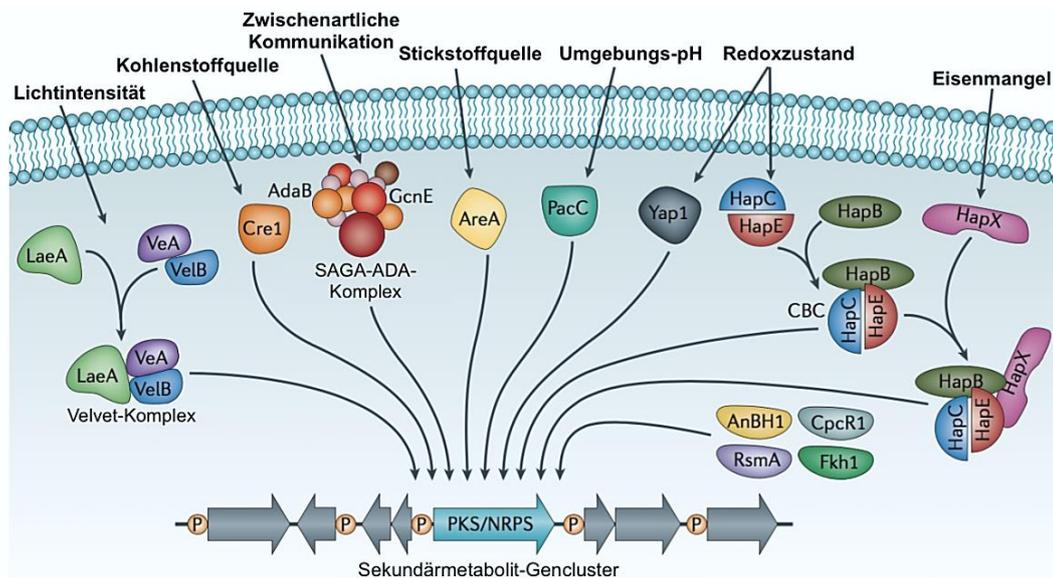
#### **1.4.1 Die Biosynthese von Sekundärmetaboliten**

Die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligten Gene sind in Pilzen häufig in Genclustern angeordnet, welche eine Größe von bis zu 10 000 bp umfassen können (Smith *et al.*, 1990; Trail *et al.*, 1995). In der Regel beinhalten diese Cluster ein oder mehrere zentrale Biosynthesegene, welche sehr große, multifunktionale Enzyme mit mehreren Domänen kodieren. Diese zentralen Enzyme werden den Klassen der Polyketidsynthasen (PKS) oder nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) zugeordnet. Zudem können in den Clustern regulatorische Proteine wie Transkriptionsfaktoren (TF), aber auch weitere Enzyme für die Modifikation der Sekundärmetabolite, wie z.B. Reduktasen, Oxidasen oder auch Transporter enthalten sein (Hertweck, 2009). Obwohl PK und NRP grundverschieden sind, konnte gezeigt werden, dass die Biosynthesemaschinerien (PKS und NRPS) sehr ähnlich aufgebaut sind und nach einem verwandten Prinzip arbeiten. Beide Enzymkomplexe bestehen aus Modulen, wobei immer mindestens drei Domänen ein Modul bilden. Jedes Modul besitzt zwei Domänen mit katalytischer Aktivität und eine Carrier-Domäne. Bausteine aus dem Primärmetabolismus, wie Acetyl-CoA bei PK oder Aminosäuren bei NRP, dienen als Ausgangsmoleküle für die Sekundärmetabolit-Synthese. Diese werden in aufeinanderfolgenden Kondensationsreaktionen an den einzelnen Domänen eines oder mehrerer Module Schritt für Schritt zum fertigen Sekundärmetabolit assembliert (Cane und Walsh, 1999; Fischbach und Walsh, 2006).

### 1.4.2 Die Regulation des Sekundärmetabolismus

Der pilzliche Sekundärmetabolismus unterliegt einem komplexen Geflecht an Regulationsnetzwerken. Die Aktivierung der Expression dieser Gencluster kann auf transkriptioneller Ebene oder epigenetisch erfolgen, wobei manche Cluster sehr spezifisch und andere auf globaler Ebene reguliert werden (Keller *et al.*, 2005). Anhand der heute zugänglichen bioinformatischen Daten geht man davon aus, dass knapp die Hälfte aller Sekundärmetaboliten-Gencluster eigene regulatorische Gene beinhalten, die sehr spezifisch die Expression der im Cluster vorhandenen Biosynthesegene aktivieren oder auch reprimieren können. Cluster ohne eigene TF werden meist von globalen Regulatoren, welche durch äußere Stimuli, wie z.B. Lichtintensität, Nährstoffangebot, pH-Wert oder Temperatur (Abbildung 2) beeinflusst werden, aktiviert oder reprimiert. Diese regulatorischen Proteine sind meist TF, welche der Zelle die Anpassung an sich ändernde Wachstumsbedingungen ermöglichen (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso und Peñalva, 1996; Bergh und Brakhage, 1998).

Auf Chromatinebene erfolgt die Regulierung der Sekundärmetaboliten-Gencluster durch die Veränderung der Histonacetylierungs- bzw. -methylierungsmuster (Shwab *et al.*, 2007; Nützmann *et al.*, 2011; Brosch *et al.*, 2008; Strahl und Allis, 2000; Bannister und Kouzarides, 2005).



**Abbildung 2: Globale Regulatoren pilzlicher Sekundärmetaboliten-Cluster.** Die Regulatoren werden durch äußere Stimuli wie pH, Lichtintensität oder Nährstoffangebot beeinflusst und ermöglichen der Zelle eine Anpassung an wechselnde Wachstumsbedingungen. Zusätzlich sind sie an der Regulation der Transkription von Sekundärmetaboliten-Genclustern beteiligt und können die Biosynthese positiv oder negativ beeinflussen (nach Brakhage, 2013).

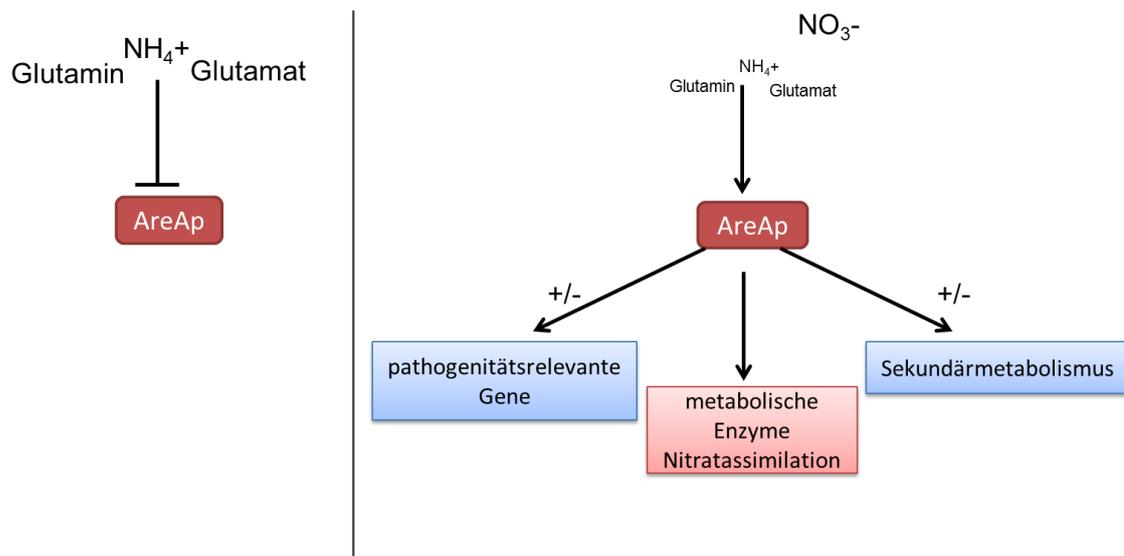
#### 1.4.2.1 Der globale Regulator AreAp

Ein auf globaler Ebene wirkendes, regulatorisches Protein, auf das in dieser Arbeit ein besonderer Fokus liegt, ist der Transkriptionsfaktor AreAp. Das Protein gehört zur Familie der GATA-TF und ist der Mediator der Stickstoff-Metabolitenrepression (*nitrogen metabolite repression*, NMR). Diese in Ascomyceten stark konservierten TF besitzen eine Cys<sub>2</sub>-Cys<sub>2</sub>-Zinkfingerdomäne und binden an GATA-Sequenzen im Promotor der von ihnen regulierten Gene (Fu und Marzluf, 1990). Zum ersten Mal wurde AreAp im Jahre 1973 in *Aspergillus nidulans* untersucht und von Arst und Cove beschrieben (Arst und Cove, 1973). Orthologe zu AreAp wurden seitdem in vielen anderen Ascomyceten identifiziert und charakterisiert, z.B. Nit-2p in *Neurospora crassa* (Fu und Marzluf, 1987) und GLN3p in *Saccharomyces cerevisiae* (Minehart und Magasanik, 1991).

Die Metabolitenrepression ist ein Mechanismus zur Genregulation und dient der Hemmung der *de novo* Synthese bestimmter Enzyme einer Zelle, so lange ein energetisch günstigeres Substrat eines alternativen Stoffwechselweges in signifikanter Menge vorhanden ist. Im Falle von AreAp handelt es sich um die vorhandene Stickstoffquelle (N-Quelle). Die meisten Organismen bevorzugen für den Aufbau von Biomasse reduzierte Stickstoffverbindungen wie Ammonium oder Glutamat. Ist keines dieser Substrate vorhanden, können viele andere stickstoffhaltigen Moleküle wie Nitrate, Amine, Amide oder auch Purine und Pyrimidine für das Wachstum der Zelle verwendet werden. Der Abbau dieser weniger assimilierten Stickstoffverbindungen erfordert die Synthese von metabolischen Enzymen wie Nitrat- und Nitritreduktasen. Die Genexpression dieser Enzyme wird von AreAp positiv reguliert (Kudla *et al.*, 1990; Marzluf, 1993).

Nährstoffmangel, vor allem Stickstoffmangel, spielt für die Virulenz vieler Pflanzenpathogene eine Schlüsselrolle bei der transkriptionellen Aktivierung pathogenitätsrelevanter Gene. Es wird angenommen, dass Phytopathogene zu Beginn ihres Infektionsprozesses stickstofflimitierenden Bedingungen ausgesetzt sind. Vermutlich bildet Stickstoffmangel eines der Signale, die an der Regulierung von *in planta* induzierten Genen beteiligt sind (Coleman *et al.*, 1997; Snoeijers und Alejandro, 2000; Pellier *et al.*, 2003). Da AreAp ein global agierender TF ist, unter dessen Kontrolle die Expression zahlreicher Gene unter stickstofflimitierenden Bedingungen (ähnlich den Bedingungen *in planta*) steht, wurde das Protein in einigen pflanzenpathogenen Pilzen in Bezug auf seine Rolle bei der Transkriptionsregulation pathogenitätsrelevanter Gene untersucht.

Bei einigen phytopathogenen Ascomyceten, wie z.B. dem Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* (Pérez-García *et al.*, 2001) konnte eine für die Pathogenität essentielle Rolle von AreAp bestätigt werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der globale Regulator AreAp in Verbindung mit der positiven, aber auch negativen Regulation zahlreicher Gene aus dem Sekundärmetabolismus, z.B. der Biosynthesegene von Aflatoxin in *A. nidulans* steht (zusammengefasst in Tudzynski, 2014). Die Funktion von AreAp in Ascomyceten ist in Abbildung 3 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion von AreAp in Ascomyceten.** Steht eine der bevorzugten Stickstoffquellen Ammonium, Glutamin oder Glutamat in signifikanter Menge zur Verfügung, so wird die *areA*-Genexpression inhibiert. Ist keine dieser primären N-Quellen verfügbar, wird die Expression von *areA* induziert. Nachfolgend transloziert AreAp in den Zellkern und induziert dort wiederum die Expression zahlreicher Gene, wie z.B. die Gene für die Nitratassimilation. Zudem ist AreAp in einigen Ascomyceten an der Regulation von pathogenitätsrelevanten Genen und des Sekundärmetabolismus beteiligt (nach Kudla *et al.*, 1990; Marzluf, 1993, Pellier *et al.*, 2003; Tudzynski, 2014).

### 1.4.3 Die Aktivierung stiller Sekundärmetaboliten-Gencluster

Unter Laborbedingungen werden die für die Sekundärmetaboliten-Biosynthese kodierenden Gencluster meist nicht exprimiert. Dies hat zur Folge, dass der Forschung eine Vielzahl von Metaboliten verwehrt bleibt. Aus der Literatur sind einige Methoden bekannt, mit denen es bereits gelang, solche stillen Cluster zu aktivieren und neue Sekundärmetabolite zu identifizieren und zu charakterisieren (Brakhage, 2013).

Ein Ansatz ist z.B. die Inaktivierung verschiedener Histondeacetylasen (HDAC). Diese Methode führte bei *A. nidulans* zur Aktivierung der Sterigmatocystin-Biosynthese (Shwab *et al.*, 2007). Einen ähnlichen Effekt kann man durch die Zugabe von chemischen Agenzien erzielen, welche die Chromatinstruktur modellieren können.

In *Cladosporium cladosporioides* konnte durch die Zugabe des HDAC-Inhibitors Vorinostat der Proteinkinase C-Inhibitor Calphostin B entdeckt werden (Williams *et al.*, 2008). Die Zugabe des DNA-Methyltransferase (DMAT)-Inhibitors 5-Azacytidin aktivierte die Produktion von bislang unbekanntem Oxylipinen sowie von Nygerone A in *A. niger* (Henrikson *et al.*, 2009).

Des Weiteren kann durch die Inaktivierung von Biosynthesegenen oder deren Regulatoren das Metabolitenspektrum verändert werden. Durch nachfolgende Analysen der produzierten Substanzen mittels HPLC oder HPLC-MS können im Vergleich zum WT, bei den Mutanten fehlende oder (im Falle von inaktivierten Repressor-Genen) zusätzliche Verbindungen auffallen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die Expression der Cluster unter den gewählten Laborbedingungen eventuell nicht aktiviert ist. In diesem Fall wird kein Unterschied in den Metaboliten-Spektren des WT-Stammes und der Mutante zu sehen sein (Brakhage und Schroeckh, 2011).

Durch Variation der Kultivierungsbedingungen wie pH-Wert, Nährstoffangebot etc., aber vor allem unter Stressbedingungen, wie beispielsweise Salzstress oder Nährstoffmangel, kann es durch die Anpassungsmechanismen der Zellen durch globale Regulatoren zur Aktivierung, aber auch Repression der Expression von Biosyntheseclustern kommen (Brakhage, 2013).

### **1.5 Ziele der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit war die Erforschung molekularer Mechanismen der Interaktion zwischen *Zymoseptoria tritici* und dessen Wirt, der Weizenpflanze. Viele Details dieser Interaktion sind bislang unbekannt (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).

Der Sekundärmetabolismus von *Z. tritici* sollte untersucht werden, um Metaboliten zu identifizieren, welche eine essentielle Rolle in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt spielen. Für die Virulenz phytopathogener Pilze können Phytotoxine eine wichtige Bedeutung haben und sind häufig unabdingbar. Es wird vermutet, dass *Z. tritici* in der Lage ist, eine Reihe von Phytotoxinen zu synthetisieren, welche an der Initiation der pflanzlichen Apoptose beteiligt sein könnten. Bislang konnte jedoch kein solches Toxin identifiziert werden (Rudd *et al.*, 2015).

Aus diesem Grund wurden verschiedene der in Kapitel 1.4.3 beschriebenen literaturbekannten methodischen Ansätze gewählt, um stille Gencluster in *Z. tritici* zu aktivieren.

Des Weiteren sollte das Expressionsprofil von zehn aus *Z. tritici* bekannten Polyketid-synthase-Genen *in vivo* im Infektionsverlauf analysiert werden, um potentiell pathogenitätsrelevante Polyketide zu identifizieren. Deren Rolle für den Infektionsverlauf sollte mittels Inaktivierung der kodierenden Gene und nachfolgender Analyse der generierten Mutanten hinsichtlich der Pathogenität erfolgen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Medienbestandteile

##### Lösungsmittel

Acetonitril (*p.a.*), Dichlormethan, Ethylacetat, Isopropanol (*p.a.*) und Methanol (*p.a.*), von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Dimethylsulfoxid (DMSO) von Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe.

##### Säuren und Laugen

Ameisensäure, *p.a.* (98-100 %; AppliChem GmbH, Darmstadt), Essigsäure, *p.a.* (100 %; VWR International GmbH, Darmstadt), HCl, *p.a.* (32%; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), NaOH (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe).

##### Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz, Tetracyclinhydrochlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Cefotaxim-Natrium (Dr. Friedrich Eberth Arzneimittel GmbH), Glufosinatammonium (Basta®; Bayer CropScience Deutschland GmbH Langenfeld), Hygromycin B (InvivoGen, San Diego, USA), Kanamycinsulfat (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe), Rifampicin, Streptomycinsulfat (AppliChem GmbH, Darmstadt).

##### Medienbestandteile

Acetosyringon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Agarose (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf), Bacto™ Agar (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Bacto™ Pepton (Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg), Bacto™ Trypton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Bacto™ Yeast Extract (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Bio Weizenraspolver (Vivanutria by IQ-Trade AG, Kleinwangen), Biotin (Merck KGaA, Darmstadt), Difco™ Potato Dextrose Broth (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg), D(+)-Glucose Monohydrat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), Hefeextrakt Fermentation H (Leiber GmbH, Bramsche), Kaliumchlorat (Carl Roth GmbH &

Co., Karlsruhe), Maltose Monohydrat (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), MES Hydrate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Saccharose (Pfeifer & Langen GmbH & Co. KG, Köln), Tomatensaft (VitaFit Berghöler Fruchtsaft GmbH, Berghülen), Thiamindichlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim).

### 2.1.2 Lösungen und Puffer

Der pH-Wert der Lösungen wurde, falls nicht anders angegeben, mit 1 M HCl-Lösung oder 1 M NaOH-Lösung eingestellt.

#### Alkalische Lyse-Lösung 1 (SOL I) (Aufbewahrung 4°C)

2 M Glukose-Lösung 25 ml/L, 1M Tris-HCl-Lösung (pH 8) 25 ml/L, 0,5 M Na<sub>2</sub>EDTA-Lösung (pH 8) 20 ml/L.

#### Alkalische Lyse-Lösung 2 (SOL II) (Aufbewahrung RT)

10 M NaOH-Lösung 20 ml/L, 10 % SDS-Lösung 100 ml/L.

#### Alkalische Lyse-Lösung 3 (SOL III) (Aufbewahrung 4°C)

5 M Kaliumacetat-Lösung 600 ml/L, CH<sub>3</sub>COOH *p.a.* 115 ml/L.

#### Antikörper-Lösung

Anti-Digoxigenin-AP 1,5 µl/20 ml in Southern Blot Blocking-Puffer.

#### Denhardt's-Lösung (100x)

Ficoll® 400 20 g/L, PVP 20g/L, BSA Fraktion V 20 g/L.

#### K-Puffer

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

#### Maleinsäurepuffer (pH 7,5)

Maleinsäure 11,6 g/L, NaCl 8,8 g/L.

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH-Lösung eingestellt.

#### Mg<sup>2+</sup>-Lösung (2 M, pH 6,8)

MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 203 g/L, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 247 g/L.

#### MN-Puffer

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

Nitratsalz-Lösung (20x)

NaNO<sub>3</sub> 120 g/L, KCl 10,4 g/L, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 10,4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30,4 g/L.

Salzlösung ohne Nitrate (20x)

KCl 10,4 g/L, MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 10,4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 30,4 g/L.

Spurenelement-Lösung I / X-Trace (1000x, pH 6,5)

CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O 1,7 g/L, CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 1,6 g/L, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 5 g/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 11 g/L, MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O 5 g/L, Na<sub>2</sub>EDTA x 2 H<sub>2</sub>O 50 g/L, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 1,5 g/L, ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 22 g/L.

Spurenelement-Lösung II (1000x)

CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O 100 mg/L, FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 100 mg/L, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 100 mg/L, MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 100 mg/L, ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 100 mg/L.

Southern Blot Blocking-Puffer

Magermilchpulver in Maleinsäurepuffer 15 g/L.

Southern Blot Denaturierungspuffer

NaCl 46,75 g/L, NaOH 16 g/L.

Southern Blot Detektionspuffer

NaCl 5,8 g/L, Tris 12,1 g/L.

Southern Blot Hybridisierungspuffer

Denhardt's Lösung (100x) 50 ml/L, 10 % SDS-Lösung 50 ml/L, 20 x SSPE-Puffer 300 ml/L.

Southern Blot Neutralisationspuffer (pH 7,6)

NaCl 87,65 g/L, Tris 60,58 g/L.

Der pH-Wert wurde mit 32 % HCl *p.a.* eingestellt.

Southern Blot Waschpuffer

Tween® 20 in Maleinsäurepuffer 5 ml/L.

20 x SSPE-Puffer (pH 7,4)

NaCl 210,38 g/L, Na<sub>2</sub>EDTA x 2 H<sub>2</sub>O 7,45 g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O 27,6 g/L.

Der pH-Wert wurde mit 10 M NaOH eingestellt.

2 x SSPE-Puffer + 0,1 % SDS

10 % SDS-Lösung 10 ml/L, 20x SSPE-Puffer 100 ml/L.

### 0,2 x SSPE-Puffer + 0,1 % SDS

10 % SDS-Lösung 10 ml/L, 20x SSPE-Puffer 10 ml/L.

### TAE-Puffer (50x, pH 7,5)

EDTA 32,15 g/L, Tris 242,2 g/L.

Der pH-Wert wurde mit 100 % CH<sub>3</sub>COOH *p.a.* eingestellt.

### TE-Puffer (10x, pH 8,0)

Tris 12,1 g/L, EDTA 3,7 g/L.

### TE-RNase-Puffer

RNase (20 mg/ml) 40 µl in 20 ml 1x TE-Puffer.

## **2.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte**

### 2.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

Diabur-Test 5000 Glukosemessstreifen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), Nylonmembran Roti®-Nylon plus (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe), Röntgenfilm Amersham Hyperfilm™ (GE Healthcare Limited, München), Vermiculit 2-6 mm (Ethno-shop24 Vermiculitshop, Dortmund). Standard Verbrauchsmaterialien wie Plastikware, Pipettenspitzen, Filterpapiere, etc. werden nicht gesondert aufgeführt.

### 2.1.3.2 Zentrifugen und Laborschüttler

Für die Zentrifugationsschritte wurden die Tischzentrifugen 5415D (1,5 und 2 ml Gefäße, Rotor FA-45-24-11-Kit) bzw. 5810 R (15, 50 und 500 ml Gefäße, Rotor A-4-81) von der Eppendorf AG (Hamburg) verwendet.

Zur Inkubation von Erlenmeyerkolben für die Fermentation in Submerskulturen wurde der Tischschüttler Bühler SM30C (bis zu einem Volumen von 250 ml; Edmund Bühler GmbH, Hechingen) und der Orbital-Schüttler RC-406 (ab einem Volumen von 500 ml) von der Infors AG (Bottmingen, Schweiz) verwendet.

Für die Kultivierung bakterieller Übernachtskulturen im 5 ml-Maßstab wurde der temperierbare Inkubationsschüttler KS 3000 i control (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) genutzt.

### 2.1.4 Kulturmedien

Die angegebenen Medienbestandteile wurden in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  gelöst und für die Dauer von 20 Minuten bei einer Temperatur von 121 °C und einem Überdruck von 1 bar autoklaviert. Zur Herstellung von Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 2 % granulierter Difco™ Agar zugesetzt. Die angegebenen pH-Werte wurden, falls nicht anders angegeben, mit 1 M HCl-Lösung oder 1 M NaOH-Lösung eingestellt.

#### AIM-Medium (*Agrobacterium tumefaciens*-Induktions-Medium)

1 % Calciumchlorid-Lösung 1 ml/L, 0,01 % Eisen(II)sulfat-Lösung 10 ml/L, 20 % Glukose-Lösung 5 ml/L, 50 % Glycerin-Lösung 10 ml/L, K-Puffer 0,8 ml/L, 1 M MES-Lösung 40 ml/L, MN-Puffer 20 ml/L, 20 % Ammoniumnitrat-Lösung 2,5 ml/L, Spurenelement-Lösung II 5 ml/L.

Die Medienbestandteile wurden sterilfiltriert und mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$  auf 1 L aufgefüllt. Für die Herstellung von Festmedium wurden 2 % granulierter Difco™ Agar und 1 ml einer 200 mM Acetosyringon-Lösung in DMSO zugegeben.

#### BAF-Medium (nach Becker, 2014)

Maltose 20 g/L, Glukose 10 g/L, Pepton 2 g/L, Hefeextrakt 1 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  1 g/L,  $\text{FeCl}_3$  10 mg/L,  $\text{ZnSO}_4$  1 g/L,  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  5 mg/L.

#### Czapek-Dox-Medium (pH 6,3)

Saccharose 30 g/L,  $\text{NaNO}_3$  3 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g/L, KCl 0,5 g/L,  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  10 mg/L,  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  73,5 mg/L.

#### LB-Medium (pH 7,4)

Bacto™ Trypton 10 g/L, Bacto™ Yeast Extract 5 g/L, NaCl 5 g/L.

#### Minimalmedium (MM, pH 6,5)

Glukose 10 g/L, 20x Nitratsalzlösung 50 ml/L, Spurenelementlösung I 1 ml/L, 0,01 % Biotin-Lösung 250 µl/L, 1 % Thiamindichlorid-Lösung 1 ml/L.

#### Stickstoffmangelmedium (N-MM, pH 6,5)

Glukose 10 g/L, 20x Salzlösung ohne Nitrat 50 ml/L, Spurenelementlösung I 1 ml/L, 0,01 % Biotin-Lösung 250 µl/L, 1 % Thiamindichlorid-Lösung 1 ml/L.

#### Potato Dextrose Broth (PDA-Medium)

Difco™ Potatoe Dextrose Broth 24g/L.

### SOB-Medium

Bacto™ Trypton 20 g/L, Bacto™ Yeast Extract 5 g/L, KCl 0,2 g/L, NaCl 0,6 g/L.

Nach dem Autoklavieren wurde 10 ml einer 2 M Mg<sup>2+</sup>-Lösung sterilfiltriert zugegeben.

### SOC-Medium

1 ml 2 M Glukose-Lösung zu 200 ml SOB-Medium.

Das SOC-Medium wurde sterilfiltriert bei -20 °C aufbewahrt.

### V8-Medium (pH 6,5)

Vitafit Tomatensaft 200 ml/L.

### Wasseragar

Agar 20 g/L.

### Weizenblattextrakt (WE)

Weizengraspulver 30 g/L.

Das Weizenblattextrakt wurde durch Kochen des Weizengraspulvers in H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> für 20 min hergestellt. Um den Feststoffanteil zu entfernen wurde das Gemisch bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert und der Überstand als Zusatz für Kulturmedien für die Fermentation verwendet. Nach der Zugabe zum Medium wurde das Medium-WE Gemisch zusammen autoklaviert.

### YEG-Medium (pH 6,5)

Hefeextrakt 10 g/L, Glukose 10 g/L.

#### 2.1.4.1 Selektionsmedien

Falls nicht anders angegeben, wurden die Antibiotika-Lösungen in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> gelöst. Zur Aufbewahrung wurden die Lösungen sterilfiltriert (Sterilfilter Typ FP30/0,45 CA-S) und in 1,5 mL Gefäßen bei -20 °C gelagert.

LB-Ampicillin (LB-Amp): 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml) auf 1 L LB-Medium.

LB-AIX: 1 ml Ampicillin-Lösung (100 mg/ml), 5 ml IPTG (100 mM) und 1,6 ml X-Gal-Lösung (50 mg/ml in DMSO).

LB-Kanamycin (LB-Kana): 600 µl Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) auf 1 L LB-Medium.

LB-Rifampicin (LB-Rif): 6 ml Rifampicin-Lösung (10 mg/ml in MeOH) auf 1 L LB-Medium.

LB-Rifampicin/Kanamycin (LB-Rif/Kana): 6 ml Rifampicin-Lösung (10 mg/ml in MeOH) und 600 µl Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) auf 1 L LB-Medium.

LB-Tetracyclin (LB-Tet): 10 ml Tetracyclin-Lösung (5 mg/ml in EtOH) auf 1 L LB-Medium.

MM-Cefotaxim/Streptomycin/Basta (MM-CSB): 3 ml Cefotaxim-Lösung (100 mg/ml), 2 ml Streptomycin-Lösung (100 mg/ml) sowie 0,5 ml Basta® (200 mg/ml) auf 1 L MM.

V8- Cefotaxim/Streptomycin/Hygromycin (V8-CSH):  
3 ml Cefotaxim-Lösung (100 mg/ml), 2 ml Streptomycin-Lösung (100 mg/ml) sowie 1,5 ml Hygromycin-Lösung (100 mg/ml) zugegeben.

### 2.1.5 Organismen

#### 2.1.5.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Stamm: AGL 1 (BAA-101)(ATCC, Manassas, USA)

Genotyp: AGL0 *recA::bla pTIPo542deltaT Mop+ CbR* (Lazo *et al.*, 1991)

#### 2.1.5.2 *Escherichia 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>)*]

#### 2.1.5.3 *Zymoseptoria tritici*

Stamm: IPO323 (CBS Fungal Collection, Utrecht, NL)

Der *Z. tritici* Wildtypstamm IPO323 wurde in dieser Arbeit für molekularbiologische Arbeiten, als Referenz zur phänotypischen Charakterisierung von Mutanten sowie zur Untersuchung des Sekundärmetabolismus eingesetzt. Des Weiteren diente der Wildtypstamm als Ausgangsorganismus zur Generierung von *loss of function* Mutanten. Zur langfristigen Aufbewahrung von *Z. tritici* Stämmen wurden Glycerolstocks hergestellt (1:1 mit 50%igem Glycerol) und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Isolation genomischer DNA, zur Gewinnung von Sporen für die Transformation oder als Ausgangskultur zum Inokulieren anderer Medien erfolgte die Kultivierung in 50 ml YEG-Medium für 5 Tage bei RT und 125 rpm. Die 50 ml YEG-Kulturen wurden mit 100 µl der Glycerol-Stocks inokuliert.

#### 2.1.5.4 *Triticum aestivum*

Für Phytopathogenitätstests mit *Z. tritici* oder zur Untersuchung der Phytotoxizität von Extrakten wurde Winterweizen (*Triticum aestivum*) der Varietät Riband verwendet. Das Saatgut für die Anzucht der Weizenpflanzen wurde vom BASF Agrarzentrum Limburgerhof zur Verfügung gestellt. Die Saatkörner wurden in autoklaviertes Vermiculit in Kunststoffblumentöpfe (Ø 7 cm) gesät und diese in eine ca. 2 cm hoch mit Wasser befüllte Schale gestellt. Diese Schale wurde auf der Fensterbank bei RT platziert.

#### **2.1.6 Enzyme**

DreamTaq™ DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
NEB® HiFi DNA Assembly Mix	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Restriktionsendonucleasen	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RNase A	Qiagen, Hilden
Phusion® DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Fast Alkaline Phosphatase (FastAP)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

#### **2.1.7 Reaktionskits**

CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
DNeasy® Plant Mini Kit	QIAGEN, Hilden
iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Mannheim
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RNase-free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNeasy® Plant Mini Kit	QIAGEN, Hilden

NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren
GeneJET® Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte

### 2.1.8 Primer

Oligonukleotid-Primer wurden zur Amplifikation von Gensequenzen zum Zwecke der Klonierung, zur Überprüfung von Rekombinationsereignissen (Kolonie-PCR), für die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für den Southern Blot und für die real-time PCR verwendet. Die Primer wurden stets mit einer Konzentration von 5 µM eingesetzt.

Alle verwendeten Primer-Oligonukleotide wurden mit der Online-Software „Primer Design Tool“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Schmelztemperaturen der Primer wurden mit dem Onlineprogramm „Tm Calculator“ der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte) nach der Methode von Breslauer *et al.* (1986) berechnet. Für Klonierungsversuche mit dem NEB® HiFi DNA Assembly Mix wurden die Oligonukleotid-Primer mit Hilfe der Online-Software „NEBuilder Assembly Tool 1.9“ von New England Biolabs (Frankfurt/Main) entworfen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primer sind im Anhang 1 zu finden.

### 2.1.9 Plasmide

Die hier aufgelisteten Plasmide wurden für die Konstruktion von Vektoren verwendet. Sequenzinformationen sind den angegebenen Quellen bzw. den Angaben des jeweiligen Herstellers zu entnehmen.

pCAMBIA0380	CAMBIA, Canberra, Australien
pCAMBIA-HPT ( <i>SalI</i> )	Kramer <i>et al.</i> , 2009
pCAMBIA-BAR ( <i>SalI</i> )	Kramer <i>et al.</i> , 2009
pCB1636	Sweigard <i>et al.</i> , 1997
pJET1.2/blunt	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte
pGEM®-T Easy	Promega, Mannheim

## 2.1.10 Software

### 2.1.10.1 Datenbanken

Die in dieser Arbeit verwendeten Aminosäure- bzw. Gensequenzen aus *Z. tritici* entstammen der Datenbank des Joint Genome Institute (JGI). Die angegebenen JGI Protein-IDs dienen zur eindeutigen Identifikation der Proteine bzw. ihrer korrespondierenden Gene in der JGI Datenbank (<http://genome.jgi.doe.gov/Mycgr3/Mycgr3.home.html>). Die JGI-Datenbank wurde neben der Datenbank des NCBI auch für die vergleichende Sequenzanalyse von Nukleotiden (blastn) bzw. von Proteinen (blastp) benutzt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

### 2.1.10.2 Programme

Zur Bearbeitung und Darstellung von DNA-Sequenzen wurden die Programme pDRAW32 (Kjeld Olesen, AcaClone Software; <http://acaclone.com>), BioEdit7 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) und ApE (<http://biologylabs.utah.edu/~jorgensen/wayned/ape/>) verwendet.

Alle verwendeten Primer-Oligonukleotide wurden mit der Online-Software „Primer Design Tool“ des National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entworfen.

Zur Dokumentation von Agarosegelen wurde das Computerprogramm Quantity Image Lab (Biorad, München) verwendet.

Die mikroskopische Bildaufnahme sowie Bearbeitung erfolgte mit dem Programm AxioVision von Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

## 2.1.11 Mikroskopie und Dokumentation

Mikroskopische Untersuchung der Konidienkeimung sowie die entsprechende fotografische Darstellung von Pyknidiosporen erfolgte mit dem Axio Imager M2 von Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen).

Um das Wachstum von *Z. tritici* Kolonien auf Festmedien zu untersuchen, wurde das Binokular Stemi 2000-C von Zeiss (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) verwendet. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit der Digitalkamera PowerShotG10 der Firma Canon. Phytopathogenitätsassays wurden mit der Digitalkamera Exilim EX-ZR10 der Firma Casio fotografiert.

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

#### 2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus *Zymoseptoria tritici*

Die Isolierung genomischer DNA aus *Z. tritici* erfolgte mit Hilfe des DNeasy® Plant Mini Kits. Dazu wurden 50 ml YEG-Flüssigkultur mit 100 µl aus einem Glycerolstock inokuliert und bei 22 °C und 120 rpm für 5 Tage kultiviert. Im Anschluss wurde die Kultur bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert und das so gewonnene Zellpellet nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Genomische DNA wurde bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

#### 2.2.1.2 Plasmidpräparation aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 5 ml-Kulturen in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion mit einer Einzelkolonie inokuliert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 220 rpm wurde Plasmid-DNA für analytische Zwecke mittels alkalischer Lyse nach Sambrook *et al.* (2001) isoliert. Diese Methode ermöglicht eine schnelle Isolierung der DNA, jedoch mit geringerer Reinheit. Die Isolierung von Plasmiden für präparative Zwecke erfolgte mit dem GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden 2 ml der Übernachtskultur eingesetzt. Die Elution erfolgte mit H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.2.1.3 Isolierung von RNA aus *Zymoseptoria tritici*

Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy® Plant Mini Kits der Firma QIAGEN entsprechend der Anleitung des Herstellers. Um einen hohen Reinheitsgrad der RNA sicherzustellen wurden eventuelle DNA-Rückstände mittels RNase-freien DNase Kit (QIAGEN) degradiert. Die Isolierung der RNA erfolgte aus einer Sporenkultur von *Z. tritici*, welche je nach Fragestellung in Flüssig- bzw. auf Festmedien kultiviert wurden.

Zur Präparation von RNA aus Kulturen von Festmedien, wurde zunächst eine 50 ml YEG-Flüssigkultur in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 22 °C und 125 rpm für 4 Tage inkubiert.

Im Anschluss wurde mit Hilfe einer Zählkammer eine Sporendichte von  $5 \times 10^7$  Sporen/ml eingestellt (vgl. 2.3.1) und 300  $\mu$ l dieser Suspension auf Agarplatten ausplattiert. Diese wurde für 24 h bei 16 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellmasse mit etwa 10 ml 0,1 % DEPC und einem sterilen Drigalski-Spatel von der Agarplatte geschwemmt und in einem 50 ml Kunststoffgefäß bei 4 °C für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Flüssigstickstoff schockgefroren, lyophilisiert und unter ständiger Kühlung mit Flüssigstickstoff zu feinem Pulver gemörsert.

Zur Inokulation von Flüssigkulturen für die RNA-Isolierung wurden 500 ml des jeweils ausgewählten Mediums mit 6 ml einer viertägigen YEG-Vorkultur inokuliert. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurde eine 50 ml Probe entnommen und bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in Flüssigstickstoff schockgefroren, lyophilisiert und zu feinem Pulver gemörsert. Als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolierung wurden jeweils 100 mg des gemörserten Zellmaterials eingesetzt.

### 2.2.1.4 Isolierung von RNA aus *Triticum aestivum*

Zur Isolierung pflanzlicher RNA aus Weizenblättern bzw. RNA von *Z. tritici* aus infizierten Weizenblättern, wurde analog zu 2.2.1.3 vorgegangen. Es wurden zehn Blätter einer Weizenpflanze abgeschnitten und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden die Weizenblätter gefriergetrocknet und unter Kühlung mit Flüssigstickstoff zu feinem Pulver gemörsert. Für die Isolierung der RNA wurden 100 mg des gemörserten Blattmaterials verwendet.

### 2.2.1.5 Bestimmung der Qualität und Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration und die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren wurden mit Hilfe des NanoDrop Lite Spectrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Messung basierte auf UV/VIS-Spektroskopie. Dabei wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen, die ein Maß für die Konzentration der Nukleinsäuren ist.

Die Qualität der Nukleinsäuren wurde über das Absorptionsverhältnis der Wellenlängen 260 nm/280 nm ermittelt.

### 2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Amplifikation genomischer DNA und die Überprüfung von Rekombinationsereignissen mittels Kolonie-PCR wurde der Thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) verwendet. Für die quantitative real-time PCR (q-PCR) wurde der Mastercycler® RealPlex2 (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet.

#### 2.2.2.1 PCR für Klonierungszwecke

Die Amplifikation von Zielensequenzen wurde auf der Basis genomischer DNA oder Plasmid-DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte fanden anschließend Verwendung bei der Ligation in Klonierungsvektoren. Für die Amplifizierung der Zielsequenzen wurde die DreamTaq™ DNA Polymerase bzw. die Phusion™ DNA-Polymerase nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### 2.2.2.2 PCR zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

Zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden für den Southern Blot wurden während einer PCR-Reaktion DIG-markierte dUTPs in die genspezifische Sequenz inkorporiert. Diese können mit einem rekombinanten, spezifischen Anti-DIG-Antikörper detektiert werden. Die Primer wurden so gewählt, dass Produkte der Länge 500-600 bp entstanden. Für die PCR-Reaktion wurde der konstruierte pCAMBIA-Geninaktivierungsvektor als Template und die DreamTaq™ DNA-Polymerase verwendet.

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

DreamTaq™ Puffer (10x)	5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
DIG-dUTPs	1,5 µl
<i>Forward</i> -Primer (5 µM)	2 µl
<i>Reverse</i> -Primer (5 µM)	2 µl
DNA Template (ca. 10 ng)	X µl
DreamTaq™ DNA Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 50 µl

### 2.2.2.3 Kolonie-PCR zur Untersuchung von Rekombinationsereignissen

Um Rekombinationsereignisse nach der Transformation mit pCAMBIA-Geninaktivierungsplasmiden im Genom von *Z. tritici* zu untersuchen und eine Vorauswahl von potentiellen Mutanten für den Southern Blot zu treffen, wurde eine Kolonie-PCR-Methode angewandt. Diese Methode erlaubt es in einem Schnellverfahren die Zellen aufzuschließen und die im Zelllysat vorhandene DNA direkt und ohne weitere Reinigung als Template für eine PCR-Reaktion einzusetzen. Um zu untersuchen ob ein Rekombinationsereignis stattgefunden hat, wurden für die PCR-Reaktion Primer verwendet, die jeweils am 5'- bzw. 3'-Ende der modifizierten Gensequenz binden. Durch die Integration einer Resistenzkassette in die Gensequenz unterscheiden sich die Größen der entstehenden Produkte der Transformanten deutlich vom WT. Im Falle einer ektopischen Integration der Inaktivierungssequenz in das Genom, ist die Entstehung beider PCR-Produkte zu erwarten. Die Auswertung der Kolonie-PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Zur DNA-Gewinnung wurde von einer bewachsenen V8-CSH Selektionsplatte mit einer sterilen Pipettenspitze eine etwa stecknadelkopfgroße Menge der gewachsenen Kolonie entnommen und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden in der Mikrowelle bei 800 Watt für 30 s erhitzt und anschließend mit 200 µl 1x TE-Puffer versetzt. Um einen effizienten Zellaufschluss zu gewährleisten wurden Glasperlen unterschiedlicher Körnung (Ø 0,75-2,1 mm) zu den Zellen gegeben und 1 min auf einem Vortexmischer geschüttelt. Im Anschluss wurde der Ansatz 1 min bei 13.200 rpm zentrifugiert und 5 µl aus dem Überstand als Template für die PCR-Reaktion eingesetzt.

#### PCR-Ansatz für die Kolonie-PCR (20 µl)

DreamTaq <sup>TM</sup> Puffer (10x)	2 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
<i>Forward</i> -Primer (5 µM)	0,5 µl
<i>Reverse</i> -Primer (5 µM)	0,5 µl
DNA <i>Template</i> aus Überstand	5 µl
DreamTaq <sup>TM</sup> DNA Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	11 µl

### 2.2.2.4 Quantitative real-time PCR

Genexpressionsanalysen wurden mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (q-PCR) durchgeführt. Hierzu wurde das iTaq Universal SYBR Green One-Step Kit von Bio-Rad (München) nach Herstellerangaben verwendet. Als Template wurde cDNA eingesetzt, welche mit dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific auf der Basis von mRNA synthetisiert wurde. Die cDNA Synthese wurde mit den oligo(dT)-Primer mit 100 ng RNA als Template nach Herstellerangaben durchgeführt. Die relative Transkriptmenge der Zielgene wurde mit der  $\Delta C_T$ -Methode berechnet (Real-Time PCR Applications Guide, Bio-Rad, 2006). Dieses Prinzip entspricht einem vereinfachten mathematischen Model der relativen Quantifizierung nach Livak und Schmittgen (2001) und führt zu denselben Ergebnissen wie die Originalmethode. Die Fehlerberechnung erfolgte nach der Methode von Livak und Schmittgen (2001). Als Kontrollgen wurde das konstitutiv exprimierte  $\beta$ -Tubulin (XP\_003856775.1; JGI Protein-ID 102950) verwendet. Alle für die q-PCR Experimente eingesetzten Primer sind in Anhang I (Tabelle 10) aufgelistet.

### **2.2.3 Restriktion von Nukleinsäuren**

Alle Restriktionen wurden nach den allgemeinen Vorschriften nach Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt. Die DNA-Restriktionen wurden zum Zweck der Analyse von Plasmid-DNA, bei Klonierungen oder zur Vorbereitung für den Southern Blot eingesetzt. Dabei wurden die Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers in den empfohlenen Puffer verwendet.

Bei Kontrollrestriktionen wurden 300-500 ng Plasmid-DNA eingesetzt und beim Temperaturoptimum des jeweiligen Enzyms für 1 h inkubiert. Beim präparativen Restriktionsverdau für die Klonierung wurden etwa 1,5-2,0  $\mu$ g und für den Southern Blot etwa 10  $\mu$ g DNA verwendet. Die Inkubationszeit betrug hier 3 h bzw. über Nacht beim Temperaturoptimum des verwendeten Enzyms.

#### 2.2.3.1 Dephosphorylierung von Restriktionsschnittstellen

Um die Religation einfach restringierter Vektoren zu verhindern, wurde das freie 5'-Ende des linearisierten Vektors dephosphoryliert. Hierzu wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Fast-AP) von Thermo Fisher Scientific verwendet. Nach der Restriktion wurden zu 50  $\mu$ l Restriktionsansatz 5  $\mu$ l Fast-AP hinzugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Fast-AP bei 65 °C 10 min deaktiviert.

Im Anschluss konnte das gesamte Reaktionsvolumen zur gelelektrophoretischen Auftrennung eingesetzt werden.

### **2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Alle Agarose-Gelelektrophoresen wurden nach den allgemeinen Vorschriften nach Sambrook *et al.* (2001) durchgeführt. Es wurden Gele mit 1 % Agarosegehalt verwendet und zur Elektrophorese in den Gelkammern der Firma Bio-Rad (München) bei konstanter Spannung von 90-110 V in 1x TAE-Puffer eingesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Agarosegel mit 1x Ladepuffer (6x Orange Loading Dye, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) versetzt. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde der DNA-Molekulargewichtsmarker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte) verwendet.

Zur Detektion der DNA wurden die Agarosegele nach Beendigung der Elektrophorese für ca. 20 min in eine Ethidiumbromid-Lösung gelegt und anschließend mindestens 20 Minuten in einem Wasserbad entfärbt.

Im Fluor-S®Multi Imager (Bio Rad München) wurde die DNA bei einer Wellenlänge von 365 nm sichtbar gemacht und mit dem Computerprogramm Quantity Image Lab (Biorad, München) dokumentiert.

#### 2.2.4.1 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit der Firma Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert. Die Elution erfolgte mit H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub>.

### **2.2.5 Methoden zur Klonierung von DNA**

#### 2.2.5.1 Ligation

Für Ligationsansätze wurde die T4 DNA Ligase von Thermo Fisher Scientific mit dem dazugehörigen Puffersystem verwendet. Diese Methode wurde für das Klonieren von PCR-Produkten oder restringierten DNA-Fragmenten in die Endvektoren verwendet. In den Ligationsansätzen wurde zwischen *Insert* und Vektor ein Mengenverhältnis von 1:1, 3:1 oder 5:1 eingestellt.

Standard Ligationsansatz

Vektor	50-100 ng
<i>Insert</i>	x $\mu$ l
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O <sub>UF</sub>	ad 20 $\mu$ l

Bei allen Vektoren (außer den pCAMBIA-Vektoren) betrug die Ligationsdauer 1 h bei 22 °C (RT), pCAMBIA-Vektoren wurden entweder 3 h oder über Nacht bei RT ligiert. Im Anschluss wurde die Ligase 10 min bei 65 °C deaktiviert.

**2.2.6 Transformation**2.2.6.1 Transformation von *Escherichia coli*Herstellung elektrokompenter Zellen

Für Transformationsansätze wurden der *E. coli* Stamm XL1-Blue verwendet. Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurden die *E. coli* Zellen aus einer Glycerinkultur mittels Verdünnungsausstrich auf Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden von der Agarplatte einzelne Kolonien in je 5 ml flüssiges LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden 3-4 ml dieser Vorkulturen in jeweils 500 ml mit 20 mM Glukose versetztem LB-Medium in 1 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane überführt. Die Kolben wurden dann bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht war. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurden die Zellen zunächst 10 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Im Anschluss folgten zwei Waschschrte mit jeweils ca. 150 ml H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> und ein Waschschrte mit ca. 150 ml 10%iger Glycerinlösung. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen in 10%iger Glycerinlösung resuspendiert. Je 80  $\mu$ l Zellsuspension wurden in sterile, eiskalte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### Transformation elektrokompenter *Escherichia coli* Zellen

Die Transformation elektrokompenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Elektroporationsmethode (Dower *et al.*, 1988). Dazu wurden 4 µl Plasmid-DNA mit 80 µl elektrokompenten *E. coli* Zellen vermischt und in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben (Elektrodenabstand 1 mm). Im GenePulser Xcell™ Electroporation System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden die Zellen bei 25 µF, 1,8 V und 200 Ω einem elektrischen Impuls ausgesetzt. Durch das elektrische Feld entstehen in der Membran kurzzeitig Poren, welche die Zellen permeabel für DNA-Konstrukte machen. Nach der Elektroporation erfolgte die sofortige Aufnahme der Zellen in 250 µl SOC-Regenerationsmedium in 13 ml PP-Röhrchen. Zur Regeneration wurden die Zellen 1 h bei 220 rpm und 37 °C geschüttelt. Zur Selektion positiver Transformanten wurden die Zellen im Anschluss auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### Identifizierung von Transformanten

Von den auf Selektionsmedium gewachsenen *E. coli* Zellen wurden einzelne Kolonien ausgewählt und in 5 ml LB-Medium mit passendem Antibiotikum überführt. Die Flüssigkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide mittels alkalischer Lyse präpariert (Kapitel 2.2.1.2) und eine Kontrollrestriktion, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, durchgeführt.

### 2.2.6.3 Transformation von *Zymoseptoria tritici*

Die Transformation von *Z. tritici* erfolgte durch *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation in Anlehnung an das Protokoll von Zwiers und De Ward (2001).

### Herstellung chemisch-kompenter *Agrobacterium tumefaciens* Zellen

Von einer Glycerinkultur des Stammes *A. tumefaciens* AGL1 erfolgte ein Verdünnungsausstrich auf LB-Rif-Agarplatten. Nach 2-4 Tagen Inkubation bei 28 °C wurde 5 ml LB-Rif-Flüssigmedium in 13 ml Röhrchen mit mehreren Kolonien von der bewachsenen Platte beimpft und über Nacht bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde am nächsten Tag vollständig in 500 ml LB-Flüssigmedium in einem 1 L Erlenmeyerkolben mit einer Schikane überführt und es erfolgte eine Inkubation bei 28 °C und 220 rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8. Im Anschluss wurde die Kultur zunächst 10 min auf Eis gestellt und danach 15 min mit 4000 rpm bei 4 °C

zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 ml 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gewaschen und erneut für 15 min mit 4000 rpm bei 4 °C pelletiert. Die Resuspension erfolgte in 2,5 ml der 20 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. 100 µl-Aliquots dieses Zellkonzentrats wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### Transformation chemisch-kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen durch Hitzeschock

Die Transformation der *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte durch einen Hitzeschock. Dazu wurden 500-1000 ng des pCAMBIA-Geninaktivierungsvektors zu gefrorenen, kompetenten AGL1-Zellen gegeben und 5 min bei 37 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Danach wurden die Zellen sofort in 300 µl sterilem LB-Medium aufgenommen und 2-4 h bei 28 °C bei 220 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen auf vorgewärmte LB-Rif/Kana-Agarplatten ausplattiert und bei 28 °C für 3 Tage im Dunkeln inkubiert.

### *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation von *Zymoseptoria tritici*

Von den bewachsenen LB-Rif/Kana-Agarplatten wurden mehrere *A. tumefaciens* Kulturen zur Inokulation von jeweils 5 ml LB-Rif/Kana-Flüssigmedium verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 28 °C und 220 rpm wurden jeweils 1,5 ml der Kulturen für 5 min bei 6.000 rpm zentrifugiert und das Pellet unter sterilen Bedingungen in 750 µl AIM-Flüssigmedium resuspendiert. In 4 ml Medium wurden die Zellen weiter verdünnt und anschließend für 6-8 Stunden bei 28 °C und 220 rpm inkubiert. Für die Transformation von *Z. tritici* wurden 50 ml YEG-Flüssigkulturen in 100 ml Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 100 µl aus einem Glycerolstock angeimpft und 4 Tage bei 22 °C und 125 rpm kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4000 rpm 10 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> suspendiert. In einer 1:1000 Verdünnung der Zellsuspension wurden mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer improved) die Sporen gezählt und anschließend auf eine Konzentration von 5x10<sup>7</sup> Sporen/ml eingestellt. Anschließend wurde die Sporensuspension 1:1 mit den *A. tumefaciens*-Kulturen gemischt. Je 500 µl dieser Mischung wurden auf sterile Nitrocellulosefilter (Ø 47 mm, 0,45 µm Porengröße) pipettiert, die auf AIM-Agarplatten ausgelegt waren. Nach dem Trocknen wurden die Platten 48 h in Dunkelheit bei 28 °C inkubiert und die Nitrocellulosefilter dann auf Selektionsplatten mit Hygromycin (V8-CSH) bzw. Glufosinat-Ammonium (MM-CSB) und jeweils Streptomycin und Cefotaxim überführt. Nach Inkubation für ca. 21 Tage in Dunkelheit bei 16 °C konnten Transformanten mit

Hilfe einer sterilen Impföse vom Nitrocellulosefilter auf frische Selektionsplatten überimpft und bei 16 °C inkubiert werden. Nach ca. 7-10 tägiger Inkubation konnten die gewachsenen Kolonien zur Untersuchung der Rekombinationsereignisse mittels Kolonie-PCR eingesetzt werden. Transformanten, die für den Southern Blot ausgewählt wurden, wurden von derselben Agarplatte mit Hilfe einer sterilen Impföse in eine 50 ml YEG-Flüssigkultur überführt und 4 Tage bei 22 °C und 125 rpm zur Extraktion genomischer DNA kultiviert.

### **2.2.7 Southern Blot Analyse**

Mit Hilfe des Southern Blots wurden spezifische DNA-Sequenzen im Genom von *Z. tritici*-Transformanten verifiziert. Es wurde nach den Vorschriften von Sambrook *et al.* (2001) gearbeitet. Eingesetzt wurde genomische DNA aus dem *Z. tritici* Wildtyp-Stamm und aus den zu untersuchenden Transformanten.

#### 2.2.7.1 Restriktion, Präzipitation und gelelektrophoretische Auftrennung genomischer DNA

Genomische DNA aus dem *Z. tritici* Wildtyp-Stamm IPO323 und aus den jeweils zu untersuchenden Transformanten wurde, wie in Kapitel 2.2.1.1 beschrieben, isoliert. Es folgte die Behandlung von jeweils 10 µg DNA mit ausgewählten Restriktionsenzymen in einem Volumen von 200 µl über Nacht. Nach Zugabe von 150 µl Isopropanol wurde die DNA-Lösung invertiert, für 30 min bei RT und 13.200 rpm zentrifugiert und anschließend das getrocknete Pellet in 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> mit 1x Loading-Dye aufgenommen. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1 %-igen Agarosegel bei einer konstanten Spannung von 90 V. Als Marker wurde der Digoxigeninmarkierte DNA Molecular Weight Marker VII bzw. III der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) verwendet.

#### 2.2.7.2 Transfer der Nukleinsäuren

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Agarosegel zur Depurinierung 15 min in 0,25 M HCl-Lösung auf einem Wipptisch geschwenkt. Im Anschluss wurde das Gel je zweimal 15 min in Denaturierungspuffer und in Neutralisationspuffer geschwenkt. Bei jedem Pufferwechsel wurde das Agarosegel mit H<sub>2</sub>O<sub>deion</sub> abgespült.

Der Transfer der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel auf die positiv geladene Nylonmembran (Roti®-Nylon Plus, Carl Roth, Karlsruhe) erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot. Der Aufbau des Blot erfolgte nach der Standardvorschrift von Darling und Brickell (1996). Nach dem Transfer der DNA wurde sie mit Hilfe eines UV-Crosslinker (Typ FLX- 20M, Vilber Lourmat, Marne La Vallée, Frankreich) fixiert. Die Fixierung erfolgte durch Quervernetzung der DNA mit der Nylonmembran durch Bestrahlung mit UV-Licht für 40 s bei einem kontinuierlichen Energiedichtegradienten von 0,120 bis 0 J/cm<sup>2</sup>.

### 2.2.7.3 Hybridisierung

Nach der Fixierung der DNA auf der Nylonmembran folgte eine 1,5 stündige Inkubation bei 65 °C in 20 ml Hybridisierungspuffer mit 40 µl Lachssperma-DNA. Die Inkubation erfolgte in einer Röhre im Hybridisierungssofen (Hybaid Shake 'n' Stack, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold). Die Lachssperma-DNA wurde vor der Zugabe 5 min bei 95 °C denaturiert, dann 5 min auf Eis abgekühlt. Sie sollte unspezifische Bindungen der DNA-Sonde an der Membran reduzieren.

Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C in 20 ml Hybridisierungspuffer, welcher zuvor mit 20 ng/ml einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde versetzt wurde. Diese wurde vor dem Gebrauch für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um ungebundene Anteile der DNA-Sonde zu entfernen, wurde die Nylonmembran am nächsten Tag je zweimal für 15 min mit 25 ml 2x SSPE-Puffer + 0,1 % SDS und 25 ml 0,2x SSPE-Puffer + 0,1 % SDS gewaschen.

### 2.2.7.4 Detektion

Die Detektion der DIG-markierten DNA-Sonde erfolgte mit polyklonalen Antikörpern (Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), die Digoxigenin binden können. Alle folgenden Schritte erfolgten im Hybridisierungssofen bei Raumtemperatur.

Die Nylonmembran wurde zunächst 1 min mit 50 ml Waschpuffer gewaschen. Die darauffolgende 30 minütige Inkubation der Membran in 100 ml Blockingpuffer sollte unspezifische Bindungen der Antikörper verhindern. Auf das Blocken folgte eine 30 minütige Inkubation der Membran in der Antikörperlösung. Durch zweimaliges 15 minütiges waschen der Membran in Waschpuffer sollten im Anschluss ungebundene Antikörper entfernt werden. Nach abschließender Inkubation für 3 min in 20 ml Detek-

tionspuffer wurde die Nylonmembran in eine Kunststoffolie gelegt, mit 1,5 ml CSPD-Lösung (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bedeckt und die Folie durch Einschweißen verschlossen. Die Membran wurde 15 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss die Folie an einer Ecke wieder geöffnet und die CSPD-Lösung mit einem Glasstab herausgestrichen. Das CSPD wurde durch die an den Antikörpern gebundene Alkalische Phosphatase dephosphoryliert, wodurch ein Chemilumineszenz-Signal entstand. Dieses Signal wurde auf einem Röntgenfilm detektiert. Unter Rotlicht wurden Nylonmembran und Röntgenfilm 30-45 min zusammen in eine Expositionskassette gelegt. Die Entwicklung des Films erfolgte in der Entwicklungsmaschine CP1000 der Firma Agfa HealthCare GmbH (Bonn).

### 2.2.8 Klonierungsstrategien

Grundlegend wurde die kodierende Sequenz der zu untersuchenden Zielgene mit der kodierenden Sequenz eines Resistenzgens unterbrochen und die Biosynthese eines funktionellen Zielproteins somit verhindert. Die verwendeten Geninaktivierungsvektoren wurden so konstruiert, dass die jeweilige Resistenzgenkassette von 500-600 bp großen WT-Sequenzen flankiert wurde um eine homologe Rekombination ins Genom von *Z. tritici* zu ermöglichen. Es wurde zum einen die Konstruktion von Geninaktivierungsvektoren mit Hilfe der *gene disruption* Methode nach Stephenson (Stephenson *et al.*, 2000), zum anderen die Klonierungsmethode nach Gibson (Gibson *et al.*, 2009) unter Verwendung des NEB<sup>®</sup> HiFi DNA Assembly Mix (New England Biolabs, Frankfurt/Main) angewendet. Eine detaillierte Beschreibung der Klonierungsstrategien ist in Anhang II zu finden.

## 2.3 Methoden zur phänotypischen Charakterisierung

### 2.3.1 Herstellung von Sporensuspensionen

50 ml YEG-Flüssigmedium wurden mit 100 µl eines 50 %igen Glycerolstocks von *Z. tritici* Sporen (vgl. 2.1.5.3) angeimpft und bei 22 °C und 120 rpm für 4 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Sporen durch Zentrifugation für 10 min bei 22 °C und 4000 rpm pelletiert und anschließend in 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> resuspendiert.

Mittels Zählkammer (Neubauer improved, Carl Roth, Karlsruhe) erfolgte die Bestimmung der Sporendichte in einer 1:100fachen Verdünnung der Sporensuspension.

Schließlich wurden je nach Bedarf Konzentrationen von  $5 \times 10^7$  Sporen / ml bzw.  $10^6$  Sporen / ml eingestellt.

### **2.3.2 Wachstumsvergleich auf Festmedien**

Ziel der Wachstumsversuche war es, phänotypische Unterschiede der *loss of function* Mutanten in Bezug auf das Wachstum und der Morphologie auf verschiedenen Voll- bzw. Mangel- und Stressmedien, im Vergleich zum Wildtyp festzustellen.

Es sollte mit diesen Versuchen die Fähigkeit zur dimorphen Transition unter Stickstoffmangel (N-MM und H<sub>2</sub>O-Agar) und allgemein die Morphologie auf Vollmedien wie YEG und PDA sowie auf Minimalmedium (MM) dokumentiert und mit der Morphologie des WT verglichen.

Zur Vorbereitung wurden Sporensuspensionen des WT-Stammes und der Mutanten mit der Konzentration von  $5 \times 10^7$  Sporen / ml hergestellt (vgl. 2.3.1). Je 3 mal 1,5 µl der Sporensuspensionen wurde anschließend auf verschiedene Festmedien aufgetragen. Nach Inkubation von 14 Tagen bei 16 °C konnten die Pilzkolonien auf phänotypische Merkmale hin untersucht werden. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Binokulars (Stemi 2000-C von Zeiss) in 12,5 –facher Vergrößerung und wurde mit einer Digitalkamera (Canon PowerShotG10) dokumentiert.

#### 2.3.2.1 Untersuchung des Wachstums in Gegenwart verschiedener Stickstoff-Quellen

Die generierte  $\Delta ZtareA$  Mutante sowie die komplementierte Mutante  $\Delta ZtareA+ZtareA$ , sollten hinsichtlich des Wachstums auf verschiedene Stickstoffquellen untersucht und mit dem WT verglichen werden.

Hierfür wurde N-MM verwendet und die jeweilige N-Quelle in einer Konzentration von 25 mM hinzugegeben. Als Stickstoffquellen wurden Asparagin, Aspartat, Diammoniumtartrat, Harnstoff, Glutamin, Alanin, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat verwendet.

#### 2.3.2.2 Kaliumchlorat-Assay

Zur Überprüfung des Vorhandenseins funktionsfähiger Nitratreduktasen wurde der Kaliumchlorat-Assay angewendet. Kaliumchlorat ist, neben Natriumnitrat, ein Substrat der Nitratreduktase und wird von dieser zum toxischen Kaliumchlorit umgewandelt (López-Berges *et al.*, 2010; van Wijk *et al.*, 1998).

Es wurde PDA-Festmedium mit 350 mM Kaliumchlorat supplementiert und mit je 1,5 µl einer Sporensuspension von *Z. tritici* in Triplikaten inokuliert. Als Kontrolle diente PDA-Festmedium ohne Kaliumchlorat. Die Agarplatten wurden für 7 Tage bei 16 °C inkubiert und im Anschluss fotografisch dokumentiert.

### **2.3.3 Phytopathogenitäts-Assay gegen Weizenpflanzen**

Für die Untersuchung der phytopathogenen Eigenschaften von Inaktivierungsmutanten wurden Sporensuspensionen der zu untersuchenden Kandidaten und des *Z. tritici* WT-Stammes (IPO323) in einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  Sporen pro ml (vgl. 2.3.1) hergestellt.

Die Weizenpflanzen (cv. Riband) wurden wie in Kapitel 2.1.5.4 beschrieben kultiviert, und nach Erreichen einer Wuchshöhe von etwa 10 cm (je nach Jahreszeit nach 5-7 Tagen) mit 5 ml der Pilz-Sporensuspensionen durch Besprühen inokuliert. Anschließend wurden die mit dem Pilz beimpften Pflanzen für 21 Tage bei RT (auf der Fensterbank) und einem natürlichen Tag-Nacht-Rhythmus in transparenten Plastikbeuteln kultiviert. Zur Auswertung wurden die Blätter der Weizenpflanzen auf Pyknidien untersucht und fotografisch dokumentiert.

### **2.3.4 Keimungstest**

Die Beurteilung der Keimungsfähigkeit der Mutanten verglichen mit der des *Z. tritici* WT-Stammes IPO323 erfolgte nach dreitägigem Wachstum von 15 µl einer Sporensuspension mit der Konzentration  $10^6$  Sporen/ml in einer feuchten Dunkelkammer auf einem mit Wasseragar (supplementiert mit 0,00025 % Biotin und 0,001 % Thiamindichlorid) beschichteten Objektträger. Die Auswertung erfolgte per mikroskopischer Analyse und anschließender fotografischer Dokumentation.

Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden 100 µl einer Sporensuspension mit der Konzentration von  $10^6$  Sporen/ml auf Wasseragar mit Biotin und Thiamindichlorid (s.o.) pipettiert und für 72 h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Es wurden 100 Pyknidiosporen gezählt und die Anzahl der ausgekeimten Sporen bestimmt.

## 2.4 Untersuchungen zum Sekundärmetabolismus

### 2.4.1 Fermentation in Schüttelkolben

Die Fermentation in Schüttelkolben erfolgte in Erlenmeyerkolben mit einer Schikane auf dem Orbitalschüttler (Infors AG, Bottmingen) bei 120 rpm und RT. Schüttelkulturen von 250 ml wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben und 500 ml in 1 L Kolben kultiviert. Zum Inokulieren dienten 3 ml bzw. 6 ml einer 5 Tage alten YEG-Vorkultur. In regelmäßigen Abständen wurden steril Proben aus der Kulturbrühe entnommen und der pH-Wert sowie der Glukosegehalt gemessen. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters (pH 209, HANNA® Instruments Deutschland GmbH) und der Glukosegehalt mit Glukosemessstreifen (Diabur 5000; Roche, Mannheim) gemessen.

Die Fermentation wurde so lange fortgeführt, bis die freie Glukose im Mediums aufgebraucht war. Im Anschluss wurde das Myzel durch Filtration vom Kulturfiltrat getrennt und die Metabolite mit Lösungsmitteln extrahiert.

Um das Metabolitenspektrum von Mutanten mit dem des WTs zu vergleichen, wurden standardgemäß im ersten Schritt für die Fermentation viele verschiedene Medien verwendet. Hierzu zählten: YEG (in den Variationen pH 4, pH 5, pH 6,5), PD, Czapek-Dox, BAF, V8, MM, N-MM, MM + 10 % WE und N-MM + 10 % WE.

Für die Fermentation mit Chromatinstrukturmodulatoren wurde zu YEG-Medium 5-Azacytidin bzw. Vorinostat in einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  zugegeben.

### 2.4.2 Fermentation im 20 L Maßstab

Zur Fermentation im 20 L Maßstab wurden Fermenter vom Typ Biostat A-20 (Braun, Melsungen) eingesetzt. Als Inokulum dienten 250 ml einer 5-7 Tage alten YEG-Flüssigkultur, welche mit 400  $\mu\text{l}$  eines 50 %igen Glycerolstocks aus *Z. tritici* Sporen inokuliert wurde. Der Fermenter wurde mit einer Belüftungsrate von 3 L/min begast, mit einer Rührerdrehzahl 150 rpm gerührt und über den Doppelmantel mit einem Thermostat auf 22 °C temperiert.

Es wurden in ausgewählten Zeitabständen Proben aus der Fermenterbrühe entnommen und pH-Wert und Glukosegehalt (vgl. 2.4.1) bestimmt. Das Myzel und das Kulturfiltrat der Fermenterproben wurde über gewogene Filterpapiere (Macherey-Nagel, Düren) mit einem Büchnertrichter und einer Vakuum-Saugflasche separiert und das Myzeltrockengewicht nach Trocknung der Filter bei 65 °C für 24 h bestimmt. Die Fermentation wurde beendet, nachdem die freie Glukose im Medium vollständig verbraucht war.

### 2.4.3 Herstellung von Rohextrakten aus Myzel und Kulturfiltrat

Zur Herstellung von Myzelextrakten wurde das Myzel 30 min mit Methanol auf einem Magnetrührer gerührt und anschließend um restliche Wasseranteile zu entfernen über Natriumsulfat in einen Rundkolben filtriert. Mit einem Vakuum-Rotationsverdampfer wurde das Methanol vollständig verdampft und der getrocknete Extrakt mit einem möglichst kleinen Volumen Methanol wieder gelöst. Dieses wurde in gewogene Glasvials überführt und in einem Vakuum Konzentratoren erneut bis zur Trockene eingengt. Im Anschluss wurde durch Rückwiegen der Gläschen die absolute Menge des Extraktes ermittelt um definierte Konzentrationen für die anschließenden Versuche einstellen zu können.

Das Kulturfiltratextrakt (KFE) wurde durch Flüssig-Flüssig Extraktion mit einem gleichen Volumenanteil eines Lösungsmittelgemischs aus Ethylacetat : Dichlormethan : Methanol (3:2:1) mit 1 % Ameisensäure (aus Walker *et al.*, 2012) in einem Scheidetrichter gewonnen. Das Gemisch aus Kulturfiltrat und Lösungsmittel wurde mindestens 30 Minuten stehen gelassen, damit eine effiziente Trennung von organischer und wässriger Phase stattfinden konnte. Im Anschluss wurde die organische Phase über Natriumsulfat filtriert um eventuelle Wasserrückstände zu entfernen. Die weiteren Schritte waren analog zur Herstellung des Myzelextraktes.

### 2.4.4 High Performance Liquid Chromatographie

Die gewonnenen Extrakte wurden auf eine Konzentration von 5 mg/ml eingestellt und das Metabolitenspektrum mit der *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) analysiert. Ziel dieser Messungen war es, Unterschiede im Metabolitenspektrum der generierten *loss of function* Mutanten im Vergleich zum WT aufzudecken.

Die Proben wurden hierfür stets vorfiltriert (Chromafil® Einmalfilter Typ 0-45/3, 0,45 µm, ø 3 mm, Macherey-Nagel, Düren).

Um Metabolitenspektren miteinander zu vergleichen wurden alle zu untersuchenden Extrakte mit den gleichen Parametern in einer Standardmethode gemessen. Hierzu wurde eine HPLC-Anlage des Typs Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn) mit einer RP18-Trennsäule (LiChrospher 100, 5 µm, 125x4 mm, Merck, Darmstadt) verwendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor (DAD). Als Eluenten wurde H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) in einem binären Gradienten eingesetzt.

In Tabelle 1 ist der zeitliche Verlauf des Gradienten dargestellt. Die Flussrate betrug konstant 1 ml/min und der Säulenofen war auf 40 °C temperiert.

**Tabelle 1: Standardgradient zur Analyse von Rohextrakten an der Agilent 1100 Series Anlage.** Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des binären Gradienten, wobei Eluent B = Acetonitril, Eluent A= H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> ist. Die Flussrate betrug konstant 1 ml/min.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	99	1
20	0	100
24	0	100
25	99	1

Zur Detektion von Phenolsäuren wurde eine angepasste Methode verwendet, die eine bessere Trennung der Substanzen gewährleistete. Es wurden Messungen an unterschiedlichen Anlagen durchgeführt. Zum einen wurde mit einem Gerät der Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn) unter Verwendung einer RP18-Trennsäule (LiChrospher 100, 5 µm, 125x4 mm, Merck, Darmstadt) gemessen. Die Flussrate betrug 1 ml/min bei einer Temperatur im Säulenofen von 40 °C. Chromatogramme, die mit dieser Anlage aufgenommen wurden werden im Weiteren mit [A] gekennzeichnet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mit einem Diodenarray-Detektor (DAD).

Zum anderen wurde die mit einem Photodiodenarray Detector (PDA, SPD-M20A) ausgestattete Prominence UFLC-Anlage der Marke Shimadzu (Shimadzu Europa GmbH, Griesheim) unter Einsatz einer RP18-Trennsäule mit etwas anderen Parametern (LiChrospher 100, 5.0 µm, 250x4,6 mm) verwendet (im Weiteren gekennzeichnet mit [S]). Die Flussrate über die Säule betrug 1 ml/min bei einer Temperatur von 45°C.

Die Unterschiede in der Säulenlänge der beiden Geräte führten zu unterschiedlichen Retentionszeiten der gleichen Substanz, welche jedoch anhand des UV-Spektrums und der Messung von Standards an beiden Anlagen zweifellos identifiziert werden konnten. Die Konzentration der Proben betrug 5 mg/ml und das Injektionsvolumen 10 µl. Als Eluenten wurden 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA; Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) verwendet.

Es wurden für die Analyse der Extrakte auf produzierte Phenolsäuren die in Tabelle 2 und Tabelle 3 gezeigten Gradienten verwendet.

**Tabelle 2: Standardgradient zur Analyse von Phenolsäuren an der analytischen HPLC der Agilent 1100 Series Anlage [A].** Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des binären Gradienten, wobei Eluent B = Acetonitril, Eluent A= 0,1 % TFA ist. Die Flussrate betrug konstant 1 ml/min.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	99	1
25	65	35
35	0	100
40	0	100
42	99	1

**Tabelle 3: Standardgradient zur Analyse von Phenolsäuren an der analytischen HPLC der Shimadzu Prominence Anlage [S].** Gezeigt ist der zeitliche Verlauf des binären Gradienten, wobei Eluent B = Acetonitril, Eluent A= 0,1 % TFA ist. Die Flussrate betrug konstant 1 ml/min.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	99	1
17	65	35
22	0	100
27	0	100
29	99	1

#### 2.4.5 HPLC-MS-Messungen

Zur Bestimmung der Molekülmasse (bzw. des m/z-Verhältnisses) der Metaboliten erfolgte eine Untersuchung des entsprechenden Extraktes mittels HPLC-MS. Das dabei eingesetzte Gerät (HP-LC/MSD-System Series 1100, Hewlett-Packard, Waldbronn) war mit einer RP18-Säule (Superspher 100, 125x2 mm, 4 µm, Merck, Darmstadt) ausgestattet, die auf 40 °C temperiert wurde. Der Gradient, sowie der Eluent B, entsprachen dabei denen der analytischen HPLC (siehe 2.4.4), allerdings bei einem Fluss von 0,45 mL/min. Als Eluent A wurde H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> mit 0,1 Vol. % HCOOH verwendet. Die Ionisierung erfolgte mittels APCI (chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck) bei Kapillarspannungen von 3.500 V (positiv) bzw. 2.200 V (negativ). Die Verdampfungstemperatur betrug 400 °C und die Fragmentorspannung 140 V. Ein Datenbankvergleich mit einer Massenspektrenbibliothek (IBWF, Kaiserslautern) wurde durchgeführt, um bereits

bekannte Substanzen zu identifizieren. Die Messungen wurden von Petra Stark und Dr. Anja Schüffler am IBWF in Kaiserslautern durchgeführt.

#### 2.4.6 Säulenchromatographie zur Trennung von Substanzen

Zur Auftrennung der Rohextrakte wurde eine Kieselgel-Chromatographie mit Hilfe des Flash-Chromatographie Verfahrens (PuriFlash 4250-250, Interchim) durchgeführt. Die Flash-Chromatographie ist eine automatisierte Form der klassischen Säulenchromatographie, bei der die mobile Phase mit Druckluft durch die stationäre Phase gedrückt wird (Still *et al.*, 1978). Die Elution erfolgte mit einem Gradient aus Ethylacetat, Cyclohexan und Methanol (Tabelle 4). Nach Austritt aus der Trennsäule wurden die Peaks mit einem Fraktionssammler-Modul gesammelt. Die Flash-Chromatographie wurde von Dr. Jochen Fischer am IBWF in Kaiserslautern durchgeführt.

**Tabelle 4: Gradient der Flash-Chromatographie an Kieselgel.** Verlauf des ternären Gradienten der Flash-Chromatographie, mit den Eluenten Cyclohexan, Ethylacetat und Methanol. Die Dauer des Elutionsschrittes wird in Säulenvolumen (*column volume*, cv) angegeben. Die Flussrate betrug wie angegeben 30 bzw. 45 ml/min.

CV	Flussrate [ml/min]	Cyclohexan [%]	Ethylacetat [%]	Methanol [%]
0	30	100	0	0
3	30	100	0	0
20	30	0	100	0
23	30	0	100	0
33	30	0	50	50
34	30	100	0	0
35	30	100	0	0
36	45	100	0	0
40	45	100	0	0

#### 2.4.7 Reinigung von Substanzen mittels Semipräparativer-HPLC

Die durch Kieselgel-Chromatographie mit der FPLC vorgereinigten Substanzen sollten mit Hilfe der semipräparativen HPLC weiter gereinigt werden. Bei der semipräparativen Chromatographie werden im Vergleich zur analytischen Chromatographie größere Säulen und höhere Flussraten verwendet, sodass man größere Extraktmengen in derselben

Zeit reinigen kann. Die semipräparativen HPLC-Läufe wurden am IBWF in Kaiserslautern an der Agilent 1100 Series Anlage durchgeführt. Es wurde die *reverse phase* Alkyl Trennsäule Zorbax SB-Aq (5 µm, 250 x 9,4 mm, Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Diese Säule wurde speziell für die Reinigung hydrophiler Substanzen mit stark wässriger mobiler Phase (bis zu 100 % Wasser als Eluenten) ausgelegt. Die genaue Zusammensetzung des Säulenmaterials wird vom Hersteller nicht veröffentlicht (Produktbeschreibung Agilent Technologies, [www.agilent.com](http://www.agilent.com)).

Nach Austritt aus der Trennsäule wurden die Substanzen mit einem Fraktionssammler-Modul gesammelt. Als Eluenten wurden 0,1 % TFA (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B) eingesetzt.

### 2.4.8 Quantifizierung von Substanzen

Die Quantifizierung der Substanzen erfolgte unter Verwendung der HPLC, mit Hilfe einer Eichkurve, welche durch die Messung eines Standards mit bekannten Konzentrationen erstellt wurde. Die Eichgerade wurde mittels Regression aus fünf Messpunkten berechnet.

### 2.4.9 Test auf Phytotoxizität gegen Weizenblätter

Die generierten Rohextrakte und gereinigten Substanzen wurden auf ihre toxische Wirkung gegen Weizenblätter untersucht.

Dazu wurden Blätter von 10-14 Tage alten Weizenpflanzen abgeschnitten, auf Wasseragarplatten gelegt und dort durch das Auflegen von ca. 1x1 cm großen Wasseragar-Stückchen an den Enden fixiert. Auf die Blätter wurden zunächst Tropfen aus 9 µl 0,2 %iger, steriler Gelatine-Lösung aufgebracht und in diese dann 1 µl (100 µg/µl) Extrakt bzw. je 1 µl Reinsubstanz in den Konzentrationen 5, 10, 25, 50 und 100 µg/µl in MeOH zugegeben. Zusätzlich wurde eine entsprechende MeOH-Kontrolle mitgeführt. Der Versuch wurde über 5-7 Tage hinweg täglich ausgewertet.

### 2.4.10 Induktion der Expression von PR-Proteinen in *Triticum aestivum*

In Anlehnung an Agrawal *et al.* (2001) wurden die Blätter von 10 Tage alte Weizenpflanzen abgeschnitten und in 2 cm lange Blattsegmente zerteilt. Danach wurden die Segmente gemischt und in Petrischalen mit H<sub>2</sub>O<sub>UF</sub> gelegt. Die zu testende Verbindung wurde in der entsprechenden Menge zuvor im Wasser gelöst. Als Kontrolle diente hier Salicylsäure. Danach wurden die Blattsegmente für 24 h unter konstanten Licht- und

Temperaturbedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgenommen und die Blattsegmente in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  weggefroren. Im Anschluss wurde die RNA isoliert (vgl. 2.2.1.4) und q-PCR-Analysen durchgeführt (vgl. 2.2.2.4).

### 3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen der Wirt-Pathogen Interaktion von *Zymoseptoria tritici* und Weizen weiter untersucht werden, da bislang auf diesem Gebiet nur wenige Details bekannt sind (Sánchez-Vallet *et al.*, 2015).

Im Fokus stand die Untersuchung des Sekundärmetabolismus von *Z. tritici*, um Metabolite zu identifizieren, welchen eine essentielle Bedeutung in der Interaktion zwischen Pathogen und Wirt zukommt. Die meisten Sekundärmetabolite aus Pilzen gehören zu den großen chemischen Gruppen der Polyketide oder nichtribosomalen Peptide (Brakhage, 2013). Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit lag dabei auf der Untersuchung der Bedeutung der zehn aus *Z. tritici* bekannten Polyketidsynthasen und der Relevanz phytotoxischer Polyketide für die Infektion.

#### 3.1 Die Aktivierung stiller Sekundärmetaboliten-Gencluster

##### 3.1.1 Auswahl geeigneter Fermentationsparameter und Zielgene als Regulatoren von Sekundärmetaboliten-Genclustern

Durch die Zugabe der Chromatinstruktur-Modulatoren 5-Azacytidin und Vorinostat zu den Kulturen des *Z. tritici* WT-Stammes IPO323 sollten stille Gencluster induziert werden. Bei *Cladospora cladosporioides* konnte durch die Zugabe des Histondeacetylase-Inhibitors Vorinostat der Proteinkinase C-Inhibitor Calphostin B entdeckt werden (Williams *et al.*, 2008). Nach der Behandlung mit Vorinostat konnte außerdem aus der zu den Ascomyceten gehörenden Gattung *Daldinia* sp. das Polyketid Daldinone E isoliert werden (Du *et al.*, 2014). Die Zugabe des DNA-Methyltransferase (DMAT)-Inhibitors 5-Azacytidin aktivierte die Produktion von bislang unbekanntem Oxylipinen sowie von Nygerone A in *Aspergillus niger* (Henrikson *et al.*, 2009).

Die *Z. tritici* Submerskulturen wurden in YEG-Flüssigmedium mit bzw. ohne Chromatinstruktur-Modulatoren fermentiert. Mit den hergestellten Extrakten wurden Phytotoxizitätstests auf Weizenblättern sowie HPLC-Analysen durchgeführt. Beim Vergleich der Chromatogramme der Extrakte mit bzw. ohne Chromatinstruktur-Modulatoren war kein Unterschied zu beobachten. Zudem konnte keine phytotoxische Aktivität der Extrakte beobachtet werden.

Auch durch das Variieren der Kulturbedingungen, wie z.B. des pH-Wertes und des Nährstoffangebotes (vgl. 2.4.1), konnte die Produktion phytotoxischer Sekundärmetabolite in *Z. tritici* nicht induziert werden.

Alternativ sollte durch die Inaktivierung potentieller Regulatoren des sekundären Stoffwechsels die Expression von stillen Genclustern induziert werden. Hierzu wurden potentiell geeignete Zielproteine ausgewählt, die in anderen phytopathogenen Ascomyceten im Zusammenhang mit der Regulation des Sekundärmetabolismus stehen. Mit Hilfe des blastp-Algorithmus des NCBI wurden homologe Proteine in *Z. tritici* identifiziert, deren kodierende Gene im Anschluss inaktiviert wurden.

Die aussichtsreichsten Kandidaten waren die beiden Transkriptionsfaktoren AreAp und Cre1p, welche in Ascomyceten als globale Regulatoren mit Funktion in der Genregulation von Sekundärmetaboliten-Genclustern bekannt sind (Brakhage, 2013) sowie eine Histondeacetylase (HDAC) und die aktive Untereinheit des COP9-Signalosomkomplexes, CSN5. Die Hauptaufgabe des COP9-Signalosoms ist die Regulation des Ubiquitin-26S Proteasomsystems, welches die wichtigste Proteolysemaschinerie in eukaryotischen Zellen ist (Wei und Deng, 2003).

Für die vier ausgewählten Regulatoren konnten mit Hilfe der blastp-Analyse des NCBI Homologe in *Z. tritici* identifiziert werden (Tabelle 5).

Die Inaktivierung der korrespondierenden Gene erfolgte mit Hilfe der *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformation.

Für alle ausgewählten Gene ist es gelungen, *loss of function* Mutanten in *Z. tritici* zu generieren. Die Klonierungspläne sowie der Nachweis der korrekten homologen Rekombinationsereignisse im Genom der Mutanten sind in Anhang II bzw. Anhang III zu finden.

**Tabelle 5: Kandidatengene zur möglichen Aktivierung stiller Gencluster in *Zymoseptoria tritici*.** Die Kandidatengene wurden mit der blastp-Suche des NCBI, basierend auf Homologen aus anderen filamentösen Pilzen, identifiziert. Die JGI Protein-ID bezieht sich auf die Datenbank des Joint Genome Institutes. TF: Transkriptionsfaktor.

Protein	AreAp ( <i>A. nidulans</i> )	Cre1p ( <i>A. crysogenum</i> )	HDAp ( <i>A. nidulans</i> )	CSN5p ( <i>A. nidulans</i> )
<b>Homologe in <i>Z. tritici</i> (JGI Protein-ID)</b>	ZtAreAp (109392)	ZtCre1p (100278)	ZtHDAp (37223)	ZtCSN5p (99069)
<b>Funktion</b>	TF, Regulation des Stickstoff-Metabolismus und des Sekundärmetabolismus	TF, Regulation des Kohlenstoff-Metabolismus und des Sekundärmetabolismus	Histondeacetylase, transkriptionelle Aktivierung von Sekundärmetaboliten-Clustern	Katalytisch aktive Untereinheit des COP9 Signalkomplexes
<b>Quelle</b>	(Tudzynski, 2014)	(Janus <i>et al.</i> , 2008)	(Shwab <i>et al.</i> , 2007)	(Gerke <i>et al.</i> , 2012)

Die Präsentation der Ergebnisse fokussiert sich auf die Untersuchungen von  $\Delta ZtareA$ , da bei dieser Mutante die Ergebnisse am vielversprechendsten waren.

Bei den durchgeführten Experimenten mit den Mutanten  $\Delta Ztcre1$ ,  $\Delta Zthda$  und  $\Delta Ztcsn5$  bezüglich des Sekundärmetabolismus und der Virulenz, war kein Unterschied zum WT zu beobachten, weshalb auf die weitere Untersuchung dieser Mutanten verzichtet wurde.

## 3.2 Der globale Regulator ZtAreAp

### 3.2.1 Die Inaktivierung von *ZtareA*

Zu dem aus *Aspergillus* sp. bekannten Transkriptionsfaktor AreAp konnte mit Hilfe der blastp-Suche des NCBI in *Z. tritici* ein Protein mit signifikanter Sequenzhomologie (E-value  $1e-154$ ) identifiziert werden (NCBI Accession EGP87068.1; JGI Protein-ID 109392). Ein Teil der für das *Z. tritici* AreAp (ZtAreAp) kodierenden Gensequenz wurde durch Restriktion mit Endonukleasen entfernt und durch die kodierende Sequenz einer Hygromycin-Phosphotransferase (HPT-Kassette) ersetzt. Das rekombinante Konstrukt wurde mit Hilfe der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation in *Z. tritici* transferriert. Die homologe Rekombination konnte mittels Southern Blot Analyse verifiziert

werden. Die Klonierungsstrategien sowie der Nachweis der homologen Rekombination im Genom der Mutante sind in Anhang II bzw. Anhang III dargestellt.

### 3.2.2 Regulation der Genexpression von *ZtareA* in Abhängigkeit der Stickstoffquelle

Ein sehr kleiner E-value von  $1e-154$ , wie im blastp-Ergebnis des Vergleichs der Aminosäuresequenzen von AreAp aus *A. niger* und *Z. tritici*, bedeutet nicht zwangsläufig, dass beide Proteine dieselbe Funktion haben (Rost, 1999). Nachfolgend wurde zunächst nachgewiesen, dass ZtAreAp auch funktionell ein Homolog zu AreAp aus *Aspergillus* sp. ist.

Zur Untersuchung der Genexpressionsregulation von *ZtareA* in Abhängigkeit der verfügbaren Stickstoffquelle, wurden q-PCR Analysen nach Kultivierung von  $\Delta ZtareA$  und des WT-Stammes auf Stickstoffmangelmedium (N-MM) mit jeweils 10 mM, 25 mM und 50 mM Nitrat, Nitrit, Glutamin, Glutamat und Ammonium durchgeführt. Die assimilierten N-Quellen Glutamin, Glutamat und Ammonium sollten in Analogie zu *A. nidulans* und *N. crassa* zur Repression der *areA*-Genexpression führen. Ist keine der bevorzugten, assimilierten N-Quellen verfügbar, dafür jedoch z.B. Nitrat als einzige N-Quelle vorhanden, sollte die Genexpression von *ZtareA* induziert werden. AreAp transloziert dann in den Zellkern und induziert im Anschluss die Expression metabolischer Enzyme für die Nitratassimilation (Marzluf, 1993).

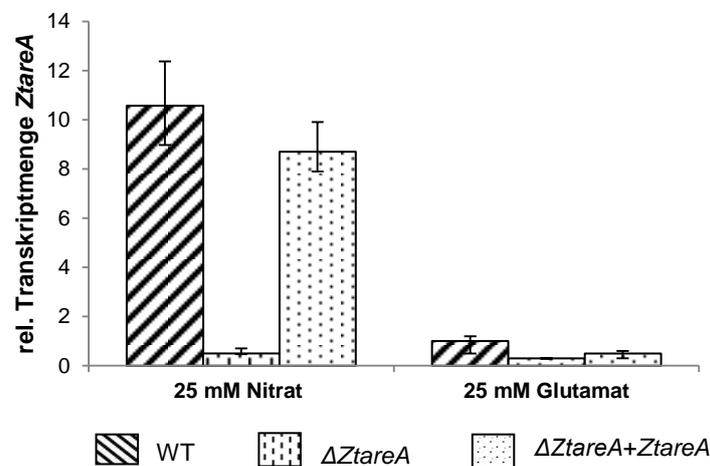
Im Vorfeld der q-PCR Analyse wurden Sporensuspensionen von  $\Delta ZtareA$  und des WT-Stammes auf N-MM Agarplatten mit der jeweiligen N-Quelle ausplattiert und für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Sporen von der Agarplatte geschwemmt und die RNA extrahiert.

Auf glutamathaltigem N-MM war die relative (rel.) Transkriptmenge von *ZtareA* am geringsten, d.h. die Repression der *ZtareA*-Genexpression war auf glutamathaltigem Medium am stärksten ausgeprägt. Nach Kultivierung auf ammonium- und glutaminhaltigen Medien waren die Ergebnisse der q-PCR Analyse sehr ähnlich (Daten nicht gezeigt), jedoch war die Transkriptmenge von *ZtareA* etwas höher als auf glutamathaltigem Nährmedium, weshalb die Kultivierung auf Glutamat als reprimierende Bedingung ausgewählt wurde. Alle weiteren q-PCR Ergebnisse wurden deshalb relativ zur Transkriptmenge auf N-MM mit Glutamat dargestellt.

Bei den eingesetzten Konzentrationen der jeweiligen N-Quellen konnte kein Unterschied in Bezug auf die *ZtareA* Transkriptmenge festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Beispielhaft werden im Folgenden die Ergebnisse der q-PCR nach Kultivierung auf N-MM mit 25 mM Nitrat bzw. Glutamat gezeigt.

Die relative Transkriptmenge von *ZtareA* war im WT in Gegenwart von Nitrat im Vergleich zu Glutamat um das etwa zehnfache gesteigert (Abbildung 4).

Bei  $\Delta ZtareA$  konnten unabhängig von der Stickstoff-Quelle nur minimale Transkriptmengen von *ZtareA* detektiert werden. Nach der ektopischen Reintegration der nativen *ZtareA* Gensequenz in das Genom von  $\Delta ZtareA$ , war die *ZtareA* Transkriptmenge in der komplementierten Mutante wieder vergleichbar zum WT.



**Abbildung 4: Relative Transkriptmenge von *ZtareA* bei Kultivierung auf N-MM mit Nitrat bzw. Glutamat.** Dargestellt ist die rel. Transkriptmenge von *ZtareA*, bezogen auf die Transkriptmenge im WT-Stamm bei Kultivierung auf N-MM mit Glutamat. Untersucht wurde die rel. Transkriptmenge von *ZtareA* im Wildtyp (WT), der *loss of function* Mutante  $\Delta ZtareA$  und der komplementierten Mutante  $\Delta ZtareA+ZtareA$  auf N-MM mit jeweils 25 mM Nitrat bzw. Glutamat als N-Quelle. Als *Housekeeping* Gen wurde  $\beta$ -Tubulin verwendet.

### 3.2.3 Phänotypische Untersuchung von $\Delta ZtareA$

#### 3.2.3.1 Wachstum auf unterschiedlichen Stickstoffquellen

Der Transkriptionsfaktor AreAp reguliert in Ascomyceten die Genexpression metabolischer Enzyme als zelluläre Antwort auf die vorhandene Stickstoffquelle. Die mögliche Funktion von ZtAreAp in *Z. tritici* wurde mittels vergleichender Wachstumsanalysen einer  $\Delta ZtareA$  *loss of function* Mutante und des WT-Stammes auf unterschiedlichen Stickstoffquellen untersucht.

Als N-Quellen wurden Asparagin, Aspartat, di-Ammoniumtartrat, Harnstoff, Glutamin, Alanin, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat in einer Konzentration von 25 mM verwendet. Das Wachstum von  $\Delta ZtareA$  und der komplementierten Mutante  $\Delta ZtareA+ZtareA$  wurde vergleichend zum WT analysiert.

Beim Wachstum von  $\Delta ZtareA$  konnte auf allen N-Quellen, bis auf Asparagin, ein Unterschied zum Wachstum des WTs beobachtet werden (Abbildung 5). Besonders auffällig war die ausbleibende Dunkelfärbung der  $\Delta ZtareA$ -Kolonien nach Inkubation auf N-MM mit Aspartat und Natriumnitrat. Nach Inkubation auf N-MM mit di-Ammoniumtartrat ( $C_4H_{12}N_2O_6$ ) sowie Harnstoff und Alanin konnte ebenfalls eine hellere Färbung von  $\Delta ZtareA$  beobachtet werden. Bei Wachstum auf allen aufgezählten Medien, mit Ausnahme von N-MM+ $NaNO_3$ , konnte nach längerer Inkubationsdauer, mit einer Verzögerung von etwa 7 Tagen, auch bei  $\Delta ZtareA$  eine dunkle Pigmentierung der Kolonien beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das Wachstum der  $\Delta ZtareA$ -Kolonien auf N-MM+ $NaNO_3$  war bei längerer Inkubationsdauer unverändert.

Durch die ektopische Reintegration des *ZtareA*-Gens in das Genom von  $\Delta ZtareA$  konnte der WT-Phänotyp wieder hergestellt werden.



**Abbildung 5: Wachstum von  $\Delta ZtareA$ , dem Wildtyp-Stamm und der komplementierten Mutante  $\Delta ZtareA+ZtareA$  in Gegenwart unterschiedlicher Stickstoffquellen.** Die Inkubation erfolgte auf N-MM Agarplatten mit je 25 mM der Stickstoffquelle bei 16 °C für 14 Tage. Der Maßstab entspricht 5 mm.

Weiterhin war bei den Wachstumsversuchen zu erkennen, dass  $\Delta ZtareA$  auf Nitrat und Nitrit nicht bzw. nur sehr schlecht wachsen konnte. Während beim WT und  $\Delta ZtareA+ZtareA$  auf diesen Medien ein deutliches Wachstum zu beobachten war, blieben die  $\Delta ZtareA$  Kolonien während des gesamten Inkubationszeitraums unverändert (Abbildung 5). Die geringe Wachstumsgeschwindigkeit von  $\Delta ZtareA$  auf Nitrat und

Nitrit konnte in nachfolgenden Experimenten in Submerskulturen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Auf Glutamin und Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) war eine ausgeprägte Myzelbildung von  $\Delta ZtareA$  im Vergleich zu den beiden anderen Stämmen zu beobachten. Auf Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) hingegen bildete  $\Delta ZtareA$  nur am Rand der Kolonie Myzel, während die Kolonien des WT-Stammes und von  $\Delta ZtareA+ZtareA$  komplett mit weißem Luftmyzel bedeckt waren.

### 3.2.3.2 Regulation der Genexpression der Nitrat- und Nitritreduktasegene durch ZtAreAp

Die Expression der für Nitrat- und Nitritreduktasen kodierenden Gene steht bei vielen Ascomyceten unter der positiven Regulation von AreAp (Kudla *et al.*, 1990; Marzluf, 1993). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *Z. tritici* in Gegenwart einer der bevorzugten N-Quellen Glutamin, Glutamat oder Ammonium, die Expression von *ZtareA* reprimiert war (Abbildung 4). Als direkte Folge dessen wurde angenommen, dass die Expression der Nitrat- und Nitritreduktase-Gene ebenfalls reprimiert ist. Ist keine der bevorzugten N-Quellen verfügbar, aber eine alternative N-Quelle wie Nitrat vorhanden, so war die *ZtareA* Transkriptmenge gesteigert (Abbildung 4). Demnach sollte wiederum die Expression der Nitrat- und Nitritreduktase-Gene induziert werden, um die alternativen N-Quellen verstoffwechseln zu können.

Basierend auf dieser Hypothese wurde mittels q-PCR Analysen überprüft, ob das stark eingeschränkte Wachstum von  $\Delta ZtareA$  auf nitrat- bzw. nitrithaltigem Nährmedium mit der geringeren Transkriptmenge der für die metabolischen Enzyme kodierenden Gene, durch die Inaktivierung von *ZtareA* in Verbindung zu bringen ist.

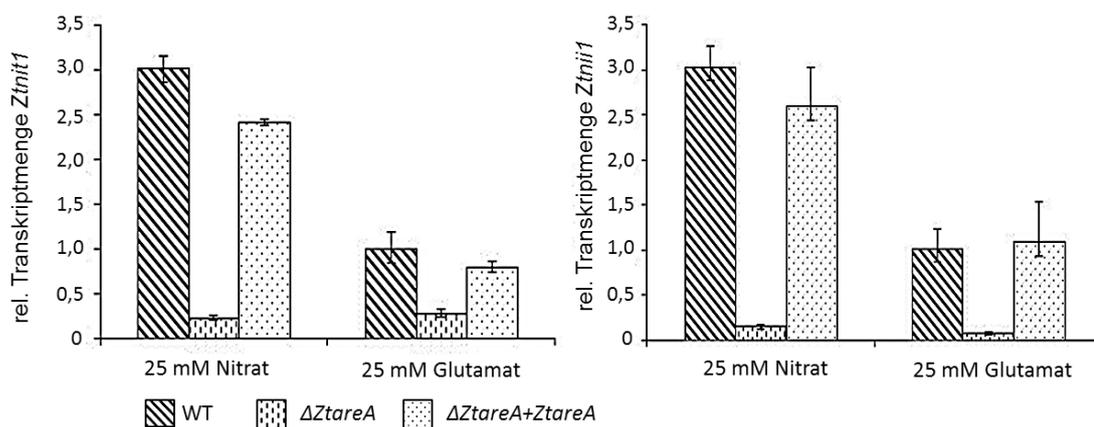
Im Genom von *Z. tritici* wurden bislang keine Nitrat- bzw. Nitritreduktase kodierende Gene annotiert, weshalb zuerst Homologe zu Genen aus verwandten Ascomyceten gesucht wurden, die im Stickstoffmetabolismus involviert sind.

Ein hypothetisches Protein (NCBI Accession XP\_003849160.1; JGI Protein-ID 111003) mit signifikanter Sequenzhomologie zur Nitratreduktase aus den eng verwandten Pilzen *Zymoseptoria brevis* (E-value 0.0) bzw. *Sphaerulina musiva* (E-value 0.0) konnte identifiziert werden. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der Proteine wurde angenommen, dass dieses hypothetische Protein von *Z. tritici* mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Nitratreduktase (abgekürzt ZtNit1p) ist.

Ein hypothetisches Protein (NCBI Accession XP\_003848835.1; JGI Protein-ID 76215) mit einer signifikanten Sequenzhomologie zur Nitritreduktase aus z.B. *Z. brevis* (E-value 0.0) bzw. *S. musiva* (E-value 0.0), aber auch aus den *Aspergillus* Arten *A. nidulans* und *A. fumigatus* (jeweils E-value 0.0), konnte identifiziert werden und wurde mit der Bezeichnung ZtNii1p abgekürzt.

Um einen direkten Einfluss von ZtAreAp auf die Regulation der Genexpression von *Ztnit1* und *Ztnii1* in Abhängigkeit der angebotenen Stickstoffquelle zu untersuchen, wurde mit Hilfe von q-PCR Analysen unter den jeweiligen Bedingungen die Expression der für ZtNit1p bzw. ZtNii1p kodierenden Gene in  $\Delta ZtareA$  untersucht und mit der Transkriptmenge im WT und  $\Delta ZtareA+ZtareA$  verglichen.

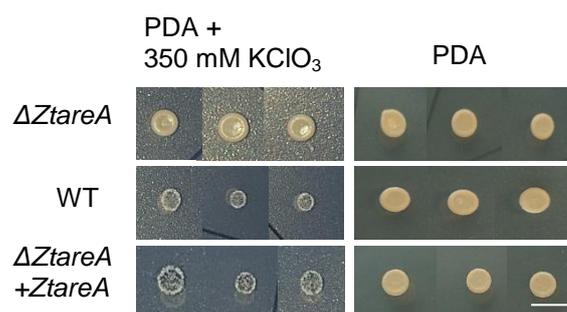
Mittels q-PCR Analysen konnte die positive Regulation von *Ztnit1* und *Ztnii1* durch ZtAreAp in Abhängigkeit von der vorhandenen N-Quelle bestätigt werden (Abbildung 6). Bei Kultivierung des WT-Stammes auf nitrathaltigem Medium war die relative Transkriptmenge von *Ztnit1* und *Ztnii1* im Vergleich zur Kultivierung auf glutamathaltigem Medium jeweils um etwa das Dreifache gesteigert. Bei  $\Delta ZtareA$  konnten unabhängig von der gebotenen Stickstoffquelle nur sehr geringe Transkriptmengen für die untersuchten Gene detektiert werden. Bei  $\Delta ZtareA+ZtareA$  war der WT-Phänotyp in Bezug auf die *Ztnit1*- und *Ztnii1*-Genexpression auf nitrat- und glutamathaltigem Medium zu beobachten.



**Abbildung 6: Relative Transkriptmengen von *Ztnit1* und *Ztnii1* bei Kultivierung auf N-MM mit Nitrat bzw. Glutamat.** Dargestellt sind rel. Transkriptmengen von *Ztnit1* und *Ztnii1*, bezogen auf die Transkriptmenge des WT-Stammes nach Kultivierung auf N-MM mit Glutamat. Untersucht wurden die rel. Transkriptmengen nach Inkubation des WT-Stammes,  $\Delta ZtareA$  und  $\Delta ZtareA+ZtareA$  auf N-MM Agarplatten mit jeweils 25 mM Nitrat und Glutamat für 24 h. Als *Housekeeping* Gen wurde  $\beta$ -Tubulin verwendet.

Der Zusammenhang zwischen der Inaktivierung von *ZtareA* und der geringen Transkriptmenge der *Znit1* und *Zni11*-Gene konnte zusätzlich mit Hilfe des Kaliumchlorat-Assays bestätigt werden (Abbildung 7). Kaliumchlorat ( $\text{KClO}_3$ ) ist neben Natriumnitrat ein Substrat der Nitratreduktase und wird von dieser zu Kaliumchlorit ( $\text{KClO}_2$ ) umgewandelt. Kaliumchlorit ist toxisch und führt zum Zelltod (van Wijk *et al.*, 1998). Der Kaliumchlorat-Assay wird angewendet um phänotypisch das Vorhandensein funktionsfähiger Nitratreduktasen in Pilzen zu untersuchen. Kann der Organismus auf  $\text{KClO}_3$  wachsen, kann daraus die Abwesenheit funktionsfähiger Nitratreduktasen hergeleitet werden (López-Berges *et al.*, 2010).

$\Delta ZtareA$  konnte im Vergleich zum WT und der komplementierten Mutante deutlich besser auf PDA + 350 mM  $\text{KClO}_3$  wachsen (Abbildung 7). Das Wachstumsverhalten auf PDA-Medium ohne Zusatz von  $\text{KClO}_3$  war bei keinem der untersuchten Stämme beeinträchtigt.

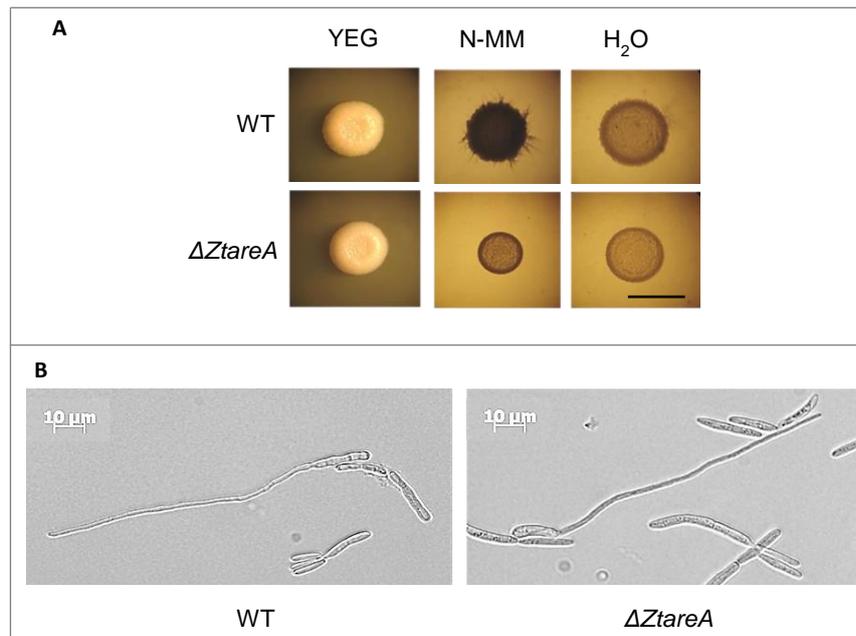


**Abbildung 7: Wachstum von  $\Delta ZtareA$  und  $\Delta ZtareA+ZtareA$  auf Kaliumchlorat.** Die Kulturen wurden auf PDA-Festmedium jeweils mit und ohne die Zugabe von 350 mM Kaliumchlorat ( $\text{KClO}_3$ ) 7 Tage bei 16 °C inkubiert. Der Maßstab entspricht 1 cm.

### 3.2.3.3 Untersuchung der Keimungsfähigkeit von $\Delta ZtareA$

Um die Keimungsfähigkeit von  $\Delta ZtareA$  zu untersuchen, wurde das Wachstum auf den *dimorphic-switch* induzierenden Medien N-MM und  $\text{H}_2\text{O}$ -Agar (Kema *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 2005; Mehrabi *et al.*, 2006) im Vergleich zum YEG-Vollmedium untersucht. Das Wachstum des WT-Stammes und  $\Delta ZtareA$  wurde mit Hilfe eines Binokulars fotografisch dokumentiert und verglichen.

Auf YEG-Medium wuchsen sowohl der WT, als auch  $\Delta ZtareA$  hefeartig (Abbildung 8.A). Auf N-MM und  $\text{H}_2\text{O}$ -Agar war bei  $\Delta ZtareA$  im Vergleich zum WT kein Luftmyzel am Rand der Kolonien zu sehen.

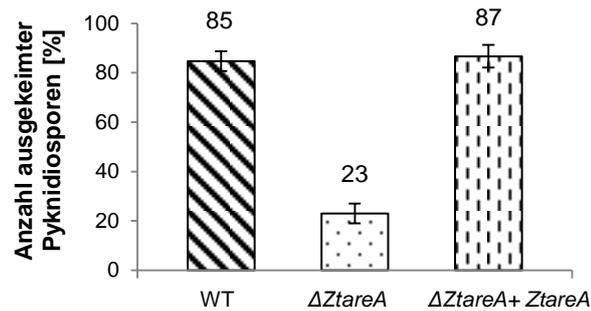


**Abbildung 8.A: Untersuchung der Fähigkeit von  $\Delta ZtareA$  zur dimorphen Transition auf unterschiedlichen Medien.** Gezeigt sind Kolonien des WT-Stammes und  $\Delta ZtareA$  auf dem Vollmedium YEG und den *dimorphic-switch* induzierenden Medien Stickstoff-Mangelmedium (N-MM) und H<sub>2</sub>O-Agar. Der Maßstab entspricht 1 cm. **B: Keimungsassay von Sporen des  $\Delta ZtareA$ - und des Wildtyp-Stammes.** Ein Objektträger wurde mit 900 µl Wasseragar + 0,00025 % Biotin und 0,001 % Thiamindichlorid vorbereitet und 15 µl einer Sporensuspension mit der Konzentration  $5 \times 10^7$  Sporen/ml darauf pipettiert. In einer feuchten Dunkelkammer wurden die Objektträger 3 Tage bei RT inkubiert.

Zur Validierung des Wachstumstests auf Agarplatten, welcher makroskopisch ausgewertet wurde, sollte mit dem Keimungsassay die Fähigkeit der dimorphen Transition von  $\Delta ZtareA$  mikroskopisch untersucht und die Keimungsrate bestimmt werden.

Nach dreitägiger Inkubation, auf mit Wasseragar beschichteten Objektträgern, konnte beim WT sowie bei  $\Delta ZtareA$  das Auskeimen der Pyknidiosporen und somit die dimorphe Transition beobachtet werden (Abbildung 8.B).

Auffällig war bei der Bestimmung der Keimungsrate, dass die Konidienkeimung von  $\Delta ZtareA$  im Vergleich zum WT stark reduziert war. Die Keimungsrate des WTs betrug 85 %, wogegen nur 23 % der  $\Delta ZtareA$ -Sporen auskeimten. Die Keimungsrate in der Komplementierungsmutante entsprach der des WTs (Abbildung 9).



**Abbildung 9: *In vitro* Keimungsassay zur Bestimmung der Keimungsrate von  $\Delta ZtareA$ .** Es wurden 100  $\mu$ l einer Sporensuspension ( $10^6$  Sporen/ml) des WT-Stammes,  $\Delta ZtareA$  sowie  $\Delta ZtareA + ZtareA$  auf Objektträger mit Wasseragar + 0,00025 % Biotin und 0,001 % Thiamindichlorid für 72 h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden die gekeimten Sporen gezählt. Dargestellt sind hier die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

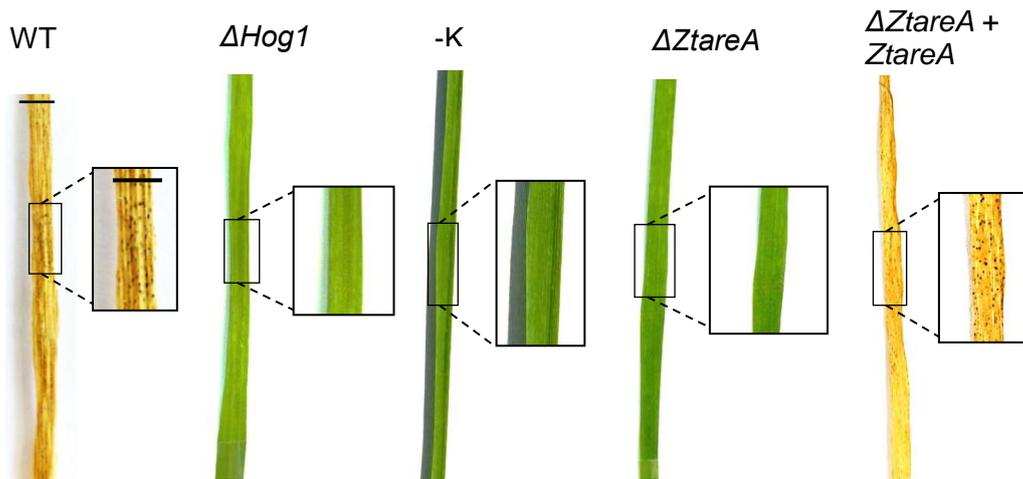
#### 3.2.3.4 Phytopathogenitäts-Assay

Die generierte *loss of function* Mutante  $\Delta ZtareA$  wurde hinsichtlich der Pathogenität gegenüber intakten Weizenpflanzen der Sorte Riband untersucht (vgl. 2.3.3). Dazu wurden die Primärblätter von 5 - 7 Tage alten Weizenpflanzen mit einer Sporensuspension von  $5 \times 10^7$  Sporen/ml besprüht und 21 Tage bei Raumtemperatur und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus inkubiert.

Die Auswertung des Assays erfolgte makroskopisch und wurde fotografisch dokumentiert. Als Kontrolle wurden Weizenpflanzen jeweils mit einer Sporensuspension des WT-Stammes und der apathogenen Mutante  $\Delta Hog1$  (Mehrabi *et al.*, 2006) besprüht. Als Negativkontrolle (-K) diente  $H_2O_{UF}$ .

Im Vergleich zum WT, konnten beim Pathogenitäts-Assay mit  $\Delta ZtareA$  keine Symptome der *Septoria* Blattdürre auf den Weizenpflanzen beobachtet werden (Abbildung 10). Auf den mit dem WT inokulierten Pflanzen waren kleine, dunkelgefärbte Bereiche auf den Blättern sichtbar, bei denen es sich um die von *Z. tritici* gebildeten Pyknidien handelte. Zudem war neben der chlorotischen Blattaufhellung eine zunehmende Blattdürre zu sehen.

Durch das Einbringen des nativen *ZtareA*-Gens in das Genom der  $\Delta ZtareA$  Mutante konnte die Pathogenität wieder hergestellt werden, sodass die für die *Septoria* Blattdürre typischen Symptome auf der Weizenpflanze erkennbar waren.

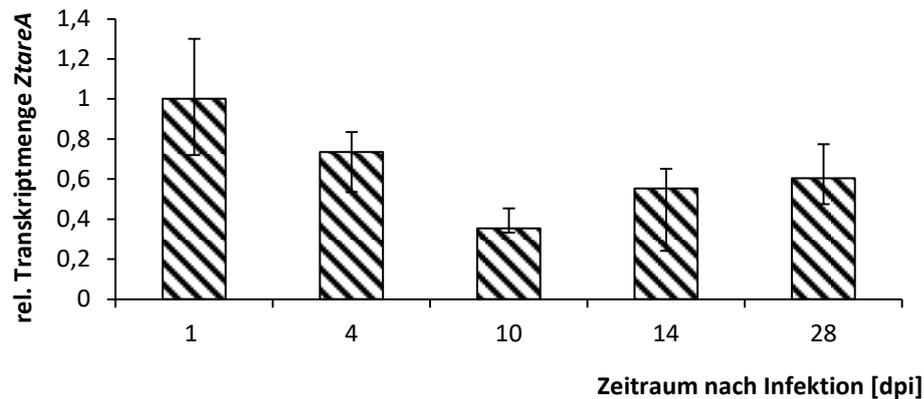


**Abbildung 10: Pathogenitäts-Assay von  $\Delta ZtareA$  auf Weizenpflanzen.** Abgebildet werden charakteristische Blattsegmente 21 Tage nach Infektion. Die Primärblätter von 5 - 7 Tage alten Weizenpflanzen (cv. Riband) wurden mit einer Sporensuspension von  $5 \times 10^7$  Sporen/ml besprüht und bei Raumtemperatur und natürlichem Tag-Nacht-Rhythmus inkubiert. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 1 cm.

### 3.2.3.5 Die Genexpression von *ZtareA* im Infektionsverlauf

Mittels q-PCR konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die relative Transkriptmenge von *ZtareA* im WT-Stamm während des gesamten Infektionsprozesses, im Vergleich zur *ZtareA* Transkriptmenge einen Tag nach Infektion (*days post infection*, dpi), reduziert war. Der Zeitpunkt 1 dpi wurde in diesem Versuch als zeitlicher Startpunkt der Infektion definiert, da aus der Literatur hervorgeht, dass *Z. tritici* ca. einen Tag benötigt um auszukeimen und in die Wirtspflanze einzudringen (Orton *et al.*, 2011; Rudd *et al.*, 2015). Die Transkriptmenge von 1 dpi sollte deshalb als Referenzwert für die Standardisierung dienen.

Zum Zeitpunkt 10 dpi war die Transkriptmenge von *ZtareA* auf 35 % der Ausgangsmenge reduziert. Nach 28 dpi, in der nekrotrophen Phase der Infektion, waren 60 % der ursprünglichen Transkriptmenge von *ZtareA* detektierbar (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** *In planta* Genexpressionsanalyse von *ZtareA* während des Infektionsverlaufes in Weizen. Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von *ZtareA* zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion (*days post infection*, dpi), standardisiert auf den Startpunkt der Infektion (1 dpi) und normalisiert auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin.

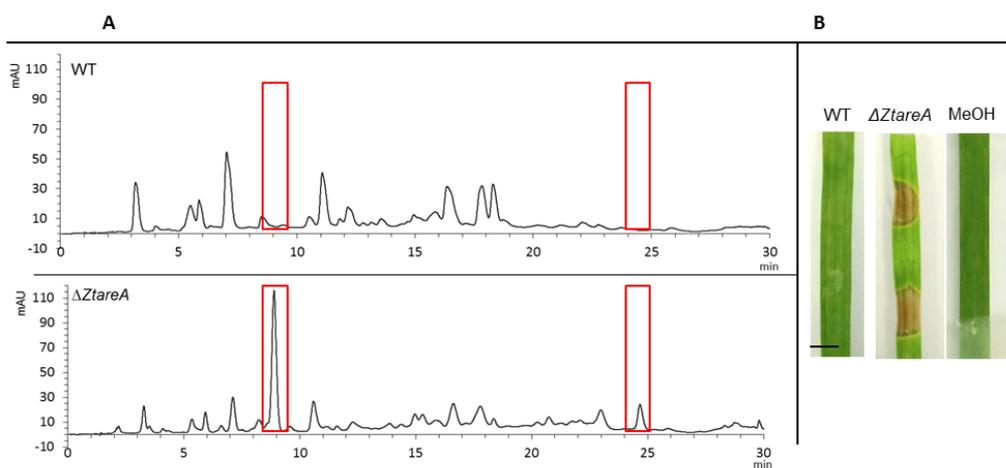
### 3.2.4 Untersuchung des Metabolitenspektrums von $\Delta ZtareA$

Aus *Z. tritici* konnte bis heute noch kein phytotoxischer Sekundärmetabolit isoliert und identifiziert werden (Rudd *et al.*, 2015). Die für Sekundärmetaboliten kodierenden Gencluster werden in diversen Ascomyceten durch AreAp positiv bzw. negativ reguliert (Brakhage, 2013; Tudzynski, 2014), weshalb in dieser Arbeit eine *ZtareA loss of function* Mutante generiert wurde, um deren Sekundärmetabolitenspektrum zu untersuchen. Hierfür wurden Fermentationsversuche unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen durchgeführt. Zunächst wurde  $\Delta ZtareA$  sowie der WT-Stamm im 250 ml und 500 ml Maßstab in verschiedenen Medien submers fermentiert (vgl. 2.4.1). Es wurden Kulturfiltrat- und Myzelextrakte (KFE bzw. ME) hergestellt (vgl. 2.4.3), welche im Anschluss mittels HPLC analysiert und auf phytotoxische Aktivität gegen Weizenblätter untersucht wurden.

Nach Fermentation des WT-Stammes und  $\Delta ZtareA$  in MM + 10 % Weizenblattextrakt (WE), konnten in den HPLC-Chromatogrammen der KFE von  $\Delta ZtareA$  Unterschiede zu dem des WTs beobachtet werden (Abbildung 12.A). Bei einer Retentionszeit von 8,47 min (Agilent 1100 Series HPLC-Anlage [A]) und 24,5 min [A] konnte im HPLC-Chromatogramm aus der Fermentation von  $\Delta ZtareA$  in MM + 10 % WE jeweils ein Signal beobachtet werden, das in den Extrakten aus der Fermentation des WTs nicht nachweisbar war.

Bei der Suche nach den beiden Verbindungen in der Reinsubstanzdatenbank des Instituts für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung (IBWF) in Kaiserslautern, konnten keine Übereinstimmung zu bekannten Substanzen gefunden werden.

Zudem konnte eine phytotoxische Aktivität der KFE aus der Fermentation von *ΔZtareA* in MM + 10 % WE gegen Weizenblätter beobachtet werden, welche beim KFE aus der Fermentation des WT-Stammes nicht beobachtet werden konnte (Abbildung 12.B).



**Abbildung 12.A: HPLC-Chromatogramm der Kulturfiltratextrakte aus der Fermentation von *ΔZtareA* und des Wildtyp-Stammes in MM + 10 % WE im 500 ml Maßstab.** A: Dargestellt wird die Absorption bei 250 nm, gemessen mit der Standard-Methode an der Agilent 1100 Series in Kaiserslautern [A]. Den markierten Signalen konnte keine bekannte Substanz aus der Reinsubstanzen-Datenbank des IBWF Kaiserslautern zugeordnet werden. B: Phytotoxizitäts-Assay mit den Kulturfiltratextrakten aus der Fermentation von *ΔZtareA* und des WT-Stammes in MM + 10 % WE. Es wurden 100 µg in Methanol gelöstes Kulturfiltratextrakt aus der Fermentation mit dem WT und *ΔZtareA* auf Weizenblätter appliziert und 7 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 Tagen waren im Extrakt aus der Fermentation von *ΔZtareA* an der Stelle des aufgetragenen Extraktes braune Läsionen zu sehen. Als Kontrolle wurde Methanol (MeOH) aufgetragen. Der Maßstab entspricht 5 mm.

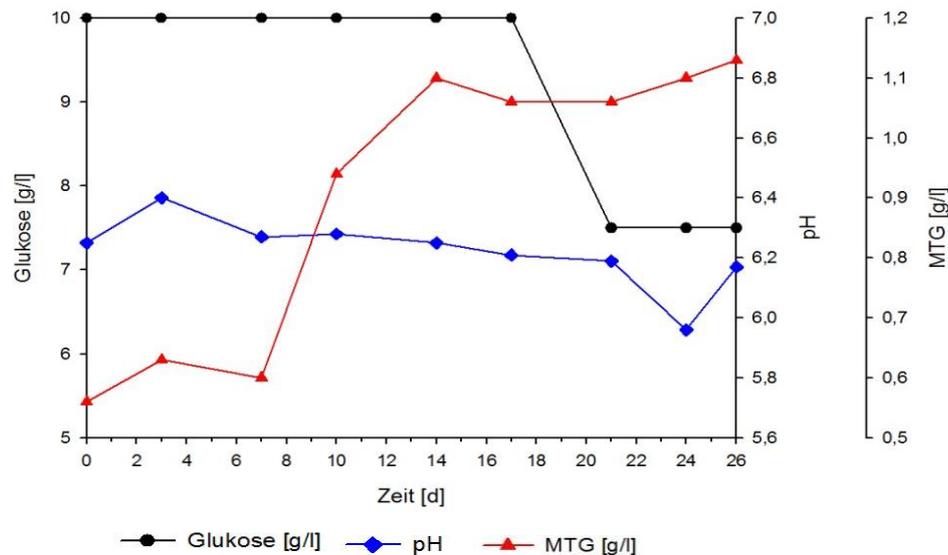
#### 3.2.4.1 Fermentation von *ΔZtareA* im 20 L Maßstab

Um genügend Rohextrakt zu gewinnen wurde *ΔZtareA* im 20 L Maßstab in MM + 10 % WE fermentiert (vgl. 2.4.2). Die Temperatur im Fermenter betrug 22 °C bei einer Rührerdrehzahl von 150 rpm und einer Begasungsrate mit Luft von 3 L/min. Es wurden jeden dritten Tag Proben aus dem Fermenter entnommen und der pH-Wert, der Glukosegehalt sowie das Myzeltrockengewicht bestimmt (Abbildung 13).

Zusätzlich zur Bestimmung der o.g. Fermentationsparameter wurde aus jeder Tagesprobe ein Rohextrakt hergestellt (vgl. 2.4.3) und auf phytotoxische Aktivität gegen

Weizenblätter untersucht. Nach 26 Tagen wurde die Fermentation beendet, da eine deutliche phytotoxische Aktivität des Extraktes gegen Weizenblätter beobachtet wurde. Im Anschluss wurden aus dem gesamten Kulturfiltrat bzw. Myzel der Kultur Rohextrakte hergestellt (vgl. 2.4.3).

Da im Myzelextrakt keine Aktivität gegen Weizenblätter beobachtet wurde, wurde dieses verworfen und nur das KFE weiter untersucht.

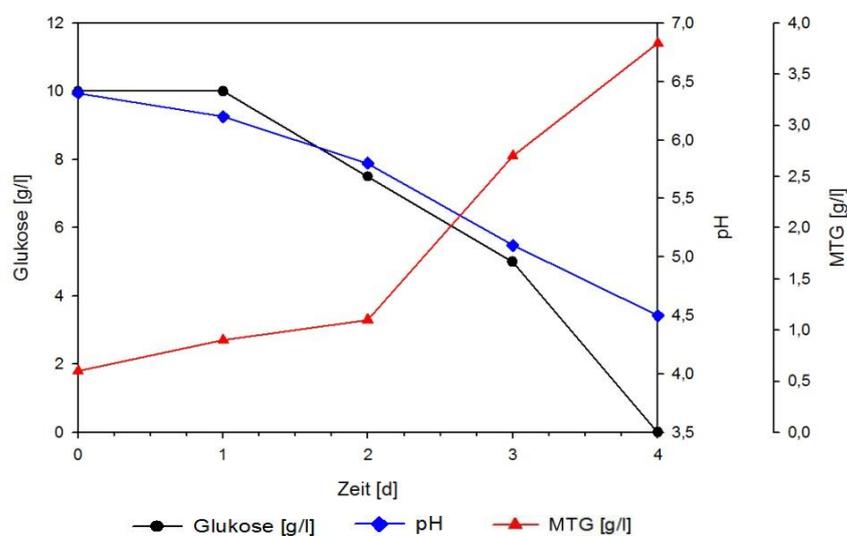


**Abbildung 13: Parameter einer Fermentation von  $\Delta ZtareA$  in MM + 10 % WE.** Dargestellt sind pH-Wert, Glukosegehalt und Myzeltrockengewicht (MTG) im zeitlichen Verlauf der Fermentation. Fermentiert wurde im 20 L Maßstab bei 22 °C, einer Rührerdrehzahl von 150 rpm und einer Begasungsrate mit Luft von 3 L/min über einen Zeitraum von 26 Tagen.

Auffallend war, dass  $\Delta ZtareA$  während des gesamten Fermentationszeitraumes in MM + 10 % WE kaum Glukose aus dem Medium aufnahm (2,5 g in 26 Tagen) und der pH-Wert der Kultur weitestgehend konstant um einen Wert von 6,2 blieb. Auch die Zunahme an Myzeltrockenmasse über die gesamte Fermentationszeit war mit 0,6 g/L gering.

Im Vergleich zu  $\Delta ZtareA$  änderten sich die Fermentationsparameter bei der submersen Kultivierung des WT's im selbigen Medium deutlich (Abbildung 14). Beispielfhaft werden hier die Parameter der Fermentation im 1 L-Maßstab gezeigt. Der Fermentationsverlauf von  $\Delta ZtareA$  verlief in 1 L Medium wie im 20 L Maßstab.

Während  $\Delta ZtareA$  kaum freie Glukose aus dem Medium aufnahm, verbrauchte der WT diese innerhalb von 4 Tagen vollständig. Das Myzeltrockengewicht des WT's stieg in diesem Zeitraum deutlich (von 0,6 g/L auf 3,8 g/L) und der pH-Wert sank von anfänglich 6,3 auf 4,5 ab.



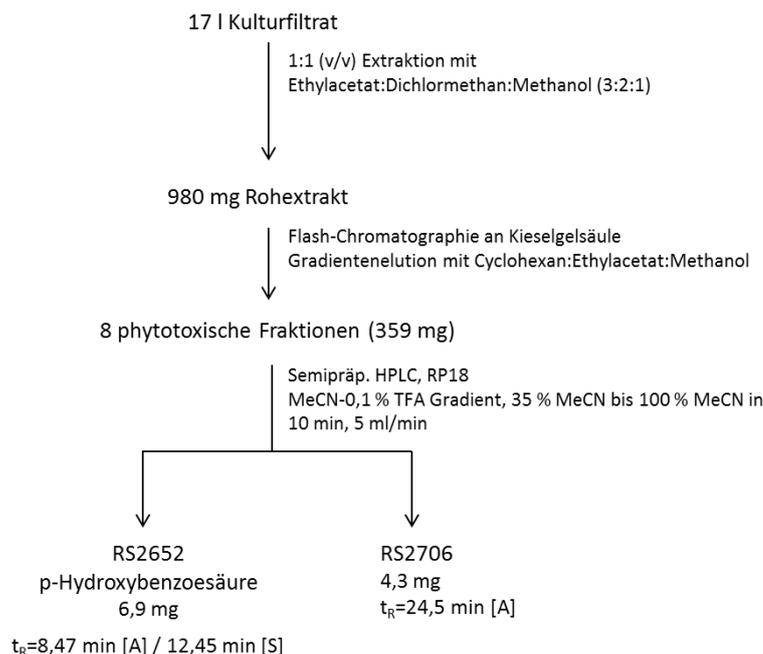
**Abbildung 14: Parameter einer Fermentation des *Z. tritici* Wildyp-Stammes in MM + 10 % WE.** Dargestellt sind pH-Wert, Glukosegehalt und Myzeltrockengewicht (MTG) im zeitlichen Verlauf der Fermentation. Fermentiert wurde im 1 L-Maßstab bei 22 °C und 125 rpm.

#### 3.2.4.2 Isolierung von RS2652 und RS2706

Für eine Vorreinigung des Kulturfiltratextraktes von *ΔZtareA* in MM + 10 % WE wurde eine Flash-Chromatographie an Kieselgel durchgeführt. Eluiert wurde mit einem Gradienten aus Cyclohexan, Ethylacetat und Methanol (vgl. 2.4.6). Das Eluat wurde nach Volumen fraktioniert, wobei immer ein Säulenvolumen in einem Gefäß gesammelt wurde. Die gewonnenen 16 Fraktionen wurden auf phytotoxische Aktivität gegen Weizenblättern untersucht. Es konnten acht aktive Fraktionen (Fraktionen 3 - 10) identifiziert werden, die im weiteren Verlauf vereinigt wurden. Die interessanten Substanzen wurden mittels semipräparativer HPLC mit einem Gradienten aus Acetonitril und 0,1 % Trifluoressigsäure daraus isoliert (vgl. 2.4.7).

Es konnten je 6,9 mg RS2652 ( $t_R = 8,47$  min [A] / 12,45 min [S]) und 4,3 mg RS2706 ( $t_R = 24,5$  min [A]) isoliert werden.

Das Aufarbeitungsschema des Kulturfiltrates ist in Abbildung 15 dargestellt.



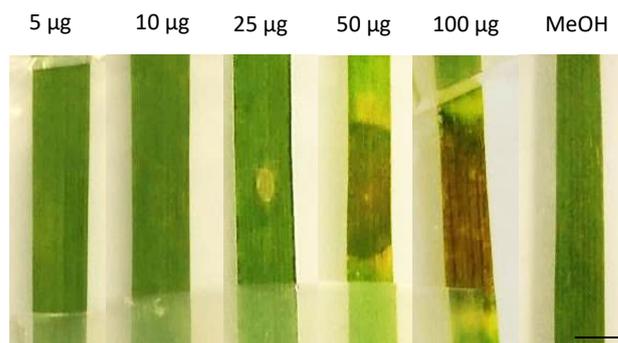
**Abbildung 15: Aufreinigungsschema von RS2652 und RS2706 aus dem Kulturfiltratextrakt der Fermentation von *ΔZtareA* in MM + 10 % WE.** Aus der Fermentation im 20 L Maßstab konnten 6,9 mg p-Hydroxybenzoesäure (RS2652) und 4,3 mg RS2706 isoliert werden. [A] gemessen mit der Agilent 1100 Series, [S] gemessen mit der Shimadzu Prominence Anlage.

#### 3.2.4.3 Strukturaufklärung und Aktivität von RS2652

Die Strukturaufklärung wurde von Dr. Jamal Ouazzani und Geraldine Le-Goff vom Centre de Recherche de Gif, Institut de Chimie des Substances Naturelles in Gif-sur-Yvette, Frankreich, in Kooperation mit Prof. Dr. Marc-Henri Lebrun vom INRA-Agro Institut in Paris durchgeführt.

RS2652 konnte als p-Hydroxybenzoesäure (p-HBS) identifiziert werden, eine in der Literatur bereits beschriebene Substanz (Blum, 1996; Li *et al.*, 2010; Ahrabi *et al.*, 2011). Die Summenformel dieser Phenolsäure ist  $C_7H_6O_3$  und das Molekulargewicht ist 138 Da.

Ab einer Menge von 25  $\mu$ g p-HBS konnten auf Weizenblättern nach fünftägiger Inkubation gelb-braune Läsionen beobachtet werden (Abbildung 16). Die Intensität der Läsionen nahm proportional mit der applizierten p-HBS Menge zu.



**Abbildung 16: Phytotoxizitäts-Assay mit p-Hydroxybenzoesäure.** Abgebildet sind Blattsegmente, auf welche verschiedene Mengen der p-Hydroxybenzoesäure appliziert wurden. Die Kontrolle wurde mit Methanol (MeOH) behandelt. Ab 25 µg war eine phytotoxische Aktivität der p-HBS zu beobachten. Der Maßstab entspricht 5 mm.

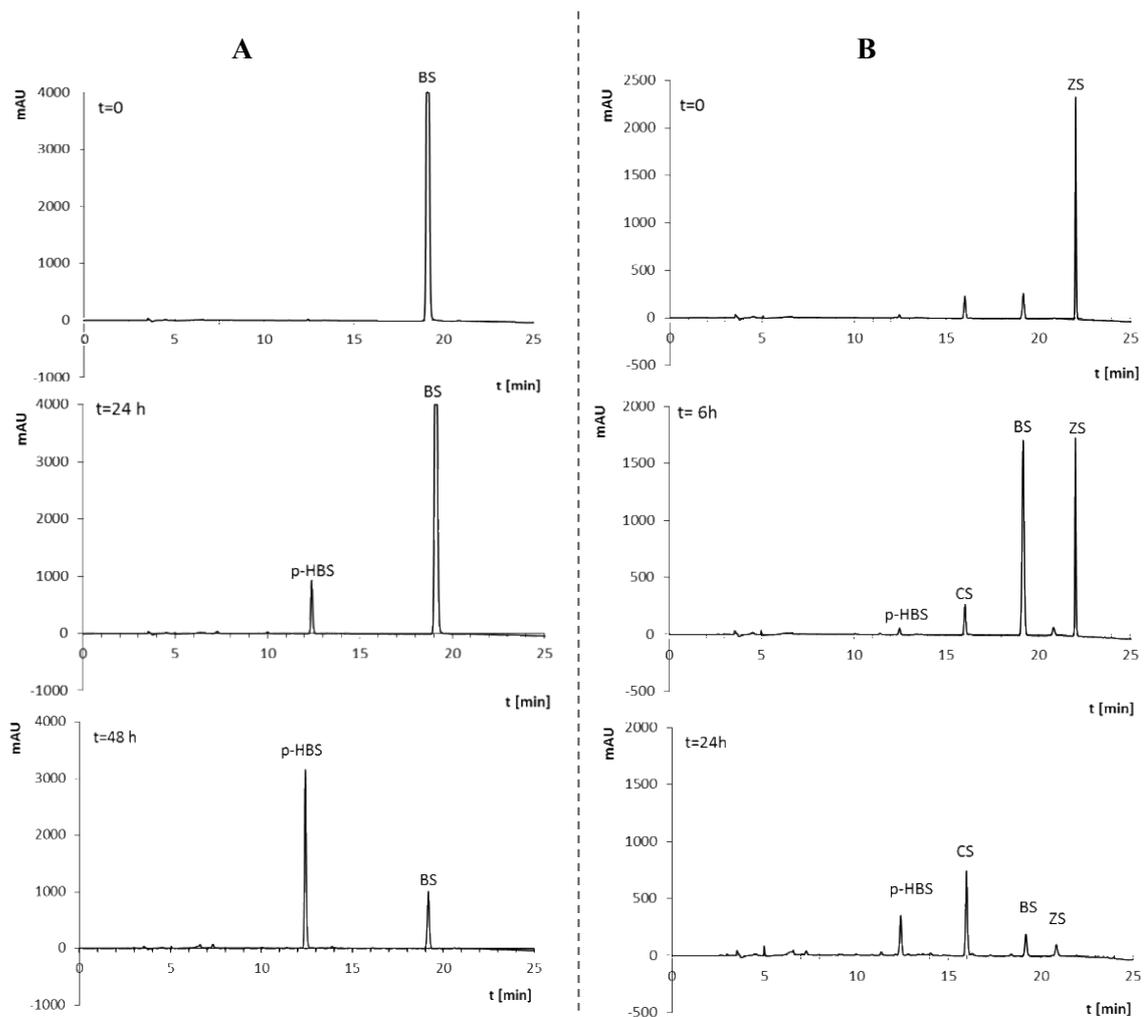
#### 3.2.4.4 Strukturaufklärung und Aktivität von RS2706

Bei der Substanz RS2706, einem Molekül der Masse 426 Da, konnte die Strukturformel im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Es handelt sich um eine unbekannte Verbindung mit einer phytotoxischen Aktivität gegen Weizenblätter ab einer applizierten Menge von 50 µg (Daten nicht gezeigt).

#### 3.2.4.5 Untersuchungen zur Biosynthese von p-Hydroxybenzoesäure

Um zu untersuchen ob eine der in Weizen natürlicherweise vorkommenden Phenolsäuren als Vorläufermolekül für die Synthese der p-HBS durch *Z. tritici* dienen könnte, wurden mit dem WT-Stamm IPO323 und  $\Delta ZtareA$  Fütterungsversuche mit einigen pflanzlichen Phenolsäuren durchgeführt. HPLC-Analysen des zur Fermentation verwendeten Weizenblattextraktes bestätigten das Vorhandensein von p-Coumarinsäure, Vanillinsäure, Salicylsäure und Ferulasäure. Zusätzlich wurden bei den Fütterungsversuchen noch weitere literaturbekannte Phenolsäuren aus Weizen eingesetzt (Kim *et al.*, 2006; Korošec *et al.*, 2014; Benincasa *et al.*, 2015). Mit den jeweiligen Phenolsäuren wurde im 500 ml Maßstab in Minimalmedium (MM), in einer Endkonzentration von 100 µM, fermentiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, das Kulturfiltrat extrahiert (vgl. 2.4.3) und die Bildung von p-HBS mittels HPLC überprüft. Es wurden folgende Phenolsäuren als Substrat eingesetzt: Benzoesäure, Zimtsäure, p-Coumarinsäure, Salicylsäure, Vanillinsäure und Ferulasäure.

Mit Hilfe der Fütterungsversuche konnte nachgewiesen werden, dass sowohl der WT-Stamm, als auch  $\Delta ZtareA$  in der Lage waren Benzoessäure (Abbildung 17.A) und Zimtsäure in p-HBS umzuwandeln. Die Konversion der Zimtsäure zu p-HBS fand über Benzoessäure als Zwischenprodukt statt (Abbildung 17.B). Zusätzlich entstand bei der Konversion von Zimtsäure p-Coumarinsäure.



**Abbildung 17: Umwandlung von Benzoessäure und Zimtsäure zu p-Hydroxybenzoessäure.** Dargestellt sind beispielhaft die HPLC-Chromatogramme der Extrakte des WT-Stammes bei 230 nm, analysiert an der Shimadzu Prominence HPLC-Anlage. **A:** Umwandlung von Benzoessäure (BS) zu p-Hydroxybenzoessäure (p-HBS). **B:** Umwandlung von Zimtsäure (ZS) zu p-HBS und die Entstehung von BS als Zwischenprodukt. Zusätzlich entstand p-Coumarinsäure (CS).

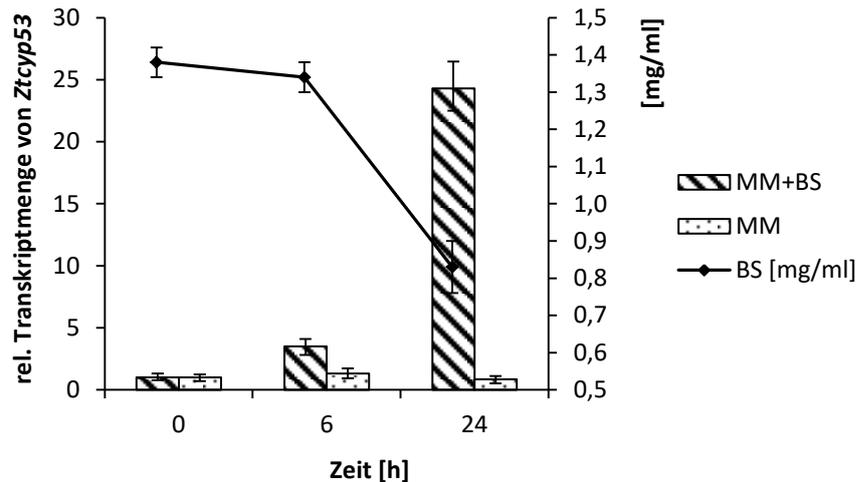
Die Familie der CYP53 Monooxygenasen, oder auch Benzoat-4-Monooxygenasen (B4MO), sind pilzspezifische Enzyme, welche bis heute nur in Vertretern der Asco- und Basidiomyceten gefunden wurden (Korošec *et al.*, 2014; Berne *et al.*, 2015). Sie katalysieren die Hydroxylierungsreaktion von Benzoesäure zu p-HBS an der para-Position des Benzolrings.

Da die Umwandlung von Benzoesäure zu p-HBS durch *Z. tritici* beobachtet werden konnte, wurde überprüft, ob im Genom von *Z. tritici* ein korrespondierendes *cyp53*-Gen existiert, das an der Metabolisierung beteiligt sein könnte.

Vor dieser Arbeit war noch kein *cyp53* im Genom von *Z. tritici* identifiziert, sodass zunächst mit Hilfe der blastp-Suche des NCBI anhand von Homologievergleichen eine Proteinsequenz identifiziert wurde (NCBI Accession: XP\_003856338.1; JGI Protein-ID 53213), die eine signifikante Sequenzhomologie zu CYP53p aus den eng verwandten Pilzen *Z. brevis* (E-value 0.0) bzw. *S. musiva* (E-value 0.0) besitzt. Laut der *Z. tritici* Genomdatenbank des JGI kommen in dessen Gensequenz Bereiche vor, welche mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ein N-terminales Signalpeptid für die Sekretion aus der Zelle kodieren.

Mittels q-PCR Analysen wurde untersucht, ob während der Metabolisierung der Benzoesäure durch *Z. tritici* die Genexpression von *Ztcyp53* reguliert wird. Dazu wurde aus den Fütterungsversuchen mit MM + 100 µM Benzoesäure *Z. tritici* Sporen gewonnen und die RNA isoliert.

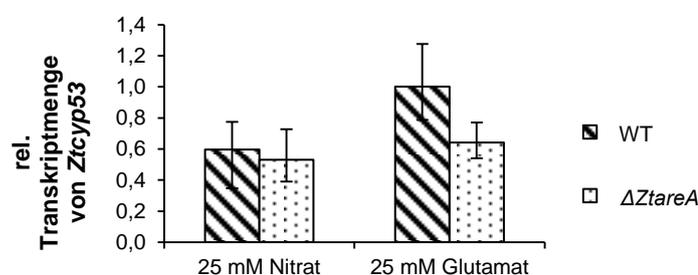
Die Genexpressionsanalyse bestätigte die gesteigerte Transkriptmenge von *Ztcyp53* im Verlauf der Metabolisierung der Benzoesäure. In MM ohne Benzoesäure war die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* konstant gering, während sie in Gegenwart der Benzoesäure nach 24 Stunden auf das ca. 24fache anstieg. Parallel dazu verringerte sich im Zeitraum von 24 h die Benzoesäuremenge von 1,4 mg/ml auf 0,8 mg/ml (Abbildung 18).



**Abbildung 18: Regulation der Genexpression der Benzoat-4-Monooxygenase *Ztcyp53* in Abhängigkeit des Substrates Benzoesäure.** Abgebildet sind die relativen Transkriptmengen von *Ztcyp53* im WT-Stamm IPO323 in Minimalmedium (MM) mit und ohne das Substrat Benzoesäure (BS) sowie die parallele Abnahme der BS-Menge im zeitlichen Verlauf [mg/ml]. Es wurden die Zeitpunkte 0, 6 und 24 h nach Inokulation untersucht. Die Transkriptmengen sind relativ zur Nullprobe, dem Zeitpunkt der Inokulation, dargestellt und auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin normalisiert.

Mit Hilfe von q-PCR Analysen wurde überprüft, ob die Regulation der Genexpression von *Ztcyp53* durch *ZtAreAp* reguliert wird. Dazu wurden N-MM Agarplatten mit jeweils 25 mM Nitrat (*AreAp*-induzierende Bedingung) und Glutamat (*AreAp*-reprimierende Bedingung) mit dem WT und  $\Delta ZtareA$  inokuliert und die RNA nach 24stündiger Inkubation isoliert.

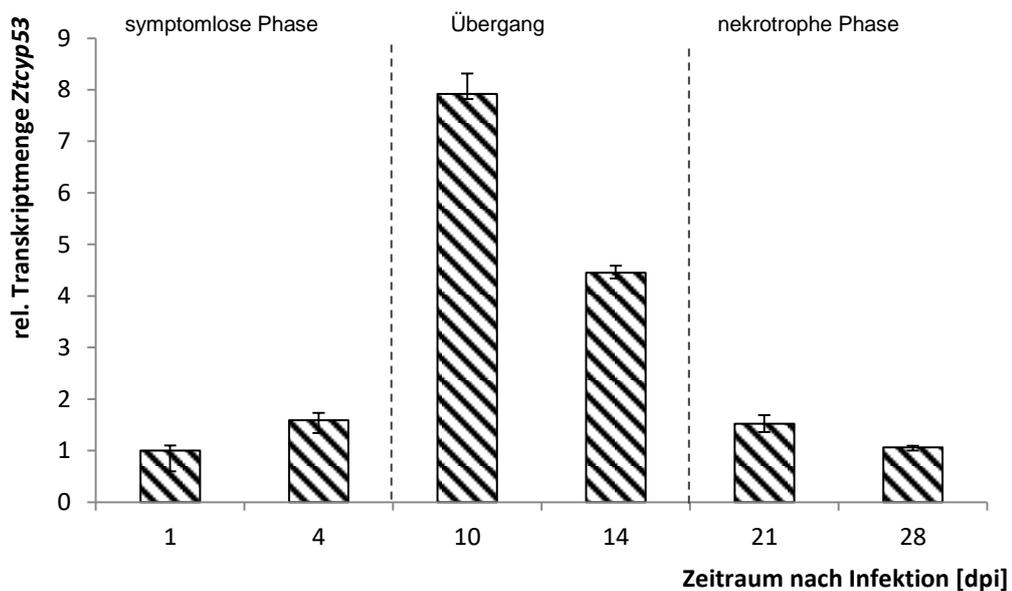
Weder beim WT-Stamm, noch bei  $\Delta ZtareA$  konnte nach Inkubation auf nitrat- und glutamathaltigem Medium eine signifikante Genregulation von *Ztcyp53* beobachtet werden (Abbildung 19). Die relativen Transkriptmengen von *Ztcyp53* der Mutante und des WT-Stammes nach Kultivierung auf nitrat- bzw. glutamathaltigem Medium unterschieden sich nicht signifikant.



**Abbildung 19: Untersuchung der Genregulation von *Ztcyp53* in Gegenwart von Nitrat und Glutamat.** Abgebildet sind die relativen Transkriptmengen von *Ztcyp53* im WT-Stamm und  $\Delta ZtareA$ , kultiviert für 24 h auf N-MM Agarplatten mit je 25 mM Nitrat bzw. Glutamat. Die Transkriptmengen sind relativ zu den Mengen im WT auf Glutamat dargestellt und auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin normalisiert.

### 3.2.4.6 Die Genexpression von *Ztcyp53* im Infektionsverlauf

Eine mögliche Beteiligung von ZtCYP53p am Infektionsprozess wurde mit Hilfe von *in vivo* Genexpressionsanalysen untersucht. Mittels q-PCR wurde die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* im zeitlichen Verlauf der Infektion von Weizenpflanzen untersucht. Die Ergebnisse der q-PCR Analyse deuten auf eine gesteigerte Expression von *Ztcyp53* in der späten symptomlosen Phase der Infektion hin, in welcher der Übergang zur nekrotrophen Phase stattfindet (Rudd *et al.*, 2015) (Abbildung 20).



**Abbildung 20: *In vivo* Genexpressionsanalyse von *Ztcyp53* im Infektionsverlauf.** Abgebildet ist die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* zu den definierten Zeitpunkten Tag 1, 4, 10, 14, 21 und 28 nach der Infektion (*days post infection*, dpi). Die Transkriptmengen wurden auf den Startpunkt der Infektion (1 dpi) standardisiert und auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin normalisiert.

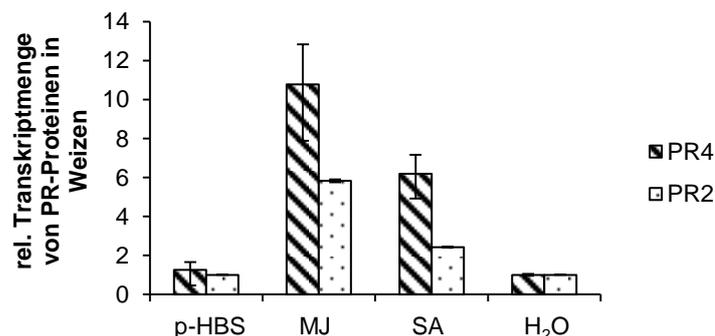
Im Vergleich zum Startpunkt der Infektion (1 dpi) war die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* nach 10 dpi um das 7,9-fache gesteigert. Zum 14. Tag nach Infektionsbeginn war die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* im Vergleich zum Zeitpunkt 1 dpi immer noch auf das 4,5-fache gesteigert. Zum Zeitpunkt 28 dpi entsprach die relative Transkriptmenge wieder der Menge zum Zeitpunkt 1 dpi.

### 3.2.4.7 Die Induktion der pflanzlichen Immunantwort durch p-Hydroxybenzoesäure

Das Phytohormon Salicylsäure (o-Hydroxybenzoesäure), ein strukturelles Analogon der p-Hydroxybenzoesäure, ist für die pflanzliche Abwehr durch die Induktion von PR-Proteinen von großer Bedeutung (Jones und Dangl, 2006). Um zu überprüfen ob auch

die p-HBS an der Induktion der pflanzlichen Immunabwehr beteiligt ist, wurden Weizenblätter in einer 300  $\mu$ M p-HBS Lösung inkubiert, die RNA isoliert und Genexpressionsanalysen mittels q-PCR durchgeführt (vgl. 2.4.10). Es wurden zwei aus Weizen bekannte PR Proteine, PR2 ( $\beta$ -1,3-Glucanase, NCBI Accession Y18212) und PR4 (Wheatwin 1, NCBI Accession AJ006098.1) nach Desmond *et al.*, 2006 ausgewählt und deren Genexpression analysiert. Die relativen Transkriptmengen wurden auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin (NCBI Accession U76895.1) normalisiert. Als Positivkontrolle zur Induktion der PR-Proteine dienten Salicylsäure (SA) und Methyljasmonat (MJ), als Negativkontrolle wurde steriles Wasser verwendet. SA und MJ induzieren über die Aktivierung weiterer Signaltransduktionsprozesse die Expression von PR-Proteinen, welche eine wichtige Bedeutung bei der systemischen Immunantwort von Pflanzen haben (Vernooij *et al.*, 1994).

Die relativen Transkriptmengen der PR-Proteine nach der Behandlung mit p-HBS waren im Vergleich zu SA und MJ nicht erhöht und entsprachen in etwa den Transkriptmengen nach Induktion mit Wasser (Abbildung 21).

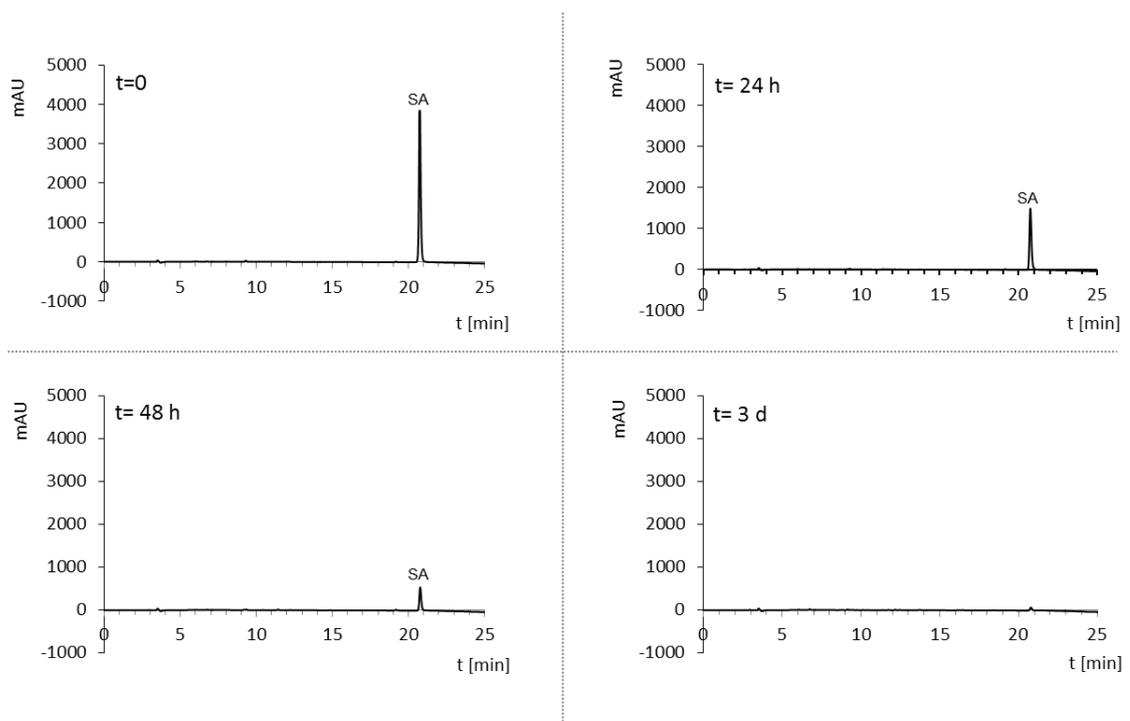


**Abbildung 21: Einfluss von p-Hydroxybenzoesäure auf die Genexpression Pathogen-assoziiertes Proteine (PR-Proteine) in *Triticum aestivum*.** Dargestellt sind die rel. Transkriptmengen der PR-Proteine PR2 und PR4 aus *T. aestivum* nach Induktion der Immunantwort mit p-Hydroxybenzoesäure (p-HBS), Methyljasmonat (MJ), Salicylsäure (SA) und H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle. Die Transkriptmengen sind relativ zur Expression der PR-Proteine in Wasser und normalisiert auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin dargestellt.

#### 3.2.4.8 Metabolisierung von Salicylsäure durch *Zymoseptoria tritici*

Im Laufe der Fermentationsversuche mit Phenolsäuren (Kapitel 3.2.4.5) ist aufgefallen, dass *Z. tritici* bei Zugabe von Salicylsäure zu Minimalmedium zwar keine p-HBS produzierte, die Salicylsäure jedoch metabolisieren konnte (Abbildung 22). In Mediumkontrollen ohne *Z. tritici* blieb die Salicylsäure-Menge konstant und in den Myzelextrakten konnte keine Salicylsäure detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Aus anderen Phytopathogenen bzw. Endophyten sind Salicylat-Hydroxylasen (E.C.1.14.12.1) bekannt, welche Salicylsäure in Catechol umwandeln können und somit die zelluläre Akkumulation der Salicylsäure in der Pflanze und die dadurch ausgelöste Immunantwort verhindern (Sze und Dagley, 1984; Rabe *et al.*, 2013). Mit einer Suche in der JGI-Genomdatenbank und einer anschließenden blastp-Suche mit dem Onlineprogramm des NCBI, konnte ein Salicylat-Hydroxylase ähnliches Protein aus *Z. tritici* identifiziert werden (NCBI Accession: XP\_003851387.1, JGI Protein-ID 43383). Dieses hat signifikante Homologien zu Salicylat-Hydroxylase ähnlichen Proteinen aus anderen Pilzen wie *Z. brevis* (E-value 0.0), *Dothistroma septosporum* (E-value 0.0) und *Coccidioides immitis* bzw. *C. posadasii* (jeweils E-value 0.0).



**Abbildung 22: Metabolisierung von Salicylsäure durch *Zymoseptoria tritici*.** Gezeigt sind die HPLC-Chromatogramme der Kulturfiltratextrakte aus der Fermentation vom *Z. tritici* WT-Stamm in Minimalmedium mit 100  $\mu$ M Salicylsäure (SA) bei 230 nm, gemessen an der Shimadzu Prominence Anlage. Im zeitlichen Verlauf der Fermentation wurde SA abgebaut und war nach drei Tagen nicht mehr detektierbar.

### 3.3 Charakterisierung der Polyketidsynthase-Gene aus *Zymoseptoria tritici*

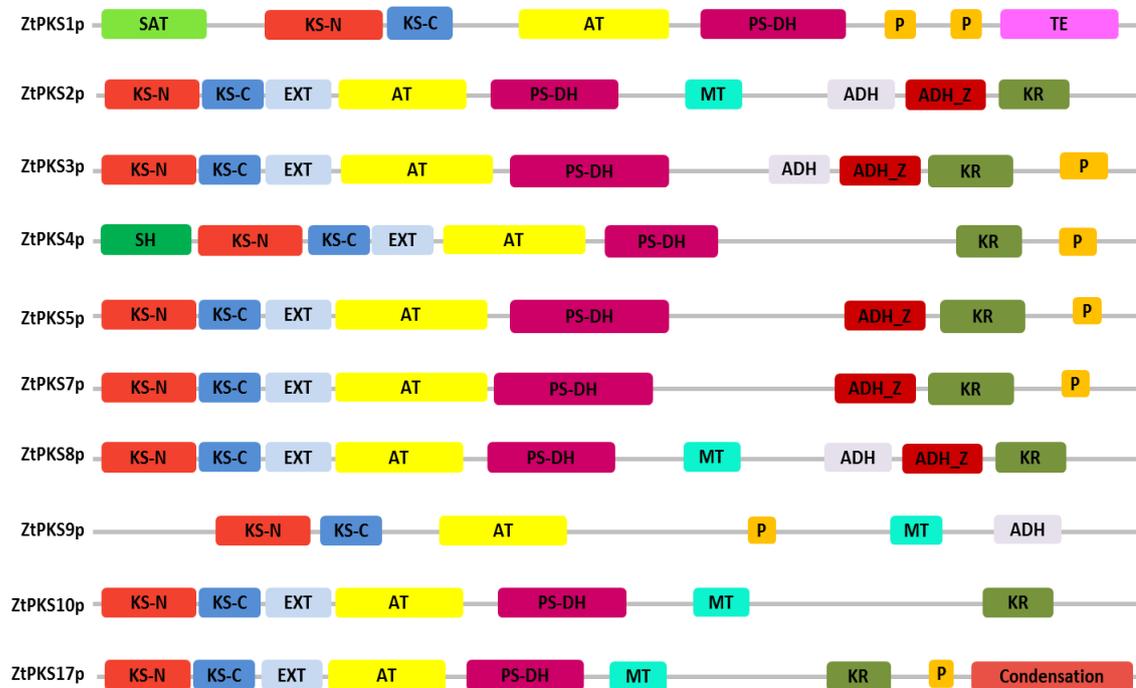
Für die Charakterisierung der Polyketidsynthasen aus *Z. tritici* wurden die zehn in der Genomdatenbank des JGI annotierten *pks*-Gene *in silico* näher untersucht (Tabelle 6). Die biologische Funktion der meisten PKSp aus *Z. tritici* ist nicht bekannt. Lediglich für ZtPKS1p wurde von Lendenmann *et al.* (2014) eine mögliche Funktion vorgeschlagen. Mit Hilfe von QTL-Mapping Analysen konnten Lendenmann *et al.* insgesamt 16 Genloci identifizieren, welche mit der Melanisierung von *Z. tritici* Kolonien assoziiert sein könnten. Der mit der größten Häufigkeit detektierte Genlocus, der mit der Melanisierung in Verbindung gebracht wurde, beinhaltet das *pksI*-Gen. Aufgrund der durchgeführten Analysen, in Verbindung mit Homologievergleichen aus anderen Pilzen, schlussfolgerten Lendenmann *et al.*, dass *ZtpksI* wahrscheinlich das Schlüsselenzym der Melaninbiosynthese in *Z. tritici* ist. Aus anderen Ascomyceten ist bekannt, dass die PKS1p-Homologe den ersten Schritt in der DHN-Melaninbiosynthese, nämlich die Verknüpfung und Zyklisierung von Acetatmolekülen, katalysiert (Butler und Day, 1998).

Um mögliche Transkriptionsregulatoren innerhalb der *pks*-Gencluster aus *Z. tritici* zu identifizieren, wurde in der Genomdatenbank des JGI in einem Abstand von bis zu 15 kb *upstream* und *downstream* der jeweiligen *pks*-Gene nach Sequenzmerkmalen gesucht, welche typisch für Transkriptionsregulatoren sind. Es wurde nach den Gene Ontology (GO) Termini GO:000370 (*sequence specific DNA binding transcription factor activity*) und GO:0006355 (*regulation of transcription, DNA –dependent*) gesucht. Zudem wurden Proteine mit einem Zinkfinger-Motiv (Pfam Familie PF00096) gesucht. In der Nähe von drei Genen, die PKSp kodieren, konnten Proteine mit Sequenzmerkmalen identifiziert werden, die auf das Vorhandensein von clusterspezifischen Transkriptionsregulatoren hindeuten (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Polyketidsynthasen in *Zymoseptoria tritici*.** Aufgelistet ist die Bezeichnung (die Annotation aus der JGI-Datenbank wurde übernommen), die Protein-ID der JGI-Datenbank, die reduzierenden Eigenschaften und die biologische Funktion der Polyketidsynthasen aus *Z. tritici*. Zudem wurde das Vorhandensein möglicher Transkriptionsregulatoren (TR) in einer Entfernung von 15 kb *downstream* bzw. *upstream* der *pks*-Gene untersucht. TF = Transkriptionsfaktor.

<b>Polyketidsynthase</b> (JGI Protein-ID)	<b>Reduzierende Eigenschaften</b>	<b>Biologische Funktion</b>	<b>Mögliche TR im Gencluster</b> (JGI Protein-ID; Abstand zu <i>pks</i> -Gen)
<b>ZtPKS1p</b> (96592)	Nicht reduzierend	vermutlich Schlüsselenzym in der Melaninbiosynthese (Lendenmann <i>et al.</i> , 2014)	Zn-Finger TF, (87993; 7,3 kb <i>upstream</i> )
<b>ZtPKS2p</b> (47832)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	-
<b>ZtPKS3p</b> (100089)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	Pilzspezifischer TF (11468; 423 bp <i>downstream</i> ) MADS-Box TF (31170; 12,4 kb <i>upstream</i> )
<b>ZtPKS4p</b> (72709)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	Protein mit Helix-Turn-Helix Motiv und TF Aktivität (93613; 345 bp <i>downstream</i> )
<b>ZtPKS5p</b> (101493)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	-
<b>ZtPKS7p</b> (45348)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	-
<b>ZtPKS8p</b> (51018)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	-
<b>ZtPKS9p</b> (9788)	Nicht reduzierend	Nicht bekannt	-
<b>ZtPKS10p</b> (67477)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	-
<b>ZtPKS17p</b> (62978)	Stark reduzierend	Nicht bekannt	-

Die Proteinsequenzen der zehn PKSp aus *Z. tritici* wurden des Weiteren mit Hilfe der PFAM Datenbank (PFAM 30.0) einer Analyse auf Homologien zu bekannten, konservierten Proteindomänen unterzogen (Abbildung 23).



**Abbildung 23: Übersicht konservierter Proteindomänen der Polyketidsynthasen aus *Zymoseptoria tritici*.** SAT = ACP transacylase (PFAM Accession PF16073), KS-N =  $\beta$ -Ketoacylsynthetase N-terminaler Bereich (PF00109), KS-C =  $\beta$ -Ketoacylsynthetase C-terminaler Bereich (PF02801), EXT = C-terminale Extension von KS-C (PF16197), AT = Acetyltransferase (PF00698), PS-DH = Polyketidsynthase Dehydratase (PF14765), P = Phosphopantethein Bindestelle (PF00550), TE = Thioesterase (PF00975), MT = Methyltransferase (PF08242), ADH = Alkoholdehydrogenase (PF08240), ADH\_Z = Zinkbindende Dehydrogenase (PF00107), KR = Ketoreduktase (PF08659), Kondensation = Kondensationsdomäne (PF00668).

### 3.4 Genexpressionsanalyse der Polyketidsynthasen in *Zymoseptoria tritici* während des Infektionszyklus

Mit Hilfe von q-PCR Analysen sollte das Genexpressionsprofil der Polyketidsynthase (*pks*)-Gene aus *Z. tritici* in infizierten Weizenpflanzen im Infektionsverlauf untersucht werden. Dadurch sollten eventuelle Sekundärmetabolite identifiziert werden, die eine wichtige Bedeutung im Infektionszyklus haben.

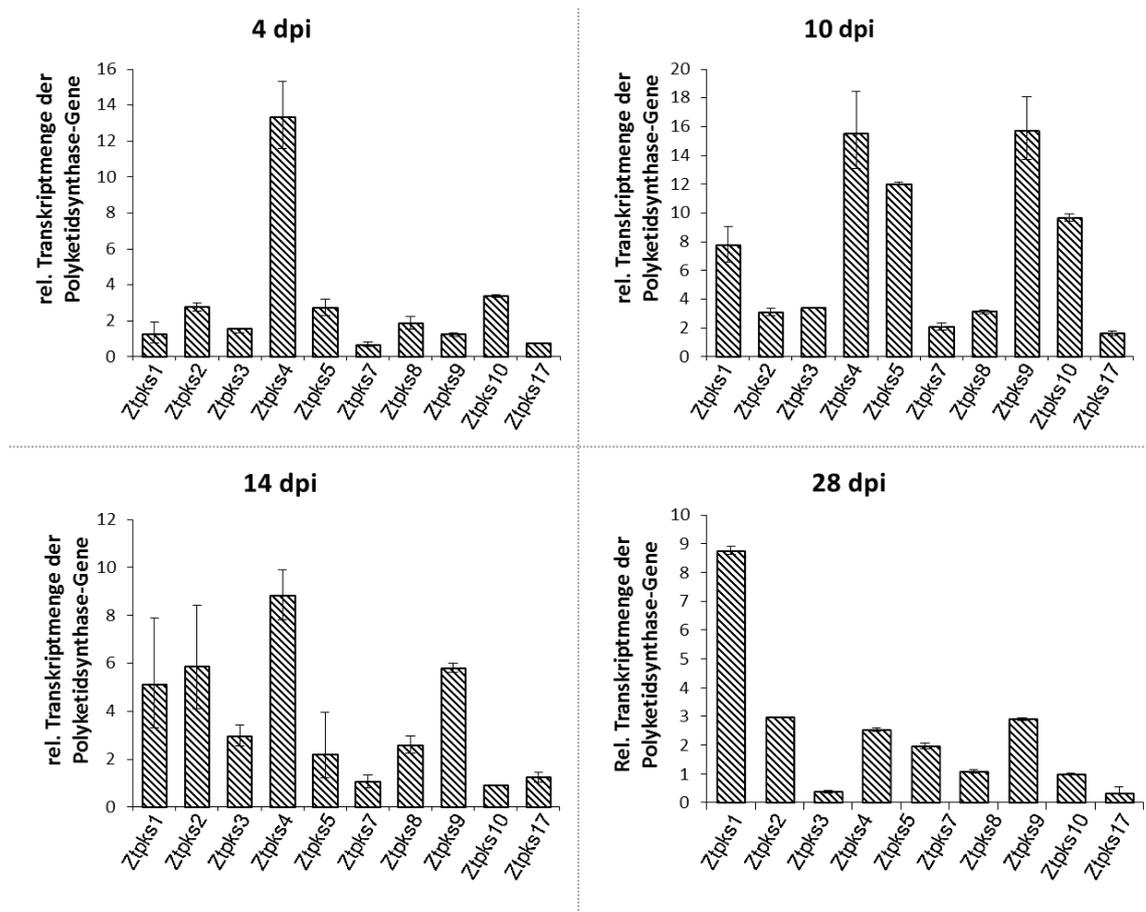
Die Untersuchung erfolgte *in vivo* unter natürlichen Bedingungen, da sekundäre Stoffwechselprozesse oft erst durch bestimmte Stimuli in natürlicher Umgebung aktiviert werden.

Um eine Aussage bezüglich des Expressionsmusters der *pks*-Gene treffen zu können, wurden Weizenpflanzen mit 5 ml einer Sporensuspension des Wildtyps (mit einer Konzentration von  $5 \times 10^7$  Sporen/ml) inokuliert. Zu definierten Zeitpunkten nach der Infektion der Pflanzen wurde RNA aus den infizierten Blättern isoliert und eine q-PCR Analyse durchgeführt. Die relativen Transkriptmengen wurden in Bezug gesetzt zu der jeweiligen Transkriptmenge einen Tag nach der Infektion (1 dpi).

Die weiteren Proben wurden an den Tagen 4, 10, 14 und 28 dpi aus den Weizenblättern isoliert. Die Zeitpunkte wurden mit Bezug auf die unterschiedlichen Phasen der Infektion gewählt, um für die Expressionsanalyse ein möglichst breites Spektrum der Stoffwechselaktivität des Pilzes während der Infektion abzudecken.

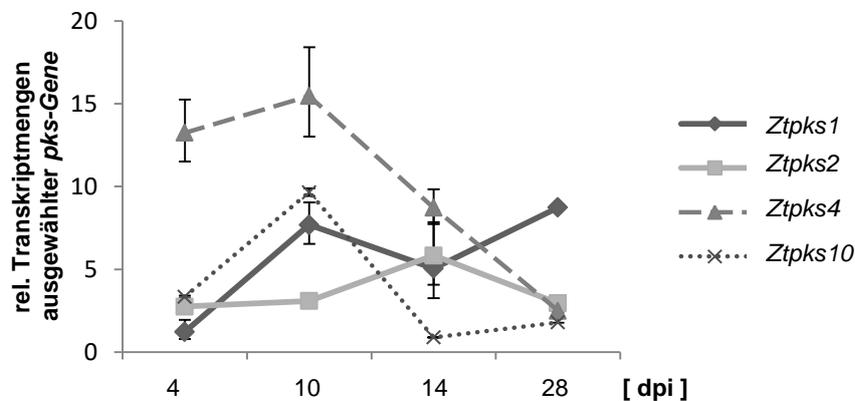
Die Berechnung der relativen Transkriptmenge erfolgte mit der  $\Delta C_T$ -Methode nach Livak und Schmittgen, 2001 (vgl. 2.2.2.4). Die relativen Transkriptmengen der *pks*-Gene wurden auf das *Housekeeping* Gen  $\beta$ -Tubulin normalisiert.

Mit Hilfe der q-PCR Analyse konnte nachgewiesen werden, dass während des Infektionsverlaufes eine signifikante Regulation von *pks*-Genen in *Z. tritici* stattfand (Abbildung 24). Nach 4 dpi war eine gesteigerte Transkriptmenge der *Ztpks4* besonders auffallend, welche dem 13-fachen Wert von 1 dpi entsprach. Zum Zeitpunkt 10 dpi konnten hohe Transkriptmengen für die Gene *Ztpks1*, *Ztpks4*, *Ztpks5*, *Ztpks9* und *Ztpks10* nachgewiesen werden. Nach 14 dpi wurden hohe Transkriptmengen für die Gene *Ztpks1*, *Ztpks2*, *Ztpks4* und *Ztpks9* gemessen. Zum Zeitpunkt 28 dpi war besonders die relative Transkriptmenge des *Ztpks1*-Gens stark gesteigert.



**Abbildung 24: Genexpressionsanalyse der Polyketidsynthesen aus *Zymoseptoria tritici* während des Infektionsverlaufes in Weizen.** Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen der einzelnen Polyketidsynthase-Gene aus dem *Z. tritici* WT-Stamm IPO323 in Bezug auf den Zeitpunkt  $t = 1$  dpi. Die Messreihe repräsentiert die relative Expression der *pks*-Gene zu den definierten Zeitpunkten 4, 10, 14 und 28 dpi. Es wurden jeweils Duplikate in drei unabhängigen Versuchen analysiert.

Anhand ihres Expressionsprofils wurden vier *pks*-Gene ausgewählt (*Ztpks1*, *Ztpks2*, *Ztpks4* und *Ztpks10*), für welche in einer der Infektionsphasen eine signifikant erhöhte Genexpression gezeigt werden konnte (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Expressionsprofil ausgewählter Polyketidsynthase-Gene aus *Zymoseptoria tritici* im Infektionsverlauf.** Abgebildet ist die relative Expression der *Ztpks1*, *Ztpks2*, *Ztpks4* und *Ztpks10*, in Bezug auf den Zeitpunkt  $t = 1$  dpi. Es wurden die im Infektionsverlauf definierten Zeitpunkte 4, 10, 14 und 28 dpi ausgewählt.

### 3.4.1 Inaktivierung ausgewählter Polyketidsynthasen

Die anhand der auffälligen transkriptionellen Regulation während der Infektion ausgewählten Polyketidsynthase-Gene wurden zunächst inaktiviert. Alle erzeugten *loss of function* Mutanten wurden auf ihre Pathogenität gegen Weizenpflanzen untersucht, um zu überprüfen, ob durch die Inaktivierung der jeweiligen *pks* die Fähigkeit zur Synthese pathogenitätsrelevanter Phytotoxine beeinflusst wurde. Zusätzlich wurden Metabolitenspektren der Mutanten nach Fermentation in unterschiedlichen Medien (vgl. 2.4.1) und anschließender Extraktion aufgenommen und miteinander verglichen.

Die Klonierungsstrategien zur Erzeugung der Plasmide für die Geninaktivierung der *Ztpks1*, *Ztpks2*, *Ztpks4* und *Ztpks10* sowie die Southern Blot Analysen zur Bestätigung homologer Rekombinationsereignisse zur Identifizierung der Mutanten sind in Anhang II bzw. Anhang III dargestellt.

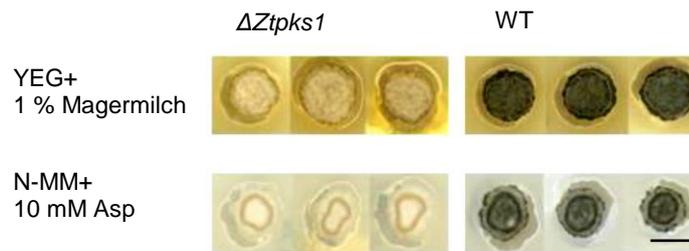
#### 3.4.1.1 Phänotypische Untersuchung der *loss of function* Mutanten

Für alle vier ausgewählten Polyketidsynthasen konnten erfolgreich *loss of function* Mutanten generiert werden.

Bei vergleichenden Analysen der Metabolitenspektren der Extrakte aus der Fermentation der Mutanten  $\Delta Ztpks1$ ,  $\Delta Ztpks2$ ,  $\Delta Ztpks4$  und  $\Delta Ztpks10$  konnte kein Unterschied zu Extrakten des WT-Stammes beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Bei  $\Delta Ztpks1$  konnte ein interessantes phänotypisches Merkmal in Bezug auf die dunkle Pigmentierung beobachtet werden. Da anhand von Homologien zu PKS1p aus anderen Ascomyceten hervorgeht, dass das Enzym wahrscheinlich an der Melaninbiosynthese beteiligt ist (Lendenmann *et al.*, 2014), wurde dieser Einfluss in  $\Delta Ztpks1$  untersucht.

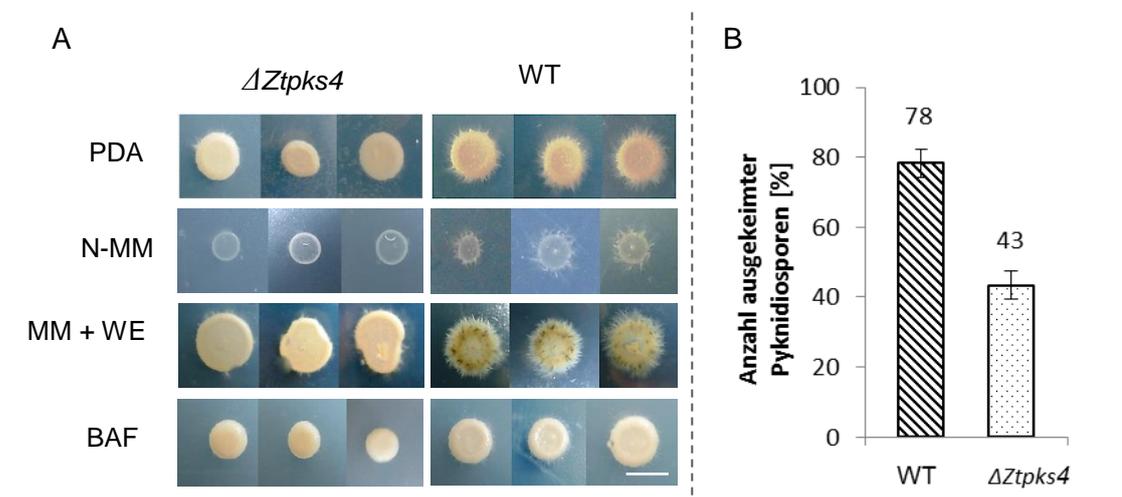
Hierzu wurde  $\Delta Ztpks1$  über einen Zeitraum von 4 Wochen auf YEG + 1 % Magermilch und N-MM + 10 mM L-Aspartat kultiviert. WT Kolonien waren nach diesem Zeitraum vollständig dunkel pigmentiert, wobei bei  $\Delta Ztpks1$  eine erkennbar hellere Färbung zu sehen war (Abbildung 26). In Submerskulturen konnte diese Beobachtung im Anschluss bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 26: Vergleich der Pigmentierung von  $\Delta Ztpks1$  und dem WT-Stamm.** Die Kolonien des *Z. tritici* WT-Stammes und  $\Delta Ztpks1$  wurden in Triplikaten von je 1,5  $\mu$ l einer Sporensuspension auf Agarplatten mit YEG + 1 % Magermilchpulver und N-MM + 10 mM Aspartat (Asp) appliziert und vier Wochen bei 16 °C inkubiert. Der Maßstab entspricht 5 mm.

Zudem konnte bei  $\Delta Ztpks4$  Mutanten, die auf Kartoffel-Dextrose Agar (PDA), N-MM-, MM + WE- sowie BAF- Agarplatten kultiviert wurden, eine geringere Ausprägung des filamentösen Wachstums im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abbildung 27.A). Bei Kultivierung auf BAF-Agarplatten war dieser Unterschied zwischen WT und  $\Delta Ztpks4$  im Vergleich zu PDA, N-MM und MM + WE geringer ausgeprägt.

Auffällig war bei der Bestimmung der Keimungsrate, dass die Konidienkeimung von  $\Delta Ztpks4$  im Vergleich zum WT-Stamm um 45 % reduziert war. Die Keimungsrate des WT-Stammes betrug 78 %, wogegen nur 43 % der  $\Delta Ztpks4$ -Sporen auskeimten (Abbildung 27.B).

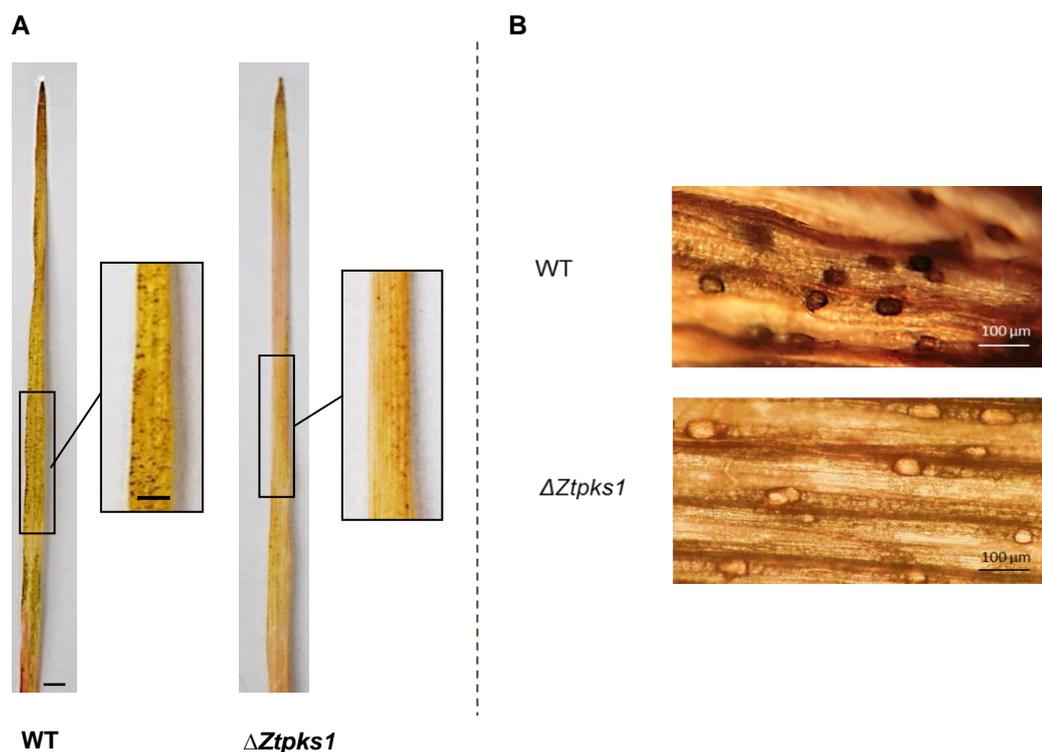


**Abbildung 27.A: Wachstumsvergleich von  $\Delta Ztpks4$  und dem WT-Stamm auf verschiedenen Festmedien.** Es wurden je 1,5  $\mu$ l einer Sporensuspension auf Agarplatten mit unterschiedlichen Medien appliziert und vier Wochen bei 16 °C inkubiert. Der Maßstab entspricht 5 mm. **B: In vitro Keimungsassay zur Bestimmung der Keimungsrate von  $\Delta Ztpks4$ .** Es wurden 100  $\mu$ l einer Sporensuspension ( $10^6$  Sporen/ml) des WT-Stammes und  $\Delta Ztpks4$  auf Objektträger mit Wasseragar + 0,00025 % Biotin und 0,001 % Thiamindichlorid 72 h bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurden die gekeimten Sporen gezählt und die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten gebildet. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

### 3.4.1.2 Pathogenitäts-Assay mit den Polyketidsynthese-Inaktivierungsmutanten

Bei der Untersuchung der Pathogenität der *Z. tritici* Mutanten  $\Delta Ztpks2$ ,  $\Delta Ztpks4$  und  $\Delta Ztpks10$  war kein Unterschied zum WT zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Auffällig war erneut das Ausbleiben der Pigmentierung der sonst dunkel gefärbten Pyknidien der  $\Delta Ztpks1$  Mutante. Die Virulenz der Mutante war allem Anschein nach im Vergleich zum WT-Stamm nicht reduziert.

Die mit  $\Delta Ztpks1$  infizierten Pflanzen wiesen deutliche Symptome wie chlorotische Läsionen und schnell eintretende Dürre von Blättern auf. Pyknidien konnten dabei nur schwer entdeckt werden, da diese nicht die übliche schwarzbraune, sondern eine deutlich hellere Färbung hatten (Abbildung 28.A). Mikroskopische Aufnahmen verdeutlichten die Unterschiede in der Pigmentierung der Pyknidien von  $\Delta Ztpks1$  und dem WT-Stamm (Abbildung 28.B).



**Abbildung 28.A: Pathogenitäts-Assay von  $\Delta Ztpks1$  gegen Weizen.** Abgebildet sind Weizenblätter mit typischen Symptomen der *Septoria* Blattdürre. Bei den mit  $\Delta Ztpks1$  infizierten Pflanzen blieb die dunkle Pigmentierung der Pyknidien aus, alle anderen Krankheitssymptome waren vergleichbar zu den mit dem WT infizierten Pflanzen. Die Maßstabbalken entsprechen 5 mm. **B: Lichtmikroskopische Aufnahme der Pyknidien des Wildtypstammes IPO323 und von  $\Delta Ztpks1$ .** Gezeigt sind Blattsegmente mit Pyknidien, wobei die Dunkelfärbung der Pyknidien von  $\Delta Ztpks1$  ausblieb.

## 4. Diskussion

Jährlich werden ca. 1 Mrd. US-Dollar pro Jahr für die Bekämpfung von *Z. tritici* mit Fungiziden ausgegeben, jedoch ist deren Wirksamkeit aufgrund von Resistenzentwicklungen des Pilzes stark begrenzt (Fones und Gurr, 2015; Torriani *et al.*, 2015). Der zur Familie der Mycosphaerellaceae gehörende Pilz wird in der „Top 10“ der bedeutendsten phytopathogenen Pilze gelistet, was dessen Bedeutung als Schädling im Weizenanbau weiterhin unterstreicht (Dean *et al.*, 2012).

Dieser Hintergrund macht die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Infektion von Weizen durch *Z. tritici* zu einem überaus wichtigen Forschungsthema. Über die Interaktionen zwischen dem Pathogen und seinem Wirt ist auf molekularer Ebene bislang sehr wenig bekannt.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien sollten zum besseren Verständnis der Pathogen-Wirt Interaktion auf molekularer Ebene führen. Bei dieser Interaktion sind (neben Effektoren) die vom Pathogen sekretierten Phytotoxine von besonderer Bedeutung (Möbius und Hertweck, 2009). Der Sekundärmetabolismus des *Septoria*-Blattdürre Erregers *Z. tritici* sollte mit besonderem Fokus auf die Produktion pathogenitätsrelevanter Phytotoxine untersucht werden. Dadurch sollten mögliche Metabolite identifiziert werden, die durch *Z. tritici* sekretiert werden und zum Zelltod der Wirtspflanze beitragen.

### 4.1 Der Sekundärmetabolismus von *Zymoseptoria tritici*

Sekundärmetaboliten können wesentlich zur Virulenz phytopathogener Pilze beitragen. Dabei kann ein einziges Phytotoxin mehrere oder sogar alle mit der Krankheit in Verbindung stehenden Symptome in einer Wirtspflanze auslösen (Möbius und Hertweck, 2009).

Im Genom von *Z. tritici* wurden mit Hilfe bioinformatischer Analysen Gensequenzen mit typischen Motiven identifiziert, die Proteine kodieren, welche an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten beteiligt sein könnten. Darunter waren neun putative NRPS- und zehn PKS-Gensequenzen, zu welchen jedoch bis heute kein korrespondierendes Produkt identifiziert und isoliert werden konnte (Goodwin *et al.*, 2011; Rudd *et al.*, 2015).

Aus verwandten Dothideomyceten, wie der ebenfalls zur Familie der Mycosphaerellaceae gehörenden Gattung *Cercospora*, sind einige phytotoxische Sekundärmetabolite bekannt (Muria-Gonzalez *et al.*, 2015). Das bestbekannteste Phytotoxin ist das

Perylenchinon Cercosporin, das bereits 1957 aus *Cercospora kikuchii* isoliert wurde (Kuyama und Tamura, 1957).

Mit Hilfe der Generierung von Cercosporinsynthese-defizienten *C. kikuchii*-Mutanten wurde gezeigt, dass dieses Toxin für die Pathogenität essentiell ist. Auf Sojabohnen, die mit den *loss of function* Mutanten infiziert wurden, konnten keine Krankheitssymptome mehr beobachtet werden (Upchurch *et al.*, 1991).

Eine weitere Klasse interessanter Sekundärmetabolite aus der Gattung *Mycosphaerella* sind die Beticoline. Insgesamt werden dieser chemischen Gruppe 20 verschiedene Derivate zugeordnet. Die zur Gruppe der Polyketide gehörenden Toxine werden von *Cercospora beticola*, dem Erreger der *Cercospora*-Blattfleckenkrankheit an Zuckerrüben, produziert. Beticoline sind chlorierte Heterodimere von Anthrachinon- und Xanthonderivaten und können sowohl phytotoxische als auch antimikrobielle Aktivitäten haben (Jalal *et al.*, 1992; Milat *et al.*, 1992).

Die große Herausforderung bei der Suche nach Sekundärmetaboliten ist, dass die kodierenden Gene unter Laborbedingungen meist nicht exprimiert werden und deren Expression nur unter sehr spezifischen Bedingungen aktiviert werden kann (Brakhage, 2013). Der erste Bericht über die Aktivierung eines stillen Genclusters ist von Bergmann *et al.* aus dem Jahr 2007. Den Forschern gelang durch die Überexpression eines im Cluster kodierten Transkriptionsfaktors die Aktivierung der Biosynthese von Aspyridon, eines PK-NRP-Hybrides (Bergmann *et al.*, 2007). Seitdem wurden weitere Methoden, wie z.B. die genetische Manipulation globaler Regulatoren oder die Fermentation mit chemischen Chromatinstrukturmodulatoren beschrieben, mit denen in anderen Pilzen die Aktivierung der Biosynthese von Sekundärmetaboliten erfolgreich war (Williams *et al.*, 2008; Henrikson *et al.*, 2009; Brakhage, 2013).

#### **4.1.1 Fermentative Methoden zur Aktivierung stiller Sekundärmetaboliten-Gencluster in *Zymoseptoria tritici***

Durch die Zugabe der chemischen Chromatinstrukturmodulatoren 5-Azacytidin und Vorinostat während der Fermentation mit dem *Z. tritici* WT-Stamm IPO323, sollte die Aktivierung stiller Gencluster auf epigenetischer Ebene induziert werden.

Bei *Cladospora cladosporioides* konnte durch die Zugabe des Histondeacetylase-Inhibitors Vorinostat der Proteinkinase C-Inhibitor Calphostin B entdeckt werden (Williams *et al.*, 2008). Nach der Behandlung mit Vorinostat konnte außerdem aus der Gattung *Daldinia* sp. das Polyketid Daldinone E isoliert werden (Du *et al.*, 2014).

Die Zugabe des DNA-Methyltransferase (DMAT)-Inhibitors 5-Azacytidin aktivierte die Produktion von bislang unbekanntem Oxylinen sowie von Nygerone A in *A. niger* (Henrikson *et al.*, 2009).

In *Z. tritici* konnte durch die Fermentation mit den beiden epigenetischen Modulatoren unter den gewählten Bedingungen die Biosynthese von phytotoxischen Sekundärmetaboliten nicht aktiviert werden. In Phytotoxizitätstests mit den aus der Fermentation mit Vorinostat bzw. 5-Azacytidin gewonnenen Extrakten, konnte keine toxische Aktivität gegen Weizenblätter beobachtet werden. Für die Versuche wurde die in der Literatur beschriebene übliche Konzentration an Chromatinstrukturmodulatoren von 20  $\mu\text{M}$  eingesetzt (Williams *et al.*, 2008; Henrikson *et al.*, 2009). Eine weiterführende, umfangreiche Untersuchung der epigenetischen Regulation des Sekundärmetabolismus von *Z. tritici* mit weiteren Konzentrationen der Chromatinstrukturmodulatoren ist noch ausstehend.

Das Variieren der Kulturbedingungen, wie des pH-Werts und Nährstoffangebotes (vgl. 2.4.1), konnte die Produktion phytotoxischer Sekundärmetabolite in *Z. tritici* ebenfalls nicht induzieren. Für die Aktivierung der Sekundärmetaboliten-Gencluster sind bestimmte Signale, sog. *Trigger*, notwendig (Bergmann *et al.*, 2007). Diese Signale können der Mangel eines bestimmten Nährstoffes, aber auch Kulturbedingungen wie pH-Wert oder Salzkonzentration sein (Brakhage, 2013). Im Rahmen dieser Arbeit ist es nicht gelungen mit Hilfe der Variation von Kultivierungsbedingungen die Biosynthese phytotoxischer Sekundärmetaboliten zu induzieren.

In Pflanzenpathogenen können Teile des Sekundärmetabolismus einer wirtsspezifischen Regulation unterliegen. Das heißt, dass bestimmte Stimuli der Wirtspflanze für die Aktivierung der Genexpression notwendig sind. Mit Hilfe von Microarray Analysen konnte gezeigt werden, dass im phytopathogenen Pilz *Fusarium graminearum* die Genexpression sogar von Wirt zu Wirt unterschiedlich ausgeprägt ist. In den Wirtspflanzen Weizen, Gerste und Mais konnten jeweils unterschiedliche Expressionsprofile von Genfamilien, unter anderem von Sekundärmetaboliten-Genclustern, nachgewiesen werden (Harris *et al.*, 2016). Zusätzlich unterschieden sich die Expressionsmuster in den verwendeten Wirtspflanzen wesentlich von dem nach *in vitro* Kultivierung beobachteten Profil (Güldener *et al.*, 2006; Lysøe *et al.*, 2011). Möglicherweise sind für die

Aktivierung pathogenitätsrelevanter Toxine in *Z. tritici* noch unbekannte wirtsspezifische Faktoren notwendig.

Bislang gibt es noch keine Veröffentlichung über Sekundärmetabolite aus *Z. tritici*. Der Sekundärmetabolismus könnte in diesem Fall einer sehr spezifischen Regulation unterliegen, denn bisher war die Induktion der Sekundärmetaboliten-Biosynthese unter verschiedensten Kultivierungsbedingungen im Labor stets erfolglos.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Stimuli, wie unterschiedliche pH-Werte des Kulturmediums, Fermentation mit verschiedenen C-Quellen oder unter Mangelzuständen wie Stickstoffmangel, sind in *Z. tritici* vermutlich nicht die Stimuli, die für die Aktivierung des Sekundärmetabolismus notwendig sind.

#### 4.1.2 Genetische Modifikation von Regulatoren des Sekundärmetabolismus

Neben der Fermentation in unterschiedlichen Medien gibt es molekularbiologische Methoden, die bei der Suche nach neuen Sekundärmetaboliten zur Anwendung kommen können. Eine Möglichkeit beruht auf der Inaktivierung eines für ein Biosyntheseenzym kodierenden Gens und der anschließenden vergleichenden Analyse des metabolischen Profils der Mutante und des WT's mittels HPLC oder HPLC-MS (Brakhage und Schroeckh, 2011). Auf diese Weise gelang es beispielsweise den Sekundärmetaboliten Emericellamid aus *A. nidulans* zu identifizieren und dessen Biosyntheseweg aufzuklären (Chiang *et al.*, 2008). Ist die Synthese des Sekundärmetaboliten unter den gewählten Kultivierungsbedingungen im WT jedoch inaktiviert, so ist dieses Verfahren nicht geeignet, da sich die Metabolitenprofile des WT's und der *loss of function* Mutante nicht unterscheiden.

Die Überexpression von Transkriptionsfaktoren oder der Austausch der im Cluster vorhandenen Promotoren gegen regulierbare Promotoren kann dabei helfen, die Aktivität von Sekundärmetaboliten-Clustern zu verändern (Brakhage und Schroeckh, 2011). Beide Methoden eignen sich jedoch nur bedingt zur Anwendung in Pilzen und sind besser geeignet bei polycistronisch organisierten Genclustern von Bakterien. Prokaryotische Gencluster sind in Operons kodiert, welche über einen gemeinsamen Promotor reguliert werden. Bei Eukaryoten ist diese Vorgehensweise nicht immer erfolgreich, da jedes Gen im Cluster einen eigenen Promotor besitzt und zum Großteil individuell reguliert werden kann (Wasil *et al.*, 2013).

Eine Möglichkeit diese Problematik zu umgehen, ist die genetische Modifikation von unspezifischen regulatorischen Elementen des Sekundärmetabolismus. Diese Elemente

können auf transkriptioneller Ebene, aber auch auf epigenetischer Ebene oder durch Protein-Protein-Interaktionen wirken (Brakhage, 2013).

Sehr vielfältige und interessante phänotypische Effekte konnten in dieser Arbeit in Folge der Inaktivierung des GATA-Transkriptionsfaktors und globalen Regulators AreAp in *Z. tritici* beobachtet werden. Dieser Transkriptionsfaktor ist in Ascomyceten an der Regulation diverser Prozesse beteiligt. Primär reguliert er die Stickstoff-Metaboliten Repression (*nitrogen metabolite repression* – NMR), einen Prozess zur Regulation des Stickstoffmetabolismus. Zusätzlich ist aus einigen Ascomyceten bekannt, dass AreAp an der Regulation der Expression zahlreicher Sekundärmetaboliten-Gencluster beteiligt ist (Überblick in Tudzynski, 2014). Bei einigen phytopathogenen Ascomyceten partizipiert AreAp außerdem an der Regulation pathogenitätsrelevanter Gene, wie z.B. dem Avirulenzgen *avr9* im Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* (Pérez-García *et al.*, 2001) oder dem Hydrophobin-ähnlichen Protein MPG1p im Reispathogen *M. oryzae*, das für die Appressorienbildung und somit für die Pathogenität essentiell ist (Talbot *et al.*, 1993; Soanes *et al.*, 2002).

Die Untersuchung der generierten *Z. tritici areA loss of function* Mutante ( $\Delta ZtareA$ ) resultierte in interessanten Erkenntnissen in Bezug auf die molekularen Mechanismen der Infektion, der Pathogenität, der Konidienkeimung und des Stickstoffmetabolismus.

#### **4.2 Der globale Regulator ZtAreAp in *Zymoseptoria tritici***

Der GATA-Transkriptionsfaktor AreAp, der im Jahre 1973 zum ersten Mal von Arst und Cove in *A. nidulans* beschrieben wurde, ist der Mediator der Stickstoff-Metaboliten Repression (NMR). In der Abteilung der Ascomyceten ist die NMR vermutlich ein konservierter Prozess. Sie dient der optimalen Nutzung vorhandener Ressourcen durch das Unterbinden der *de novo* Synthese metabolischer Enzyme, solange eine energetisch günstigere Stickstoffquelle, wie z.B. Ammonium oder Glutamat, zur Verfügung steht (Marzluf, 1993). Steht keine der bevorzugten Stickstoffquellen in signifikanter Menge zur Verfügung, so wird die Genexpression von *areA* induziert. Im Anschluss transloziert AreAp in den Zellkern und induziert dort wiederum die Expression metabolischer Enzyme wie Nitrat- und Nitritreduktasen, aber auch von Transportern wie Ammoniumpermeasen (Kudla *et al.*, 1990). AreAp ist nicht nur der Mediator der NMR, sondern

bildet in vielen Ascomyceten einen Knotenpunkt zwischen Primärmetabolismus, Sekundärmetabolismus und der Regulation von Virulenzfunktionen (Tudzynski, 2014).

In der Familie der Mycosphaerellaceae wurde die NMR bis heute noch nicht untersucht. Da es sich um einen in Ascomyceten konservierten Prozess handelt, kann vermutet werden, dass die Metaboliten-Repression in dieser Familie sehr ähnlich abläuft wie in den bereits untersuchten Vertretern dieses Phylums.

Mit Hilfe der blastp-Suche des NCBI konnte ein zum AreAp aus *A. niger* homologes Protein in *Z. tritici* (NCBI Accession: EGP87068.1; JGI Protein-ID 109392) identifiziert werden (ZtAreAp). Der vom blastp-Algorithmus errechnete E-value gibt Aufschluss über die Signifikanz der Sequenzhomologie, wobei die Signifikanz umso höher ist, je kleiner dieser Wert ist (Sansom, 2000). Für den Treffer ZtAreAp wurde ein E-value von  $1e-154$  berechnet, was eine hohe strukturelle Homologie belegt.

#### 4.2.1 Die Regulation der Genexpression von *ZtareA*

In *Z. tritici* scheint der Mechanismus der NMR analog zu anderen Ascomyceten zu funktionieren. Mittels q-PCR Analysen konnte bestätigt werden, dass die relative Transkriptmenge von *ZtareA* bei Kultivierung des WT-Stammes auf Nitrat als einzige N-Quelle, verglichen mit der Transkriptmenge bei Kultivierung auf glutamathaltigem Medium, um das 10-fache gesteigert war. Bei  $\Delta ZtareA$  konnten unabhängig von der verwendeten N-Quelle nur minimale Transkriptmengen detektiert werden, was die erfolgreiche Inaktivierung des *ZtareA*-Gens bestätigte. Die Transkriptmenge von *ZtareA* in der komplementierten Mutante entsprach mit 82 % der Menge des WT-Stammes (Abbildung 4).

#### 4.2.2 ZtAreAp reguliert die Genexpression von Nitrat- und Nitritreduktasen

Bei Wachstumstests auf unterschiedlichen N-Quellen war auffallend, dass bei  $\Delta ZtareA$ -Kolonien auf Stickstoff-Mangelmedium (N-MM) mit Nitrat und Nitrit, im Gegensatz zum WT-Stamm, wenig vegetatives Wachstum zu beobachten war (Abbildung 5).

Mittels q-PCR Analysen konnte die positive Regulation der Genexpression der Nitratreduktase *Ztnit1* und Nitritreduktase *Ztnii1* durch ZtAreAp nachgewiesen werden, was das reduzierte Wachstum von  $\Delta ZtareA$  auf nitrat- und nitrithaltigen Medien erklären könnte. Bei Kultivierung des WTs auf nitrithaltigem Medium war die relative Transkriptmenge von *Ztnit1* und *Ztnii1* im Vergleich zu glutamathaltigem Medium jeweils

um etwa das Dreifache höher (Abbildung 6). Bei  $\Delta ZtareA$  konnten unabhängig von der verwendeten Stickstoffquelle nur minimale Transkriptmengen von *Ztnit1* und *Ztnii1* detektiert werden. Dies verdeutlicht den direkten Zusammenhang der Geninaktivierung von *ZtareA* und dessen Regulation der *Ztnit1*- und *Ztnii1*-Genexpression. Durch eine ektopische Reintegration des *ZtareA*-Gens in das Genom von  $\Delta ZtareA$  war der WT-Phänotyp in Bezug auf die Expression von *Ztnit1* und *Ztnii1* wieder zu beobachten (Abbildung 6). Die fehlende Expression von Nitratreduktasen in  $\Delta ZtareA$  konnte ergänzend durch den Kaliumchlorat-Assay bestätigt werden (Abbildung 7). Kaliumchlorat ist, neben Natriumnitrat, ein Substrat der Nitratreduktase und wird von dieser zum toxischen Kaliumchlorit umgewandelt (López-Berges *et al.*, 2010; van Wijk *et al.*, 1998). Aufgrund der Inaktivierung des *areA*-Gens scheint die Expression der Nitratreduktase in *Z. tritici* stark reduziert zu sein. Durch das Fehlen des Enzyms wird das Kaliumchlorat nicht in das toxische Kaliumchlorit umgewandelt und der Zelltod der  $\Delta ZtareA$ -Kolonien bleibt aus. Dahingegen konnte die komplementierte Mutante ebenso wenig auf Kaliumchlorat wachsen wie die Kolonien des WT-Stammes (Abbildung 7).

Diese Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass ZtAreAp die Genexpression der Nitrat- und Nitritreduktase in *Z. tritici*, in Abhängigkeit von der vorhandenen N-Quelle positiv reguliert.

Dieser Prozess ist sehr wichtig für den Organismus, um Ressourcen optimal zu nutzen und die Energiereserven bei sich ständig ändernden äußeren Bedingungen bestmöglich einzuteilen (Marzluf, 1997). Die *de novo* Synthese der Enzyme für die Nitratassimilation wird durch diesen Regulationsmechanismus nur dann induziert, wenn die Enzyme tatsächlich gebraucht werden.

Obwohl die Mediatoren der NMR in den untersuchten Ascomyceten homolog sind, wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors in den verschiedenen Organismen sehr unterschiedlich reguliert (Wong *et al.*, 2008; Mihlan *et al.*, 2003). Am besten untersucht sind die *A. nidulans* AreAp-Homologe Nit-2p in *N. crassa* (Fu und Marzluf, 1987) und Gln3p in *S. cerevisiae* (Minehart und Magasanik, 1991).

In *A. nidulans* erfolgt die Regulation auf drei Ebenen. Auf transkriptioneller Ebene wird bei Vorhandensein einer bevorzugten Stickstoffquelle die *areA*-mRNA degradiert. Es wurde nachgewiesen, dass für die Degradation des *areA*-Transkripts eine regulatorische Sequenz im Bereich der 3'-UTR Sequenz der *areA*-mRNA verantwortlich ist (Morozov *et al.*, 2001).

Zudem wird die AreAp-Aktivität in *A. nidulans* durch das Co-Repressor Protein NmrAp negativ reguliert. NmrAp interagiert mit der DNA-Bindedomäne von AreAp und verhindert somit die Bindung des Transkriptionsfaktors an die GATA-Elemente in den Promotoren der zu regulierenden Gene (Andrianopoulos *et al.*, 1998). Zusätzlich wird der Transkriptionsfaktor in *A. nidulans* bei ausreichender Menge bevorzugter Stickstoffquelle, mit Hilfe des Proteins CmrAp, aus dem Zellkern transportiert. Der genaue Mechanismus des Transports konnte noch nicht geklärt werden (Wong *et al.*, 2008).

In *N. crassa* ist die Regulation der AreAp-Aktivität ähnlich wie in *A. nidulans*, jedoch konnte hier kein hoher *Turnover* der mRNA gezeigt werden (Tao und Marzluf, 1999).

Der Mechanismus der Regulation von *areA* wurde in *Z. tritici* bislang noch nicht untersucht. Mittels blastp-Suche konnte in *Z. tritici* ein homologes Protein zum Co-Repressor Protein NmrAp aus *N. crassa* identifiziert werden (NCBI Accession: XP\_003850140.1; JGI Protein-ID 75077; E-value 4e-111). Dies könnte ein erster Hinweis auf die Regulation der AreAp-Aktivität auf Proteinebene in *Z. tritici* sein, jedoch müsste diese Hypothese weiter untersucht werden um eine sichere Aussage treffen zu können.

#### **4.2.3 Der Verlust von ZtAreAp beeinflusst die Konidienkeimung, die Pathogenität und die Pigmentierung**

Durch die Geninaktivierung von *ZtareA* entstand die Mutante  $\Delta ZtareA$ , die in Bezug auf die Konidienkeimung, die Pigmentierung und die Pathogenität gegenüber Weizenpflanzen einen interessanten Phänotyp ausprägt.

Nährstoffmangel, insbesondere Stickstoffmangel, induziert bei *Z. tritici* den Wechsel von einer hefeartigen zu einer myzelartigen Wachstumsform, den sog. *dimorphic switch* bzw. dimorphe Transition (Kema *et al.*, 1996; Dean *et al.*, 2005; Mehrabi *et al.*, 2006). Sowohl bei Kultivierung auf Wasseragar, als auch auf Stickstoff-Mangelmedium (N-MM), war bei  $\Delta ZtareA$  keine dimorphe Transition zu beobachten. Beim WT-Stamm hingegen war Myzelwachstum am Kolonierand zu sehen. Auf Vollmedien, wie YEG, wuchsen sowohl der WT als auch  $\Delta ZtareA$  hefeartig (Abbildung 8.A). Bei mikroskopischen Untersuchungen zur Konidienkeimung war auffällig, dass entgegen der Erwartungen vereinzelt auch Pyknidiosporen von  $\Delta ZtareA$  ausgekeimt waren (Abbildung 8.B). Die Keimungsrate von  $\Delta ZtareA$  war im Vergleich zum WT-Stamm jedoch auffällig verringert. Beim WT-Stamm waren 85 % der Sporen ausgekeimt, wogegen nur

23 % der  $\Delta ZtareA$ -Sporen auskeimten. Die Zahl der ausgekeimten Sporen der komplementierten Mutante war der Zahl des WTs sehr ähnlich und betrug 87 % (Abbildung 9). Der Transkriptionsfaktor *ZtareA* scheint für die dimorphe Transition in *Z. tritici* nicht essentiell zu sein, ist jedoch wahrscheinlich am Prozess der Auskeimung der Pyknidiosporen beteiligt. Da Stickstoffmangel in *Z. tritici* ein *Trigger* für das Einleiten der dimorphen Transition ist, ist die Beteiligung von ZtAreAp, dem Mediator der NMR, an beiden Prozessen naheliegend.

In *Z. tritici* ist die dimorphe Transition und das myzelartige Wachstum für die Infektion der Wirtspflanze unabdingbar (Nadal *et al.*, 2008). In Pflanzentests zur Untersuchung der Virulenz wurde beobachtet, dass  $\Delta ZtareA$  nicht mehr in der Lage war, Weizen zu infizieren. Pflanzen, die mit  $\Delta ZtareA$  infiziert worden waren, zeigten keine Symptome der *Septoria* Blattdürre. Auf den mit dem WT infizierten Blättern waren deutliche Anzeichen einer Infektion erkennbar. Dazu gehörte die Bildung von Pyknidien und eine schnell voranschreitende Chlorose sowie Blattdürre. Infolge der Komplementation von  $\Delta ZtareA$  mit dem *ZtareA*-Gen, konnte der WT-Phänotyp in Bezug auf die Pathogenität wiederhergestellt werden (Abbildung 10).

Vermutlich ist die Apathogenität von  $\Delta ZtareA$  auf die stark reduzierte Keimungsrate zurückzuführen, jedoch kann zum aktuellen Stand der Arbeit keine genauere Aussage darüber getroffen werden.

Die Regulation des Primär- und Sekundärmetabolismus sowie der morphologischen Entwicklung sind in filamentösen Pilzen häufig miteinander gekoppelt. Dies bietet Vorteile bei der Anpassung an äußere Gegebenheiten, insbesondere während der Pathogenese, und sichert somit das Überleben des Organismus (Calvo *et al.*, 2002; Yu und Keller, 2005).

Auch in anderen Pilzen reguliert AreAp, bzw. das dazu homologe Protein, morphologische Differenzierungsprozesse, welche häufig Pathogenitätsfaktoren sind. In der Mehrheit der Pilze, in denen der Einfluss von AreAp auf die Pathogenität untersucht wurde, führte die Inaktivierung des Transkriptionsfaktors zu einer Reduktion der Virulenz (Cotty, 1988; Snoeijers *et al.*, 2000; López-Berges *et al.*, 2010).

In *M. oryzae* reguliert das AreAp-Homolog NUT1p die Expression des pathogenitätsrelevanten Hydrophobins MPG1p, welches wiederum an der Sporulation und der Bildung funktionsfähiger Appressorien beteiligt ist (Soanes *et al.*, 2002). In *A. fumigatus* und *Candida albicans* führte die Inaktivierung von AreAp bzw. des AreAp-Homologs

Gln3p zu Mutanten, bei welchen eine stark reduzierte Virulenz festzustellen war (Lee *et al.*, 2011).

In *Fusarium oxysporum* konnte Gegenteiliges bewiesen werden. In diesem Pilz wurde die Expression von Pathogenitätsfaktoren durch AreAp reprimiert. Die Inaktivierung des Gens führte in diesem Fall zu Mutanten mit einem hypervirulenten Phänotyp. Es blieb bis heute ungeklärt, ob AreAp die Virulenz in *F. oxysporum* durch direkte transkriptionelle Repression unterdrückt oder *downstream* Repressoren aktiviert (López-Berges *et al.*, 2010).

Im humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* reguliert das AreAp-Homolog GAT1p die Entwicklung der Kapsel, die für die Virulenz essentiell ist. Zudem ist GAT1p in *C. neoformans* an der negativen Regulation der Biosynthese des Virulenzfaktors Melanin beteiligt. Die Melanisierung wird in diesem Pilz von der Stickstoffquelle beeinflusst, ist jedoch auch temperaturabhängig. Bei *in vitro* Wachstumsversuchen konnte bei 37 °C eine deutlich stärkere Melanisierung der  $\Delta gat1$ -Mutante im Vergleich zum WT beobachtet werden. Wurden die Kolonien bei 30 °C inkubiert, unterschied sich der Melanisierungsgrad nicht (Lee *et al.*, 2011).

Auch in *Z. tritici* konnte ein Unterschied in der Pigmentierung zwischen  $\Delta ZtareA$  und dem WT festgestellt werden. Bei der Untersuchung des Einflusses verschiedener N-Quellen auf das Wachstum, konnte eine verzögerte Dunkelfärbung der Mutante im Vergleich zu WT-Kolonien beobachtet werden (Abbildung 5). Mit einer zeitlichen Verzögerung von 7 Tagen waren auch die  $\Delta ZtareA$ -Kolonien dunkel pigmentiert. Die verlangsamte Pigmentsynthese bei der Kultivierung von  $\Delta ZtareA$  auf N-MM + NaNO<sub>3</sub> könnte durch das allgemeine Fitnessproblem der Mutante auf dieser N-Quelle zu erklären sein. Auf Aspartat war das Wachstum der Mutante, bis auf die Pigmentierung, vergleichbar mit dem des WT-Stammes und der komplementierten Mutante.

Die Tatsache, dass die Dunkelfärbung der  $\Delta ZtareA$ -Kolonien lediglich verzögert war und nicht völlig ausblieb, macht eine direkte Beteiligung von ZtAreAp an der Regulation der Pigmentierung in *Z. tritici* unwahrscheinlich.

Es existiert bislang keine Veröffentlichung, die bestätigt, dass es sich bei dem durch *Z. tritici* synthetisierten, dunkelbraun-schwarzen Pigment um Melanin handelt. Von Lendenmann *et al.* (2014) wurde anhand der Ergebnisse von Quantitative Trait Locus (QTL)-Untersuchungen die Theorie vorgeschlagen, dass es sich bei dem Pigment wahrscheinlich um Dihydroxynaphthalin (DHN)-Melanin handelt.

#### 4.2.3.1 Die Bedeutung von Stickstoffmangel und ZtAreAp im Infektionsverlauf

Mit Hilfe von q-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmenge von *ZtareA* mit dem Fortschreiten der Infektion abnahm und ab 1 dpi reduziert war. Nach 10 dpi betrug die relative Transkriptmenge von *ZtareA* im Vergleich zu 1 dpi nur noch 35 %. In der nekrotrophen Phase stieg die Transkriptmenge wieder etwas an, war aber mit 60 % des Ausgangswertes immer noch geringer als zu Beginn der Infektion (Abbildung 11).

Bei anderen untersuchten phytopathogenen Pilzen wird die Genexpression von *areA* zuerst meist hochreguliert, um dem Stickstoffmangel zu Beginn des Infektionszyklus entgegenzuwirken und alternative N-Quellen zu verstoffwechseln (Coleman *et al.*, 1997; Snoeijers und Alejandro, 2000; Pellier *et al.*, 2003).

*Z. tritici* ist während des gesamten Infektionszyklus apoplastisch lokalisiert (Cohen und Eyal, 1993; Palmer und Skinner, 2002). Der pflanzliche Apoplast gilt als stickstoffarm und glukosereich (Wilson *et al.*, 2012), weshalb nach dem Eindringen von *Z. tritici* in die Wirtspflanze ein Anstieg der *ZtareA*-Transkriptmenge zu erwarten wäre. Dies konnte jedoch mit Hilfe der durchgeführten q-PCR Analysen nicht bestätigt werden.

Auch Rudd *et al.* (2015) zeigten mit ihren Experimenten, dass während des Infektionsverlaufes in *Z. tritici* keine gesteigerte Expression von Genen, welche mit der Nitratsimilation assoziiert werden, beobachtet wurde.

Diese Untersuchungen der *ZtareA*-Genexpression implizierten, dass dem Transkriptionsfaktor in *Z. tritici* für eine erfolgreiche Pathogenese keine wesentliche Bedeutung zukommt. Der apathogene Phänotyp von  $\Delta ZtareA$  resultiert wahrscheinlich aus der stark reduzierten Keimungsfähigkeit der *loss of function* Mutante, denn die dimorphe Transition und das Hyphenwachstum sind für die Pathogenität von *Z. tritici* essentiell (Kema *et al.*, 1996).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *Z. tritici* in der Anfangsphase der Infektion weder Glukose, noch andere Nährstoffe aus dem pflanzlichen Apoplasten aufnimmt. Es wird vermutet, dass in dieser Phase der Infektion Lipidspeicher in den Sporen als Energiequelle dienen (Keon *et al.*, 2007; Palmer und Skinner, 2002; Orton *et al.*, 2011). Bekräftigt wird diese Annahme durch die Beobachtungen von Rudd *et al.* (2015), die im Rahmen einer Transkriptomanalyse zeigten, dass in *Z. tritici* in der frühen Phase der Infektion (1-4 dpi) Gene, welche Lipasen und Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren kodieren, signifikant hochreguliert werden.

Zudem konnte durch diese Transkriptomanalyse gezeigt werden, dass Gene, welche Transporter und Enzyme der Nitratassimilation kodieren, während des Infektionsverlaufs nicht signifikant hochreguliert werden. Dies deckt sich mit den Beobachtungen aus dieser Arbeit bezüglich der Transkriptmenge von *ZtareA* im Infektionsverlauf, die nicht signifikant gesteigert, sondern reduziert war (Abbildung 11).

In *Z. tritici* könnte es einen übergeordneten Regulationsmechanismus der Nährstoffaufnahme geben, der die metabolische Aktivität auf ein Minimum reduzieren kann. Möglicherweise ist Stickstoffmangel im Apoplasten der *Trigger* für die Aktivierung dieses Mechanismus. Solch eine metabolische Inaktivität könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb durch  $\Delta ZtareA$  während der Fermentation in MM + WE kaum Glukose aus dem Medium aufgenommen wurde. Die freie Glukose im Medium sank in der Zeitspanne von 26 Tagen nur um 2,5 g/L und die Zunahme an pilzlicher Trockenmasse war mit etwa 0,6 g/L sehr gering (Abbildung 13). Aufgrund des inaktivierten Transkriptionsfaktors wird die Expression der Nitrat- und Nitritreduktase kodierenden Gene in  $\Delta ZtareA$  wahrscheinlich nicht induziert (Abbildung 6). Dies würde dazu führen, dass die *loss of function* Mutante das im MM vorhandene Nitrat nicht verstoffwechseln kann und dadurch einem Stickstoffmangel ausgesetzt ist. Dies wiederum könnte die Reduktion der metabolischen Aktivität zur Folge haben.

Im Gegensatz dazu kann der WT-Stamm das Nitrat im MM als N-Quelle verwerten, sodass die Zellen keinem Stickstoffmangel ausgesetzt sind. Bei der Fermentation des WT-Stammes in MM + WE wurde die freie Glukose im Medium innerhalb von 4 Tagen vollständig verbraucht und es konnte in diesem Zeitraum eine deutliche Zunahme der Pilztrockenmasse von 0,6 g/L auf 3,8 g/L beobachtet werden (Abbildung 14). Wurde der WT-Stamm unter Stickstoffmangel (in N-MM + WE) kultiviert, so war die Veränderung des Glukosegehalts sowie der Pilzbiomasse und des pH-Wertes vergleichbar mit der Fermentation von  $\Delta ZtareA$  in MM + WE (Daten nicht gezeigt). Stickstoffmangel könnte, eventuell auch in Kombination mit einer Komponente aus dem WE, demnach in *Z. tritici* einer der Auslöser für das Herabsetzen der metabolischen Aktivität sein.

Möglicherweise ist dies Bestandteil der Infektionsstrategie des Pilzes, um in der Wirtspflanze unentdeckt zu bleiben (Keon *et al.*, 2007; Palmer und Skinner, 2002; Orton *et al.*, 2011).

Auch im Lebenszyklus anderer Phytopathogene existieren zu Beginn der Infektion solche metabolischen Ruhephasen. Bei *Botrytis cinerea*, dem Erreger der Grauschimmelfäule, kommt es nach dem Eindringen in die Wirtspflanze zunächst zur Ausbildung kleiner, sichtbarer Läsionen. Diese breiten sich jedoch im Anschluss nicht weiter aus, sondern es folgt eine Ruheperiode, in der die metabolische Aktivität des Pilzes stark reduziert ist. Nach einiger Zeit nimmt die metabolische Aktivität wieder zu und es beginnt ein intensives Hyphenwachstum, das mit dem schlagartigen Voranschreiten der Infektion einhergeht (Prusky, 1996; van Klan, 2005).

Aus Pilzen der Gattung *Colletotrichum* ist die metabolische Ruheperiode zu Beginn des Infektionszyklus ebenfalls bekannt. Die Konidien von *C. gloeosporioides* keimen auf unreifen Früchten aus und der Pilz dringt mit Hilfe von Appressorien durch die Kutikula in die Wirtspflanze ein. Dort bilden sich Primärhyphen, welche die Epidermiszellen kolonisieren, metabolisch ruhend bleiben und sich zunächst nicht weiter ausbreiten. Nach dem Reifeprozess der Früchte differenzieren sich die Primärhyphen in dünne Sekundärhyphen, welche das gesamte Mesokarp kolonisieren und einen Übergang zur nekrotrophen Lebensweise einleiten (Prusky *et al.*, 2013).

Welche äußeren Signale für den Wechsel aus der metabolischen Ruhephase zur nekrotrophen Lebensweise verantwortlich sind, ist bis heute unklar. Vermutungen, dass z.B. der Reifegrad bzw. der Anteil an verestertem Pektin in infizierten Früchten der entscheidende *Trigger* ist, konnten widerlegt werden (González-Fernández *et al.*, 2010). Der Alterungsprozess der infizierten Pflanzen scheint die Ruhephase dennoch signifikant zu beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass *Botrytis allii* junge Blätter von Zwiebelpflanzen kolonisiert, aber erst in alternden Blättern eine signifikante Zunahme der Pilzbiomasse stattfindet (Prusky, 1996).

#### 4.2.4 Isolierung von p-Hydroxybenzoesäure aus $\Delta ZtareA$

Im Zuge dieser Arbeit konnten aus dem Kulturfiltrat der Fermentation von  $\Delta ZtareA$  in MM + WE 6,9 mg p-Hydroxybenzoesäure (p-HBS) isoliert werden. Die phenolische Verbindung mit dem Molekulargewicht von 138 Da akkumulierte in der Kulturbrühe und konnte mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethylacetat, Dichlormethan und Methanol extrahiert werden. Bei Fermentation des WT-Stammes unter denselben Bedingungen war mittels HPLC-Analyse des Kulturfiltratextraktes keine p-HBS zu detektieren (Abbildung 12).

Untersuchungen der Reinsubstanz bezüglich phytotoxischer Aktivität gegen Weizenblätter ergaben eine moderate Phytotoxizität ab einer applizierten Menge von 25 µg pro Blatt (Abbildung 16).

p-HBS ist eine literaturbekannte pflanzliche Allelochemikalie (Li *et al.*, 2010; Ahrabi *et al.*, 2011). Im Allgemeinen sind dies Sekundärmetabolite, welche von Pflanzen produziert werden, um die Keimung, das Wachstum oder die Entwicklung anderer Pflanzen zu inhibieren (Koocheki *et al.*, 2013). Die Wirkung der p-HBS beruht auf der Reduktion der hydraulischen Leitfähigkeit und der Netto-Nährstoffaufnahme und damit schließlich in der Hemmung von Wachstumsprozessen. Das Wirkspektrum von p-HBS ist breit gefächert. So konnte nach Applikation von 5 mM p-HBS z.B. eine Reduktion des Chlorophyllgehalts in den Blättern von Raps (*Brassica napus* cv. Talaieh) nachgewiesen werden (Ahrabi *et al.*, 2011). Zudem konnte eine wachstumshemmende Wirkung von p-HBS auf Gartensalat (*Lactuca sativa*) und Chinakohl (*Brassica chinensis*) sowie eine stark keimungshemmende Wirkung gegen die Bohnenart *Phaseolus mungo* L. gezeigt werden (Blum, 1996; Li *et al.*, 2010).

Pflanzen produzieren infolge einer Immunantwort auf die Invasion pathogener Mikroorganismen oder als Stressreaktion auf abiotische Einflüsse, eine Vielzahl phenolischer Verbindungen mit unterschiedlicher Funktion. Unter diesen sind nicht nur Allelochemikalien zur Verteidigung des Habitats vor konkurrierenden Pflanzen, sondern auch Phenolsäuren mit antimikrobiellen und antioxidativen Eigenschaften. Zudem können bestimmte Phenolsäuren zur Steigerung des mechanischen Schutzes vor Pathogenen durch eine Veresterung mit der Zellwand verknüpft werden (Vaher *et al.*, 2010; Benincasa *et al.*, 2015). Eine antibakterielle Wirkung von z.B. Benzoesäure, Phenylpropionsäure, Phenylessigsäure und p-HBS konnte gegen gramnegative und grampositive Bakterien wie *E. coli*, verschiedene Laktobazillen und *Staphylococcus aureus* demonstriert werden (Cueva *et al.*, 2010). *In vitro* Wachstumsassays mit 0,15 %-iger Benzoesäure zeigten eine 95 %-ige Inhibition des Wachstums von *F. oxysporum* (Shukla und Dwivedi, 2013). Des Weiteren konnte eine antifungische Wirkung weiterer Phenolsäuren, wie z.B. von Kaffeesäure, Chlorogensäure und Zimtsäure, bestätigt werden. Die Wirkstärke der einzelnen Verbindungen kann von Isolat zu Isolat einer Pilzart unterschiedlich sein (Korošec *et al.*, 2014; Gauthier *et al.*, 2016).

#### 4.2.4.1 Detoxifizierung pflanzlicher Phenolsäuren durch *Zymoseptoria tritici*

Als Antwort auf die pflanzliche Produktion giftiger Phenolsäuren haben phytopathogene Pilze im Laufe der Evolution Mechanismen zur Detoxifizierung entwickelt. Einige Pilze sind in der Lage die natürlich in Pflanzen vorkommenden Phenolsäuren zu weniger toxischen Derivaten umzuwandeln (French *et al.*, 1976; Sachan *et al.*, 2006; Nimura *et al.*, 2010). *F. graminearum* beispielsweise kann die toxische Kaffeesäure in Hydroxykaffeesäure bzw. Chlorogensäure in Hydroxychlorogensäure und Protokatechusäure metabolisieren und dadurch detoxifizieren (Gauthier *et al.*, 2016).

Die aus diesen Prozessen hervorgehenden Phenolsäurederivate werden zum Teil in den pilzlichen Aromatenstoffwechsel eingebracht und werden weiter metabolisiert (Korošec *et al.*, 2014). Über diverse Zwischenschritte und Intermediate des  $\beta$ -Ketoacidwegs kann p-HBS, z.B. in den Citratcyklus geschleust und als C-Quelle verwertet werden (van Gorcom *et al.*, 1990; Harwood und Parales, 1996). Die entstandene p-HBS wurde während der Fermentation durch *Z. tritici* nicht weiter metabolisiert, sondern akkumulierte im Kulturmedium. Mit Hilfe von Fütterungsversuchen mit p-HBA konnte bestätigt werden, dass diese weder vom WT-Stamm noch von  $\Delta ZtareA$  metabolisiert wurde (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die natürlich in Weizen vorkommenden antifungischen Phenolsäuren Zimtsäure und Benzoessäure durch *Z. tritici* in p-HBS umgewandelt werden können. Die Metabolisierung der Zimtsäure erfolgte über das Intermediat Benzoessäure. Zudem entstand bei der Konversion von Zimtsäure p-Coumarinsäure, welche im weiteren Verlauf der Fermentation abgebaut wurde (Abbildung 17.A und B). Das Abbauprodukt der p-Coumarinsäure konnte nicht identifiziert werden und scheint keine UV-Absorption bei den aufgezeichneten Wellenlängen während der HPLC-Analysen (230, 250 und 280 nm) zu haben, da kein weiterer Peak im Chromatogramm detektiert wurde. Eine Konversion von p-Coumarinsäure zu p-HBS konnte in Fermentationsversuchen mit *Z. tritici* in MM und einer Zufütterung von p-Coumarinsäure nicht beobachtet werden.

Interessanterweise konnte die Umwandlung von Benzoessäure und Zimtsäure zu p-HBS sowohl von  $\Delta ZtareA$ , als auch vom WT ausgeführt werden, wobei in den Fermentationsversuchen in MM + WE die p-HBS nur in der Kulturbrühe von  $\Delta ZtareA$  detektiert wurde (Abbildung 12).

Mit Hilfe von HPLC-Analysen des verwendeten Weizenblattextraktes konnte festgestellt werden, dass dieses die Phenolsäuren p-Coumarinsäure, Vanillinsäure, Salicylsäure und Ferulasäure beinhaltet. Es konnte keine Zimtsäure oder Benzoessäure nachgewiesen werden, was die Frage nach möglichen weiteren Vorläufermolekülen der p-HBS bei der Fermentation von *Z. tritici* in MM + WE offenlässt. Diese Vorstufen könnten im WE enthalten sein und in einem ersten Schritt in der Fermentation zu Zimtsäure umgewandelt worden sein, um dann weiter in die Benzoessäure und schließlich in p-HBS konvertiert zu werden. Dieser Schritt wird womöglich von ZtAreAp negativ reguliert. Im verwendeten MM liegt als N-Quelle Natriumnitrat vor, was im WT zu einer gesteigerten Genexpression von *ZtareA* führt (Abbildung 4). In der *loss of function* Mutante konnte kein *areA*-Transkript detektiert werden, was das Ausbleiben der Repression dieses möglichen ersten Katalyseschritts von der Konversion eines eventuellen Zimtsäure-Vorläufers erklären könnte. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass eine Komponente des WEs in Kombination mit ZtAreAp zur Hemmung der Konversion eines möglichen Zimtsäure-Vorläufers führt.

Zu Beginn wurde angenommen, dass die isolierte p-HBS von *Z. tritici de novo* synthetisiert wurde. In Eukaryoten kann p-HBS als Vorstufe für die Ubichinon-Synthese dienen. In *S. cerevisiae* wird p-HBS über eine enzymatische Umwandlung von Chorismat durch die Chorismat-Pyruvat-Lyase oder aus Tyrosin über p-Coumarinsäure synthetisiert. Die p-HBS wird dann über verschiedene Zwischenschritte zum Ubichinon umgewandelt (Meganathan, 2001). In Dothideomyceten kann p-HBS analog zu *S. cerevisiae* aus Chorismat erzeugt werden und ebenfalls zu Ubichinon weitermetabolisiert werden (KEGG Pathway Database; Kanehisa und Goto, 1999; Kanehisa *et al.*, 2016).

Außer aus der Detoxifizierung von anderen Phenolsäuren aus Weizen, könnte die aus  $\Delta ZtareA$  isolierte p-HBS aus der Ubichinon-Synthese stammen. Es gibt jedoch einige Hinweise, welche dies unwahrscheinlich machen. Zum Beispiel wurde die Phenolsäure im Kulturfiltratextrakt und nicht im Myzelextrakt gefunden. Da die Synthese des Ubichinons intrazellulär abläuft (Szkopińska, 2000), wäre für einen solchen Fall zu klären, weshalb die p-HBS bei der Fermentation in MM + WE durch  $\Delta ZtareA$  aus der Zelle transportiert wurde. Des Weiteren wäre zu klären, weshalb die p-HBS in  $\Delta ZtareA$  nicht weitermetabolisiert wurde, sondern im Medium akkumulierte. Im WT müsste die p-HBS hingegen weitermetabolisiert werden und wäre deshalb nicht im Medium

nachweisbar. Natürlich wäre dann weiterhin zu überprüfen, welche Rolle dem Transkriptionsfaktor ZtAreAp in diesem Prozess zukommt.

Um die Frage der Herkunft der p-HBS im Kulturmedium aus der Fermentation von *AZtareA* in MM + WE abschließend zu beantworten, müssten noch weitere Versuche durchgeführt werden. Die Umwandlung der Zimtsäure sowie der Benzoessäure müsste *in planta* nachgewiesen werden, um die Metabolisierung dieser Phenolsäuren im Zuge einer Detoxifizierung zu verifizieren.

Da für p-HBS eine phytotoxische Aktivität gegen Weizenblätter gezeigt werden konnte (Abbildung 16), wäre es denkbar, dass eine Akkumulation der Substanz im Apoplasten zum pflanzlichen Zelltod beiträgt bzw. den Übergang in die nekrotrophe Phase der Infektion unterstützt. Allerdings müsste auch hier *in vivo* untersucht werden, ob eine solche Akkumulation *in planta* überhaupt stattfindet und wenn ja, welche Konzentrationen im Apoplasten erreicht werden. Erst dann könnte diese Hypothese belegt und abschließend bestätigt werden.

#### 4.2.4.2 Die Umwandlung von Benzoessäure zu p-Hydroxybenzoessäure wird von ZtCYP53p katalysiert

Die Familie der CYP53p Monooxygenasen, oder auch Benzoat-4-Monooxygenasen (B4MO), sind pilzspezifische Enzyme, die bis heute nur in Vertretern der Asco- und Basidiomyceten gefunden wurden (Korošec *et al.*, 2014; Berne *et al.*, 2015). Sie katalysieren die Hydroxylierungsreaktion von Benzoessäure an der *para*-Position des Benzolrings, deren Produkt die p-HBS ist.

Mit Hilfe der blastp-Suche der NCBI-Datenbank konnte ein Protein mit signifikanter Sequenzhomologie zu CYP53p aus den eng verwandten Pilzen *Z. brevis* (E-value 0.0) bzw. *S. musiva* (E-value 0.0) im Genom von *Z. tritici* identifiziert werden (NCBI Accession: XP\_003856338.1; JGI Protein-ID 53213). Bioinformatische Analysen des Joint Genome Institutes (JGI) ergaben, dass an ZtCYP53p mit hoher Wahrscheinlichkeit ein N-terminales Signalpeptid für die Sekretion aus der Zelle angefügt ist.

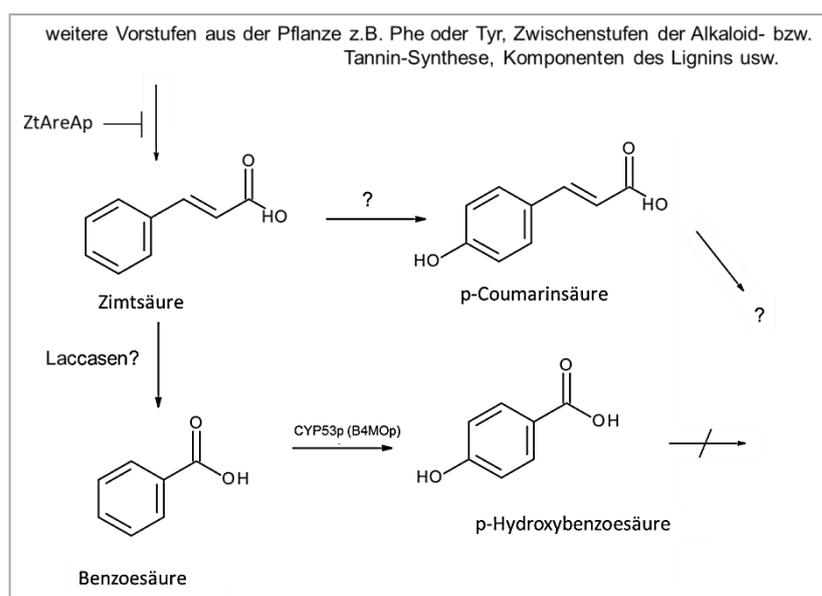
Die Genexpression von *cyp53* lässt sich bekanntermaßen durch Benzoessäure induzieren (van den Brink *et al.*, 1996; Podobnik *et al.*, 2008). Mittels q-PCR konnte gezeigt werden, dass während der Umwandlung der Benzoessäure zur p-HBS durch *Z. tritici* in MM + 100 µM Benzoessäure, die Genexpression des *Ztcyp53* nach 6 Stunden auf das 3,5-fache und nach 24 Stunden sogar auf das 24-fache gesteigert war. Die Zunahme der

*Ztcyp53*-Transkriptmenge korrelierte mit der Abnahme der Benzoesäuremenge. Im Vergleich dazu war die Transkriptmenge von *Ztcyp53* in MM ohne Benzoesäure nicht signifikant gesteigert (Abbildung 18).

Eine direkte Regulation der *Ztcyp53*-Genexpression durch *ZtareA* konnte nicht bestätigt werden. Mit Hilfe von q-PCR Analysen konnte weder beim WT, noch bei  $\Delta ZtareA$ , nach Inkubation auf nitrat- und glutamathaltigem Medium eine signifikante Genregulation von *Ztcyp53* gezeigt werden. Die relativen *Ztcyp53*-Transkriptmengen der Mutante und des WT nach Kultivierung auf nitrat- und glutamathaltigem Medium unterscheiden sich nicht signifikant (Abbildung 19).

Diese Beobachtung verstärkt die Hypothese eines Zimtsäure-Vorläufers aus dem WE, dessen Konversion durch *ZtareA* während der Fermentation in MM + WE im WT gehemmt wurde.

Zusammenfassend ist der hypothetische Abbauweg pflanzlicher Phenolsäuren durch *Z. tritici* in Abbildung 29 veranschaulicht.



**Abbildung 29: Hypothetisches Modell des Abbauweges pflanzlicher Phenolsäuren durch *Zymoseptoria tritici*.** Ausgehend von der Zimtsäure spaltet sich der Abbauweg. Zum einen in den Abbau der p-Coumarinsäure und zum anderen in die Konversion zur p-Hydroxybenzoesäure über das Intermediat Benzoessäure. Die Hydroxylierung der Benzoessäure zu p-Hydroxybenzoesäure wird wahrscheinlich von der Cytochrom P450 Monooxygenase CYP53p katalysiert. Möglicherweise existieren weitere Vorstufen, die zuerst in Zimtsäure umgewandelt werden können. Dieser Prozess könnte einer negativen Regulation durch *ZtAreAp* unterliegen. Phe: Phenylalanin, Tyr: Tyrosin.

Ausgehend von der Zimtsäure verläuft die Metabolisierung möglicherweise über zwei Zweige. Zum einen wird die Zimtsäure zu p-Coumarinsäure umgewandelt und zum anderen wird sie, über Benzoessäure als Intermediat, zur p-HBS konvertiert.

Die p-Coumarinsäure wurde im Gegensatz zur p-HBS im weiteren zeitlichen Verlauf durch *Z. tritici* abgebaut. Eine Konversion von p-Coumarinsäure zu p-HBS konnte nicht beobachtet werden. Anhand der hier vorgestellten Ergebnisse wird die Hydroxylierung der Benzoesäure und die daraus resultierende p-HBS in *Z. tritici* wahrscheinlich von CYP53p katalysiert.

Die Konversion von Zimtsäure zu p-Coumarinsäure ist in Pflanzen beschrieben, während dieser Stoffwechselprozess in Pilzen noch nicht untersucht wurde. Die zum Phenylpropanoid-Weg gehörende Umwandlung wird in Pflanzen vom Cytochrom P450 Enzym Cinnamate-4-Hydroxylase (oder auch CYP73A5) katalysiert (Rasmussen und Dixon, 1999). Homologe dazu aus Pilzen sind bis heute nicht bekannt. Die Hydroxylierung am Benzolring der Zimtsäure wird in *Z. tritici*, wie in Pflanzen, wahrscheinlich von einer Monooxygenase katalysiert. Diese Vermutung konnte jedoch noch nicht bestätigt werden. Ebenso wenig ist bekannt, ob bei der Umwandlung der Zimtsäure in p-Coumarinsäure möglicherweise Zwischenschritte existieren.

Die Metabolisierung der Zimtsäure zu Benzoesäure wurde bereits in Pilzen sowie in Pflanzen beschrieben. Bei dieser Reaktion muss die C-Kette am Benzolring der Zimtsäure um eine C<sub>2</sub>-Einheit verkürzt werden. Der Mechanismus, der sich hinter dieser Reaktion verbirgt, ist bis heute noch nicht aufgeklärt (Rasmussen und Dixon, 1999). In Tabakpflanzen geschieht die C-Kettenverkürzung der Zimtsäure möglicherweise über eine CoA-abhängige  $\beta$ -Oxidation (Jarvis *et al.*, 2000). Bei *Z. tritici* findet die Umwandlung der Zimtsäure zu Benzoesäure vermutlich extrazellulär in der Kulturbrühe statt, da alle beteiligten Substanzen aus dem Kulturfiltrat und nicht aus dem Myzel isoliert wurden. Der Ort der  $\beta$ -Oxidation ist jedoch im Matrixraum der Mitochondrien, was eine Beteiligung dieses Mechanismus an der Umwandlung der Zimtsäure zu Benzoesäure in *Z. tritici* unwahrscheinlich macht.

Im Endophyt *Phomopsis liquidambari* wurde der Abbau von Zimtsäure über Benzoesäure als Intermediat nachgewiesen. Diese Reaktion findet, anders als bei Pflanzen, mit Hilfe sekretierter Laccasen statt, welche die Zimtsäure zunächst zu Styrol, dann zu Benzaldehyd und im Anschluss zu Benzoesäure umwandeln (Xie und Dai, 2015).

Mit Hilfe einer Suche in der JGI-Genomdatenbank konnten in *Z. tritici* fünf Gene, welche sekretierte Laccasen kodieren, identifiziert werden. Möglicherweise findet der Umwandlungsschritt von Zimtsäure zu Benzoesäure in *Z. tritici* ebenfalls mit Hilfe von sekretierten Laccasen statt.

#### 4.2.4.3 Genexpression von *Ztcyp53* im Infektionsverlauf

Um eine mögliche Bedeutung von *Ztcyp53* für den Infektionsprozess zu untersuchen, wurde die Genexpression im WT-Stamm IPO323 mittels q-PCR *in vivo* im zeitlichen Verlauf der Infektion von Weizenpflanzen analysiert. Die Ergebnisse der q-PCR Analyse deuten auf eine gesteigerte Expression von *Ztcyp53* in der späten symptomlosen Phase der Infektion hin, in welcher der Übergang zur Nekrotrophie stattfindet (Rudd *et al.*, 2015). Im Vergleich zum Startpunkt der Infektion (1 dpi) war die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* 10 dpi um das ca. 8-fache gesteigert. Zum 14. Tag nach Infektion war die relative Transkriptmenge von *Ztcyp53* wieder reduziert, aber im Vergleich zum Zeitpunkt 1 dpi immer noch auf das 4,5-fache gesteigert. Nach 28 dpi entsprach die Menge an mRNA der Menge an Tag 1 (Abbildung 20).

Gegen Ende der symptomlosen Phase der Infektion findet nicht nur in *Z. tritici* eine Veränderung des Expressionsprofils statt. Auch auf Seiten der Weizenpflanze werden zu diesem Zeitpunkt einige Gene, deren Produkte mit der Pathogen-Abwehr in Verbindung stehen, transkriptionell reguliert. Zum Beispiel wird die Genexpression des Enzyms Lipoxygenase-2 gesteigert, welches in die Jasmonsäure-Biosynthese involviert ist. Ebenso sind Peroxidase-kodierende Gene, deren Produkte an der Generierung von ROS beteiligt sind sowie Gene, die für Plastocyanin-ähnliche Proteine kodieren, stark hochreguliert. Diese Proteine sind bekanntermaßen am programmierten Zelltod in Pflanzen beteiligt (Rudd *et al.*, 2015).

Das Oxylipin Jasmonsäure ist in Pflanzen an der Regulation diverser physiologischer Prozesse beteiligt und ist ein wichtiges zelluläres Signal bei der Aktivierung von Immunreaktionen auf die meisten nekrotrophen Mikroorganismen (Browse, 2009; Ballaré, 2011). Die Synthese pflanzlicher Phenolsäuren bei Umweltstress, ausgelöst durch biotische und abiotische Faktoren, wird durch Jasmonsäure induziert (Caretto *et al.*, 2015). Diese phenolischen Verbindungen werden in der Vakuole der Pflanze sowie im Apoplasten akkumuliert (Takahama, 2004). Im Apoplasten kann *Z. tritici* während des Infektionsverlaufes somit theoretisch mit Phenolsäuren, wie z.B. Zimtsäure oder Benzoessäure, in Kontakt kommen. Durch die Umwandlung der Zimtsäure entsteht Benzoessäure. Benzoessäure ist das Substrat des ZtCYP53p und induziert zudem dessen Genexpression (van den Brink *et al.*, 1996; Podobnik *et al.*, 2008).

Durch q-PCR Versuche konnte eine zeitliche Korrelation zwischen der Steigerung der Transkriptmenge von *Ztcyp53* in *Z. tritici* und der pflanzlichen Jasmonsäurebiosynthese

festgestellt werden (Abbildung 20). Da Jasmonsäure an der Induktion der Biosynthese von Phenolsäuren beteiligt ist, könnte ein direkter Zusammenhang zwischen der pflanzlichen Immunreaktion und der Detoxifikation von Phenolsäuren durch *Z. tritici* bestehen.

#### 4.2.4.4 p-Hydroxybenzoesäure ist nicht an der Induktion der Genexpression von PR-Proteinen in Weizen beteiligt

Pflanzliche Rezeptoren können anhand konservierter, mikrobieller Oberflächenstrukturen das Eindringen von Pathogenen erkennen und anschließend eine Immunantwort auslösen. Die systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) ist ein Mechanismus der pflanzlichen Abwehr, der nach einer zunächst lokalen Exposition gegenüber Krankheitserregern zu einem allgemeinen Schutz führt. SAR kann durch eine breite Palette von Krankheitserregern induziert werden, insbesondere durch diejenigen, die Gewebnekrosen verursachen. Die Abwehrreaktion ist mit der Expression einer Vielzahl von Genen assoziiert, den sogenannten „*pathogenesis-related* (PR)“ Genen (Conrath, 2006).

Die durch sie kodierten PR-Proteine können bei direktem Kontakt mit Pathogenen antimikrobielle Eigenschaften haben, indem sie Komponenten der bakteriellen oder pilzlichen Zellwand angreifen. Sie können aber auch als Botenstoffe zur Induktion der SAR in entfernteren Kompartimenten der Pflanze fungieren (Vernooij *et al.*, 1994; Shetty *et al.*, 2009; Saboki *et al.*, 2011).

Die Aktivierung der SAR erfordert die endogene Anhäufung des Phytohormons Salicylsäure (o-Hydroxybenzoesäure), welche dann wiederum zusammen mit weiteren Botenstoffen, wie Methyljasmonat, Signaltransduktionswege aktiviert (Jones und Dangl, 2006; Browse, 2009).

Die Bedeutung der p-HBS (einem strukturellen Analogon der Salicylsäure) für die pflanzliche Immunreaktion konnte noch nicht abschließend geklärt werden. In Gurkenpflanzen (*Cucumis sativus*) wurde eine zeitgleiche Akkumulation von Salicylsäure und p-HBS im Phloemsaft während der SAR beobachtet, wobei die Aufgabe der p-HBS während dieser Abwehrreaktion unklar ist (Smith-Becker *et al.*, 1998). In Tabakpflanzen wurde der Einfluss von p-HBS auf die Induktion einer Immunantwort bereits genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur Salicylsäure, die Genexpression der mit SAR-assoziierten Proteine, wie der Phenylalanin-Ammonium-

Lyase (PAL) aber auch verschiedener PR-Proteine, in Anwesenheit von p-HBS nicht signifikant hochreguliert wurde (Mur *et al.*, 1996).

Ray *et al.* (2003) konnten zeigen, dass *Z. tritici* in der Lage ist, SAR auszulösen und die Expression von PR-Proteinen in Weizen zu induzieren.

Es wird vermutet, dass *Z. tritici* im Übergang in die nekrotrophe Phase Substanzen sekretiert, mit denen der Schädling das Immunsystem der Pflanze stimuliert bzw. eventuell sogar hyperaktiviert und somit die hypersensitive Reaktion und den programmierten Zelltod auslöst (Keon *et al.*, 2007; Rudd *et al.*, 2015).

Mit Hilfe von q-PCR Analysen wurde in dieser Arbeit eine mögliche Beteiligung der p-HBS an einer Immunantwort der Weizenpflanze untersucht. Dazu wurde die Induktion der Genexpression von PR-Proteinen in Weizen, in Anwesenheit von p-HBS, *in vitro* analysiert. Zwei aus Weizen bekannte PR Proteine PR2 ( $\beta$ -1,3-Glucanase, NCBI Accession Y18212) und PR4 (Wheatwin 1, NCBI Accession AJ006098.1) wurden nach Desmond *et al.*, 2006 ausgewählt und deren Genexpression nach Inkubation von Weizenblättern in p-HBS analysiert. Zum Vergleich wurden Weizenblätter in Salicylsäure und Methyljasmonat inkubiert. Als Negativkontrolle diente  $H_2O_{UF}$ . Die Resultate zeigten, dass p-HBS in Weizen wahrscheinlich nicht an der Induktion von PR-Proteinen beteiligt ist. Die relativen Transkriptmengen der PR-Gene nach Induktion mit p-HBS waren vergleichbar mit den Mengen nach Inkubation in  $H_2O_{UF}$ . Im Vergleich dazu war die Transkriptmenge nach Induktion mit Salicylsäure und Methyljasmonat signifikant erhöht. Die relative Transkriptmenge des PR2 wurde nach Induktion mit Methyljasmonat auf das 5,8-fache und mit Salicylsäure auf das 2,4-fache gesteigert. Die Transkriptmenge des PR4 war jeweils um das 10,8-fache bzw. 6,2-fache erhöht. Insgesamt wurde die Expression der PR-Gene durch Methyljasmonat stärker induziert als durch Salicylsäure und die Expression von PR4 war durch die beiden Substanzen stärker induzierbar als die von PR2 (Abbildung 21). Wahrscheinlich hat p-HBS in Weizen keinen Einfluss auf die Induktion der SAR und der Expression der beiden getesteten PR-Proteine, jedoch kann eine sonstige Beteiligung des Moleküls an Abwehrreaktionen zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.2.4.5 Mögliche Manipulation der pflanzlichen Immunantwort durch die Metabolisierung von Salicylsäure

Viele Pathogene, darunter sowohl Bakterien als auch Pilze, interagieren durch die Sekretion verschiedener Effektoren mit dem Salicylsäure-Signalweg der Pflanzen, um deren Immunreaktion zu manipulieren. Besonders biotrophe und endophytische Organismen unterdrücken häufig die Salicylsäure-induzierte Signalkaskade, um das Einleiten einer Immunantwort zu verhindern (Navarro-Meléndez und Heil, 2014; Asai und Shirasu, 2015; Shigenaga und Argueso, 2016).

Im Laufe von Fermentationsversuchen in MM mit Salicylsäure war auffällig, dass die Salicylsäure im Medium durch den *Z. tritici* WT (Abbildung 22) sowie durch  $\Delta ZtareA$  (Daten nicht gezeigt) innerhalb von drei Tagen vollständig metabolisiert war. Der Weizenschädling scheint über Enzyme zu verfügen, welche an der Metabolisierung der Salicylsäure beteiligt sein könnten. Mit Hilfe einer Suche in der JGI-Genomdatenbank und einer anschließenden blastp-Suche mit dem Algorithmus des NCBI, konnte ein Salicylat-Hydroxylase ähnliches Protein aus *Z. tritici* identifiziert werden (NCBI Accession: XP\_003851387.1, JGI Protein-ID 43383). Dieses hat signifikante Homologien zu Salicylat-Hydroxylase ähnlichen Proteinen aus anderen Pilzen wie *Z. brevis* (E-value 0.0), *Dothistroma septosporum* (E-value 0.0) und *Coccidioides immitis* bzw. *C. posadasii* (jeweils (E-value 0.0)).

Salicylat-Hydroxylasen können Salicylsäure zu Catechol umwandeln (Yamamoto *et al.*, 1965). Bis heute ist über diese Enzyme aus Pilzen wenig bekannt. In den Pilzen *Trichosporon cutaneum* (Sze und Dagley, 1984), *Aspergillus nidulans* (Graminha *et al.*, 2004), *Fusarium* spp. (Dodge und Wackett, 2005), *T. moniliiforme* (Iwasaki *et al.*, 2010) und *Ustilago maydis* (Rabe *et al.*, 2013) wurde die Aktivität besagter Enzyme bereits untersucht und beschrieben. Es wird vermutet, dass Phytopathogene, durch die Metabolisierung der Salicylsäure in der Pflanze, die Immunantwort schwächen oder gänzlich unterdrücken können (Rabe *et al.*, 2013).

Möglicherweise ist der Abbau des Phytohormons durch *Z. tritici* in Weizen einer der molekularen Mechanismen, mit dem das Weizenpathogen es schafft, die lange Latenzperiode in der Pflanze zu überleben. Floerl *et al.* (2012) machten die Beobachtung, dass Salicylsäure im Apoplasten von *Arabidopsis* Pflanzen akkumulierte, welche zuvor mit dem phytopathogenen Ascomycet *Verticillium longisporum* infiziert wurden. Dies lässt vermuten, dass auch *Z. tritici* im Infektionsverlauf mit Salicylsäure in Kontakt kommen

kann und durch dessen Metabolisierung das pflanzliche Immunsystem unterdrückt werden könnte.

Um diese Hypothese zu verifizieren, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Zum einen müsste *in vivo* die Akkumulation von Salicylsäure im Apoplasten der Weizenpflanze und dessen Metabolisierung durch *Z. tritici* nachgewiesen werden. Zum anderen müsste mittels q-PCR Analyse die Expression des Gens, welches das Salicylat-Hydroxylase ähnliche Enzym aus *Z. tritici* kodiert, im Infektionsverlauf untersucht werden. Gegebenenfalls könnte durch die Inaktivierung des kodierenden Gens die Beteiligung des Enzyms am Abbau des Phytohormons und dessen Relevanz für die Pathogenität bewiesen werden.

### **4.3 Untersuchung der *in vivo* Genexpression der Polyketidsynthasen aus *Zyoseptoria tritici* im Infektionsverlauf**

Zur Identifikation putativer Sekundärmetaboliten aus der Gruppe der Polyketide, die eventuell Einfluss auf die Pathogenität haben, wurde die Genexpression von polyketid-synthase-kodierenden Genen aus dem *Z. tritici* WT-Stamm IPO323 während des Infektionszyklus untersucht. Polyketide bilden die größte Gruppe der Sekundärmetaboliten in filamentösen Pilzen und ihre Komplexität und Diversität ist aufgrund ihres speziellen Synthesemechanismus besonders hoch (Brakhage, 2013). Neben den Polyketiden gibt es eine weitere große Gruppe von Sekundärmetaboliten, die nichtribosomalen Peptide (NRP). Viele in der Arzneimittelindustrie verwendeten Sekundärmetabolite, z.B. die Antibiotika Actinomycin und Vancomycin oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A, gehören zu dieser chemischen Gruppe. NRPs werden von multimodularen Enzymkomplexen, den nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), synthetisiert. Im Gegensatz zu Peptiden und Proteinen, die an Ribosomen gebildet werden, können NRPs nichtproteinogene Aminosäuren beinhalten und unabhängig von genetisch kodierten Sequenzen entstehen. Dies führt zu einer großen strukturellen Diversität und vielfältigen biologischen Aktivitäten (Kleinkauf und von Döhren, 1990; Hur *et al.*, 2012; Soukup *et al.*, 2016). In dieser Arbeit wurden jedoch nur die Polyketidsynthasen aus *Z. tritici* näher untersucht.

Das im Rahmen dieser Arbeit erstellte q-PCR Expressions-Profil beschreibt die transkriptionelle Aktivierung der zehn *pks*-Gene aus *Z. tritici* im zeitlichen Verlauf der Infektion.

Die vier verschiedenen Messzeitpunkte orientierten sich dabei an den verschiedenen Phasen der Infektion. Tag 4 repräsentierte die symptomlose Phase, Tag 10 und 14 den metabolischen Wechsel zur nekrotrophen Lebensweise und Tag 28 die nekrotrophe Phase. Die gewählten Zeitpunkte sind als exemplarisch zu betrachten, denn die Entwicklung von Pilz und Weizenpflanze sind von äußeren Bedingungen wie Lichtintensität und Temperatur abhängig (Rudd *et al.*, 2015).

Die errechneten Transkriptmengen wurden relativ zum Startpunkt der Infektion (1 dpi) dargestellt und auf das *Housekeeping*-Gen  $\beta$ -Tubulin normalisiert. Die so dokumentierten Veränderungen der Transkriptmengen der einzelnen *pks*-Gene lassen einen Rückschluss auf deren transkriptionelle Aktivität während den verschiedenen Phasen des Infektionszyklus zu. Dies hilft dabei einzuschätzen, welche Rolle die PKS und damit sekundäre Stoffwechselprodukte während der Infektion spielen.

Anhand der Ergebnisse der q-PCR konnte gezeigt werden, dass die Transkriptmengen verschiedener *pks*-Gene im Infektionsverlauf variierten (Abbildung 24). In der symptomlosen Phase der Infektion (4 dpi) war besonders die hohe Transkriptmenge von *Ztpks4* im Vergleich zu 1 dpi auffällig, dessen Transkriptmenge das 13-fache der Menge des Zeitpunktes 1 dpi betrug. In der frühen Übergangsphase zur Nekrotrophie (10 dpi) war zu beobachten, dass die Transkriptmenge von *Ztpks4* auf das 16-fache der Ausgangsmenge weiterhin anstieg. Zudem waren die erhöhten Transkriptmengen von *Ztpks1*, *5*, *9* und *10* zu diesem Zeitpunkt auffallend. In der späten Übergangsphase (14 dpi) konnte eine im Vergleich zu den vorherigen Zeitpunkten gesteigerte Transkriptmenge des *Ztpks2*-Gens beobachtet werden. In der nekrotrophen Lebensphase des Pilzes (28 dpi) wurde die Expression der Mehrzahl der *Ztpks*-Gene im Vergleich zu vorherigen Phasen wieder herunterreguliert, lediglich für *Ztpks1* konnte eine stark erhöhte Transkriptmenge in dieser Phase detektiert werden.

Zusammenfassend konnte durch die Genexpressions-Analyse ein erster Eindruck über die Expression der *Ztpks*-Gene im Infektionsverlauf gewonnen werden. Die auffälligsten Genexpressions-Muster der Analyse lieferten die *Ztpks*-Gene *1*, *2*, *4*, *5*, *9*, und *10*. Hier konnten innerhalb des 28 tägigen Zeitrahmens die größten Veränderungen der Transkriptmengen festgestellt werden.

Aus dieser Gruppe wurden die *Ztpks1*, *2*, *4* und *10* ausgewählt, deren Bedeutung für die Pathogenität von *Z. tritici* näher untersucht werden sollte (Abbildung 25).

Durch die Inaktivierung der ausgewählten *pks*-Gene sollte überprüft werden, wie sich das Fehlen der betroffenen PKSp auf die Pathogenität und das vegetative Wachstum von *Z. tritici* unter variierenden Kultivierungsbedingungen auswirken.

#### 4.3.1 *Ztpks1* ist essentiell für die dunkle Pigmentierung von Pyknidien

In Pilzen wurden bis heute vier unterschiedliche Formen des Pigments Melanin identifiziert, wobei in den meisten Pilzarten das Dihydroxynaphthalin (DHN)-Melanin vorkommt (Heinekamp *et al.*, 2012).

In *Z. tritici* konnte mit bioinformatischen Methoden die Sequenz einer *pks* identifiziert werden (*Ztpks1*), deren homologe Genprodukte in anderen Pilzen den ersten Schritt der DHN-Melaninbiosynthese katalysieren. Anhand von QTL-Analysen in dunkel pigmentierten *Z. tritici* Kolonien konnten Lendenmann *et al.* (2014) darlegen, dass das dunkelbraune Pigment in den Pyknidien wahrscheinlich DHN-Melanin ist und das durch *Ztpks1* kodierte Enzym wahrscheinlich das Schlüsselenzym der DHN-Melanin Biosynthese ist.

Mittels q-PCR konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Transkriptmenge von *Ztpks1* ab 10 dpi im Infektionsverlauf auf das 5-fache der Transkriptmenge zum Infektionsstart (1dpi) gesteigert war (Abbildung 24, Abbildung 25). Dieser Zeitpunkt repräsentiert den Anfang der Übergangsphase zur Nekrotrophie. Nach 14 dpi, in der fortgeschrittenen Übergangsphase, war die relative Transkriptmenge der *Ztpks1* immer noch um das 5-fache der Anfangsmenge erhöht und nahm in der nekrotrophen Phase der Infektion weiter zu. Zum Zeitpunkt 28 dpi betrug die relative Transkriptmenge von *Ztpks1* das 8,7-fache der Ausgangsmenge. Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass ZtPKS1p möglicherweise an molekularen Prozessen in der Übergangsphase und besonders in der nekrotrophen Phase der Infektion beteiligt ist.

Zur weiteren Untersuchung wurden *pks1 loss of function* Mutanten in *Z. tritici* erzeugt und auf phänotypische Unterschiede bezüglich des Wachstums, der Pigmentierung und der Pathogenität zum WT überprüft.

Durch die Inaktivierung von *Ztpks1* entstand eine Mutante mit einem Albino-Phänotyp. Nach vierwöchiger Inkubation des WTs und  $\Delta Ztpks1$  auf YEG + 1 % Magermilch sowie N-MM + 10 mM Aspartat, konnte beim WT-Stamm eine Schwarzfärbung der Kolonien beobachtet werden, wogegen die  $\Delta Ztpks1$ -Kolonien weiß blieben (Abbildung 26).

In vielen pathogenen Pilzen ist Melanin ein Pathogenitätsfaktor. Der Reisbranderreger *Magnaporthe oryzae* penetriert die Wirtspflanze beispielsweise mit Hilfe von Appressorien (Wilson und Talbot, 2009). Diese speziellen Strukturen ermöglichen unter anderem durch die Einlagerung von Melanin in deren Zellwände eine Erhöhung des Turgordrucks, wodurch die kutikuläre Barriere der Pflanzen mechanisch überwunden wird. Melanin trägt essentiell zur Pathogenität von *M. oryzae* bei, denn ohne seine Einlagerung ist die Funktionalität der Appressorien gestört (Jermy, 2012). *Z. tritici* dringt ausschließlich über die Stomata in seine Wirtspflanze ein und bildet keine derartigen Strukturen aus, weshalb die direkte Assoziation von Melanin mit der Pathogenität hier unwahrscheinlich erscheint (Lendenmann *et al.*, 2014). In *A. fumigatus* ist das DHN-Melanin ebenfalls ein Virulenzfaktor. *Loss of function* Mutanten des *pks1*-Homologs *pksP* waren verglichen mit dem WT deutlich anfälliger für ROS induzierten Stress und wurden effektiver durch Makrophagen getötet. Außerdem war die Virulenz der Mutanten in Maus-Infektionsstudien stark reduziert (Heinekamp *et al.*, 2012).

Mittels Pathogenitäts-Assays mit  $\Delta Ztpks1$  Mutanten konnte gezeigt werden, dass DHN-Melanin in *Z. tritici* kein Pathogenitätsfaktor ist (Abbildung 28.A). Mit  $\Delta Ztpks1$  infizierte Pflanzen wiesen deutliche Symptome der *Septoria* Blattdürre, wie chlorotische Läsionen und schnell eintretende Dürre von Blättern, auf. Pyknidien konnten dabei nur schwer entdeckt werden, da diese nicht die übliche schwarzbraune, sondern eine deutlich hellere Färbung hatten. Mikroskopische Aufnahmen infizierter Weizenblätter verdeutlichten die Unterschiede in der Pigmentierung der Pyknidien (Abbildung 28.B).

Pyknidien werden in *Z. tritici* in der nekrotrophen Phase der Infektion gebildet (Mehrabi und Kema, 2006). In dieser Phase konnte mit Hilfe der q-PCR die höchste Transkriptmenge von *Ztpks1* gemessen werden. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei dem dunkelbraunen Pigment, das in dieser Phase in die Pyknidien eingelagert wird, tatsächlich um DHN-Melanin handeln könnte. Dies würde sowohl das Ausbleiben der dunklen Pigmentierung der Pyknidien von  $\Delta Ztpks1$  erklären, als auch die Steigerung der Expression des besagten Gens in der nekrotrophen Infektionsphase im WT.

Im eng verwandten phytopathogenen Pilz *Ascochyta rabiei*, der ebenfalls zur Klasse der Dothideomyceten gehört, wurde von Akamatsu *et al.*, (2010) gezeigt, dass DHN-Melanin in die sexuellen und asexuellen Fruchtkörper inkorporiert wird und für die Dunkelfärbung dieser sorgt. In *A. rabiei* ist ebenfalls das PKS1p-Homolog (ArPKS1p) das Schlüsselenzym der DHN-Melanin Biosynthese und die Pyknidien der *Arpks1 loss of function* Mutanten waren nicht melanisiert.

Wie in *Z. tritici* hatte die Geninaktivierung jedoch keine Auswirkung auf die Pathogenität des Schädlings. Pyknidien melanin-defizienter *A. rabiei* Mutanten waren empfindlicher gegen UV-Licht, als Pyknidien des WTs, weshalb Akamatsu *et al.* (2010) vorschlugen, dass das Pigment eine Bedeutung für den Schutz der Sporen vor UV-Licht haben könnte.

Melanin ist für seine vielseitigen Schutzfunktionen, nicht nur vor UV-Licht sondern auch vor ROS, hydrolytischen Enzymen oder hohen Temperaturen, bekannt (Bell und Wheeler, 1986). Möglich wäre es, dass *Z. tritici* durch die Melanisierung, aufgrund der Schutzfunktion des Pigments, einen Vorteil bei der Infektion von Weizenpflanzen hat. Der Mechanismus der Melanisierung ist in *Z. tritici* bis heute wenig verstanden. Sehr wahrscheinlich unterliegt er einer komplexen Regulation, an der verschiedene Signaltransduktionskaskaden beteiligt sind (Mehrabi und Kema, 2006).

In der Übergangsphase von der symptomlosen zur nekrotrophen Phase war die Genexpression von *Ztpks1* ebenfalls gesteigert (Abbildung 24, Abbildung 25). In dieser Phase werden die pflanzlichen Abwehrmechanismen im Weizen hochreguliert. Möglicherweise ist die Melanisierung des pilzlichen Myzels in dieser Phase hilfreich, um von der Pflanze gebildete ROS und hydrolytische Enzyme abzuwehren. Jedoch ist die Melanisierung in dieser Phase für *Z. tritici* scheinbar nicht unabdingbar, da  $\Delta Ztpks1$  Mutanten im Vergleich zum WT in ihrer Virulenz gegenüber Weizen nicht eingeschränkt sind.

#### 4.3.2 Untersuchung der *Ztpks2 loss of function* Mutante

*In vivo* Genexpressionsanalysen ergaben eine maximale Transkriptmenge des *Ztpks2*-Gens an Tag 14 nach der Infektion. Dieser Zeitpunkt repräsentiert die fortgeschrittene Übergangsphase zur Nekrotrophie. Die Transkriptmenge war, im Vergleich zum Startpunkt der Infektion, auf das ca. 6-fache gesteigert. Zu den anderen drei untersuchten Zeitpunkten 4 dpi, 10 dpi und 28 dpi betrug die Transkriptmenge das Dreifache der Ausgangsmenge (Abbildung 24, Abbildung 25).

Die Bedeutung des durch das *Ztpks2*-Gen kodierten sekundären Stoffwechselproduktes für den Infektionsvorgang sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden. Dazu wurden *Ztpks2 loss of function* Mutanten in *Z. tritici* erzeugt und auf phänotypische Abweichungen bezüglich Wachstum und Pathogenität zum WT überprüft.

Die Funktion der ZtPKS2p aus *Z. tritici* ist bislang unbekannt, jedoch konnten Homologe aus anderen pathogenen Pilzen bereits charakterisiert werden. Zhang *et al.* (2003)

identifizierten im Rahmen von Clusteranalysen mit den Aminosäuresequenzen der PKSp aus dem phytopathogenen Ascomycet *Glarea lozoyensis* eine Homologie der PKS2p mit 34 weiteren PKS2-Proteinen aus anderen Pilzen. Die Aminosäuresequenz der PKS2p aus *G. lozoyensis* weist eine signifikante Homologie zur ZtPKS2p auf (E-value 0.0, Identities 36 %). Mit Hilfe einer Analyse der Aminosäuresequenzen mit der PFAM Datenbank konnte gezeigt werden, dass die konservierten Domänen der beiden PKS2p aus *Z. tritici* und *G. lozoyensis* nahezu gleich sind. Der einzige Unterschied ist, dass die PKS2p aus *Z. tritici* im Gegensatz zur PKS2p aus *G. lozoyensis* zusätzlich eine Methyltransferase-Domäne beinhaltet.

In einigen Pilzen konnte das Genprodukt von *pks2*, nämlich eine 6-Methylsalicylat Synthetase (6-MSAS), identifiziert werden. Auch in *G. lozoyensis* wurde wenige Jahre später bestätigt, dass das *pks2*-Gen eine 6-MSAS kodiert. Diese ist das Schlüsselenzym in der 6-Methylsalicylat (6-MSA) Synthese. 6-MSA hat phytotoxische Eigenschaften, inhibiert aber *in vitro* zudem auch das Wachstum diverser Bakterien und Pilze. Außerdem ist 6-MSA der Vorläufer in der Synthese des Mykotoxins Patulin (Lu *et al.*, 2005).

In *Z. tritici* konnte weder in Bezug auf die Pathogenität, noch bezüglich des Wachstums auf verschiedenen Voll- bzw. Mangelmedien ein Unterschied der  $\Delta Ztpks2$ -Mutante zum WT festgestellt werden. In der späten Übergangsphase der Infektion war die Transkriptmenge im WT *in vivo* auf die 6-fache Ausgangsmenge gesteigert, was dafür spricht, dass das Gen dennoch eine Bedeutung im Infektionsverlauf von *Z. tritici* zu haben scheint. Sekundärmetabolite, die von einem Organismus gebildet werden, können redundante Funktionen haben (Rudd *et al.*, 2015). So könnte die Funktion des von der ZtPKS2p synthetisierten Produktes in  $\Delta Ztpks2$  möglicherweise durch andere Sekundärmetabolite kompensiert werden.

Um die Funktion des *pks2*-Genproduktes genauer zu definieren, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Lu *et al.* (2005) gelang es, die 6-MSAS aus *G. lozoyensis* zu identifizieren, indem sie dem *G. lozoyensis pks2*-Gen den Promotor des *trpC*-Gens, einem Schlüsselenzym der Tryptophan-Biosynthese aus *A. nidulans*, vorschalteten. Dieser gilt als sehr starker Promotor, der sich für die Überexpression von heterologen Proteinen in Ascomyceten eignet (Lubertozzi und Keasling, 2006). Das rekombinante *pks2*-Gen wurde im Anschluss heterolog in *A. nidulans* exprimiert (Lu *et al.*, 2005). Analog könnte man z.B. in *Z. tritici* vorgehen, um die Funktion der ZtPKS2p näher zu untersuchen.

### 4.3.3 *Ztpks4* ist entbehrlich für die Pathogenität

Mittels q-PCR Analysen konnte in dieser Arbeit für das *pks4*-Gen aus *Z. tritici* in der symptomlosen Anfangsphase und der Übergangsphase zur Nekrotrophie erhöhte Transkriptmengen gemessen werden (Abbildung 24, Abbildung 25). Bereits in einem frühen Stadium der Infektion (4 dpi) war die relative Transkriptmenge des *Ztpks4*-Gens im Vergleich zum Startpunkt der Infektion (1 dpi) um das ca. 13-fache höher und steigerte sich nach 10 dpi weiter auf das 16-fache der Ausgangsmenge. In der späten Übergangsphase (14 dpi) war die relative Transkriptmenge im Vergleich zu vorher zwar reduziert, betrug dennoch das ca. 8-fache der Ausgangsmenge. In der nekrotrophen Phase der Infektion scheint das *Ztpks4*-Genprodukt aus *Z. tritici* keine signifikante Funktion zu besitzen, denn die relative Transkriptmenge war wieder in etwa auf den anfänglichen Wert bei 1 dpi reduziert.

Das orthologe *pks4*-Gen in *Trichoderma reesei* kodiert ein grünes Pigment, das für die Färbung der Konidien und nicht-melanisierter Strukturen der Fruchtkörper verantwortlich ist. Die Inaktivierung des *pks4*-Gens in *T. reesei* wirkte sich negativ auf die Stabilität der Konidienzellwand aus und hatte eine nachlassende Stressresistenz sowie ein eingeschränktes Abwehrverhalten gegenüber Antagonisten zur Folge. Zudem war die Mutante in der Bildung inhibitorischer Metabolite beeinträchtigt (Atanasova *et al.*, 2013). Für den filamentösen Ascomycet *Sordaria macrospora* ist das Ortholog der PKS4p essentiell für die sexuelle Entwicklung und die Regulation der Fruchtkörper-Morphologie (Schindler und Nowrousian, 2014).

Die vielfältigen Funktionen der PKS4p-Orthologen von *T. reesei* und *S. macrospora* und die erhöhte Expression des *pks4*-Gens während der symptomlosen Phase sowie der Übergangsphase zur Nekrotrophie stützen die Annahme, dass die PKS4p auch in *Z. tritici* am Infektionsvorgang beteiligt sein könnte.

Eine erste Überprüfung der Funktion der PKS4p in *Z. tritici* wurde in dieser Arbeit anhand von erzeugten *Ztpks4 loss of function* Mutanten vorgenommen. Auf unterschiedlichen Festmedien konnte eine reduzierte Ausprägung des Myzelwachstums im Vergleich zum WT beobachtet werden (Abbildung 27.A). Besonders bei Kultivierung auf den Medien PDA, N-MM und MM + WE war der phänotypische Unterschied deutlich erkennbar. Auf BAF-Agarplatten war bei  $\Delta Ztpks4$  ebenfalls ein reduziertes Myzelwachstum zu beobachten, jedoch war der Unterschied zum WT weniger ausgeprägt als auf den anderen drei Medien. Das eingeschränkte vegetative Wachstum von  $\Delta Ztpks4$  könnte

auf Intermediate oder alternative Produkte des Primär- oder Sekundärmetabolismus zurückzuführen sein, die aufgrund des Fehlens der ZtPKS4p nicht weitermetabolisiert werden und inhibierend oder toxisch wirken könnten.

Der Keimungs-Assay mit Sporen von  $\Delta Ztpks4$  ergab eine im Vergleich zum WT um 45 % verminderte Auskeimung von  $\Delta Ztpks4$ -Pyknidiosporen (Abbildung 27.B). Es keimten 87 % der WT-Sporen aus, jedoch nur 43 % der Sporen von  $\Delta Ztpks4$ . Auch dies könnte mit einem inhibierenden oder toxischen Intermediat aus dem Primär- bzw. Sekundärmetabolismus zusammenhängen, der aufgrund der Inaktivierung von *Ztpks4* akkumuliert.

Bezüglich der Pathogenität konnte gezeigt werden, dass das *pk4*-Gen nicht essentiell ist. Verglichen mit der Pathogenität des WT-Stammes waren bei Weizenpflanzen, die mit  $\Delta Ztpks4$  infiziert wurden, keine Unterschiede feststellbar. Die verminderte Keimungsrate scheint sich in *Z. tritici* nicht negativ auf die Virulenz auszuwirken.

In der symptomlosen Phase und im Übergang zur Nekrotrophie war eine gesteigerte Expression von *Ztpks4* *in vivo* im Infektionsverlauf zu beobachten. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass das korrespondierende Genprodukt eventuell in einer noch ungeklärten Weise eine Funktion im Infektionsverlauf haben könnte. Obwohl die Keimungsrate im Vergleich zum WT vermindert ist, scheint die Funktion der *pk4* für die Pathogenität von *Z. tritici* nicht essentiell zu sein. In wieweit das durch *Ztpks4* kodierte sekundäre Stoffwechselprodukt Anteil am Ablauf der Infektion hat, bedarf weiterer eingehender Untersuchungen.

#### 4.3.4 Untersuchung der *Ztpks10 loss of function* Mutante

Der Genexpressions-Assay dokumentierte die höchste Expression des *Ztpks10*-Gens *in planta* in der frühen Übergangsphase vom symptomlosen Wachstum zur nekrotrophen Lebensweise (10 dpi) (Abbildung 24, Abbildung 25). Zu diesem Zeitpunkt entsprach die Transkriptmenge des Gens ca. dem 10-fachen der Ausgangsmenge. Nach 14 dpi sowie 28 dpi war die Transkriptmenge wieder reduziert und entsprach dem Wert nach 1 dpi.

Die Funktion der PKS10p aus *Z. tritici* ist bislang unbekannt, jedoch konnte mittels blastp-Suche des NCBI eine Homologie zu Lovastatin Nonaketid Synthetasen aus den Pilzen *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. orbiculare*, *Talaromyces marneffe* und *Glarea lozoyensis* (alle mit einem E-value 0.0) identifiziert werden.

Lovastatin Nonaketid Synthetasen gehören zum Lovastatin Biosynthese Cluster und katalysieren die Diels-Alder Reaktion bei der Ringschließung des Lovastatinmoleküls (Auclair *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2009; Subazini und Kumar, 2011).

In der Humanmedizin werden diese pilzlichen Sekundärmetabolite seit vielen Jahren zur Senkung des Blut-Cholesterinspiegels eingesetzt, jedoch ist deren Funktion für den Produzenten bis heute nicht vollständig geklärt. Eine wachstumshemmende Wirkung von Statinen auf Hefen und einige filamentöse Pilze konnte gezeigt werden. Dies führte zu der Vermutung, dass ihre Funktion in der Verteidigung vor anderen Mikroorganismen und zum Schutz der ökologischen Nische liegen könnte (Macreadie *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2010).

Bislang wurde die Produktion von Lovastatin oder ähnlichen Sekundärmetaboliten durch *Z. tritici* nicht bestätigt. Die Homologie des *pks10*-Gens zu Lovastatin Nonaketid Synthetasen aus anderen Organismen erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass *Ztpks10* ebenfalls an der Synthese eines Statins oder einer dazu verwandten Substanz beteiligt sein könnte. Ein entsprechender Sekundärmetabolit konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Für die Pathogenität von *Z. tritici* gegen Weizen ist der durch die PKS10p synthetisierte Metabolit nicht essentiell. In Bezug auf die Pathogenität konnte kein Unterschied der  $\Delta Ztpks10$ -Mutante zum WT festgestellt werden. Möglicherweise bietet die Synthese des besagten sekundären Stoffes Vorteile bei der Kolonisierung des Wirtes durch die Verteidigung des Habitats vor konkurrierenden Mikroorganismen.

Um die Funktion des *pks10*-Genproduktes genauer zu definieren, müssten analog zu *Ztpks2* weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Auch hier wäre die Fusion von *Ztpks10* mit einem starken Promotor, wie z.B. dem *trpC*-Promotor aus *A. nidulans*, und die anschließende heterologe Expression des Polyketids eine Möglichkeit, um das Produkt des *Ztpks10*-Gens zu identifizieren. Eine denkbare Schwierigkeit hierbei könnte sein, dass die anderen im Cluster kodierten Enzyme für die vollständige Synthese des Metaboliten bei dieser Vorgehensweise fehlen. Im Lovastatin Biosynthese Cluster von *A. terreus* z.B. sind insgesamt 18 Proteine kodiert. Neben der Lovastatin Nonaketid Synthetase ist im besagten Cluster eine zweite Megasyntase (eine Lovastatin Diketid Synthetase) und zudem weitere regulatorische Proteine und modifizierende Enzyme kodiert (Subazini und Kumar, 2011). Eine *in silico* Clusteranalyse könnte weitere Hinweise über den Umfang des *pks10*-Clusters von *Z. tritici* liefern.

## 5. Ausblick

Mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit konnten Einblicke in die molekularen Mechanismen der Interaktion zwischen *Zyoseptoria tritici* und *Triticum aestivum* gewonnen werden. Die erzielten Ergebnisse können in Zukunft als solide Grundlage für eine weiterführende Untersuchung der Pathogen-Wirt Interaktion im Modellorganismus *Z. tritici* genutzt werden.

Die Detoxifizierung der in Weizen natürlich vorkommenden Phenolsäuren Zimtsäure und Benzoessäure konnte in *Z. tritici* durch die Umwandlung in p-Hydroxybenzoessäure (p-HBS) erfolgreich gezeigt werden. In nachfolgenden Arbeiten empfiehlt es sich, diese Umwandlungsreaktionen *in planta* nachzuweisen, um die Relevanz dieser Entgiftungsreaktion im Infektionsverlauf zu bestätigen. Zudem wäre die weiterführende Untersuchung der Zimtsäure-Metabolisierung in *Z. tritici* sehr empfehlenswert, da bis heute keine Enzyme aus Pilzen bekannt sind, die eine Umwandlung von Zimtsäure zu p-Coumarinsäure katalysieren können. Bislang wurde diese metabolische Reaktion nur in Pflanzen beobachtet, sodass die Identifizierung des verantwortlichen Enzyms aus *Z. tritici* wichtige neue Erkenntnisse bringen könnte.

Die im Zuge der submersen Fermentation von *Z. tritici* entstandene p-HBS akkumulierte im Kulturmedium und wurde durch den Pilz nicht weiter metabolisiert. Phytotoxizitätstests gegen Weizenblätter ergaben eine moderate phytotoxische Aktivität von p-HBS ab einer applizierten Menge von 25 µg (Abbildung 16). Mit Hilfe einer Quantifizierung der p-HBS in infizierten Weizenblättern könnte herausgefunden werden, ob die durch *Z. tritici* produzierte Substanz im pflanzlichen Apoplasten in signifikanten Mengen akkumuliert und dort möglicherweise zum pflanzlichen Zelltod beitragen könnte.

Die weitere Untersuchung des Sekundärmetabolismus von *Z. tritici* ist von großer Bedeutung um die molekularen Mechanismen der Infektion weiter aufzuklären. Mit den in dieser Arbeit angewandten Methoden ist eine Aktivierung der Expression von Sekundärmetaboliten-Genclustern nicht gelungen. Mit Hilfe von bioinformatischen Analysen konnten im Rahmen dieser Arbeit drei Cluster identifiziert werden (Tabelle 6), die möglicherweise einen eigenen Transkriptionsregulator beinhalten. Zukünftig könnte man z.B. diese clustereigenen Regulatoren überexprimieren, um die Genexpression des Clusters zu aktivieren. Hierbei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es

sich bei den Transkriptionsregulatoren auch um negative Regulatoren handeln kann, durch deren Überexpression keine Induktion der Genexpression erzielt wird.

Zudem wurde in dieser Arbeit der Fokus auf PKS gelegt und die zweite wichtige Sekundärmetaboliten-Klasse der NRPS nicht untersucht. Dies wäre in zukünftigen Arbeiten sinnvoll, um Phytotoxine, die zu dieser chemischen Gruppe gehören identifizieren zu können.

In Fermentationsversuchen mit der *loss of function* Mutante  $\Delta ZtareA$  wurde neben der p-HBS eine zweite, unbekannt phytotoxische Substanz mit einer Molekularmasse von 426 Da identifiziert (Abbildung 12.A). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die chemische Struktur dieser Substanz nicht erfolgreich aufgeklärt werden. Sinnvoll wäre eventuell eine Optimierung der Fermentationsparameter, die eine Steigerung der produzierten Menge der unbekannt Substanz zur Folge haben könnte. Dadurch könnte der langwierige Fermentationsprozess abgekürzt, die schlechte Ausbeute an produzierter Substanz gesteigert und die Strukturaufklärung beschleunigt werden.

## 6. Zusammenfassung

Der pflanzenpathogene Pilz *Zymoseptoria tritici* entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten weltweit zu einem der ökonomisch bedeutendsten Schädlinge bei der Kultivierung von Weizenpflanzen (Dean *et al.*, 2012; Fones und Gurr, 2015). Die Bekämpfung des Schädlinge ist aufgrund seiner stetigen Resistenzentwicklung gegen alle gegen ihn eingesetzten Fungizide zunehmend problematisch. Einige Forschungsvorhaben setzten sich deshalb die Aufklärung der molekularen und physiologischen Infektionsmechanismen von *Z. tritici* zum Ziel, denn dadurch wäre die Entwicklung von nachhaltigeren Fungiziden mit besserer Spezifität und größerer Effizienz möglich (Bebber *et al.*, 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnten neue Erkenntnisse der Pflanzen-Pathogen Interaktion zwischen *Zymoseptoria tritici* und *Triticum aestivum* gewonnen werden. Mit dem Ziel, den Sekundärmetabolismus von *Z. tritici* zu untersuchen und neue phytotoxische Metabolite zu identifizieren, welchen eine wichtige Bedeutung im Infektionsprozess zukommt, wurde eine *ZtareA loss of function* Mutante generiert. Der GATA-Transkriptionsfaktor AreAp fungiert in Ascomyceten als globaler Regulator des Sekundärmetabolismus sowie als Mediator der Stickstoff-Metaboliten Repression und bildet somit eine Schnittstelle zwischen Primär- und Sekundärmetabolismus. Zudem reguliert der Transkriptionsfaktor in vielen Ascomyceten die Expression pathogenitätsrelevanter Gene. Die Inaktivierung von *ZtareA* hatte in *Z. tritici* einen apathogenen Phänotyp zur Folge, der vermutlich aufgrund einer im Vergleich zum WT um ca. 75 % reduzierten Keimungsrate der Pyknidiosporen zustande kommt.

Außerdem konnte aus dem Kulturfiltrat der submersen Fermentation von  $\Delta ZtareA$  in Minimalmedium (MM) mit 10 % Weizenblattextrakt (WE) die phytotoxische Phenolsäure p-Hydroxybenzoesäure (p-HBS) isoliert werden.

Erstmals konnte die Fähigkeit von *Z. tritici* gezeigt werden, pflanzliche Phenolsäuren aus *T. aestivum* zu detoxifizieren. Sowohl  $\Delta ZtareA$  als auch der WT-Stamm IPO323 waren in der Lage die antifungischen Pflanzenabwehrstoffe Zimtsäure und Benzoesäure extrazellulär in p-HBS zu metabolisieren. Die Umwandlung der Benzoesäure zu p-HBS wird wahrscheinlich durch die Cytochrom P450 Monooxygenase ZtCYP53p katalysiert. Die Metabolisierung der Zimtsäure zu p-HBS erfolgte über Benzoesäure als Zwischenprodukt. Die an dieser Reaktion beteiligten Enzyme konnten nicht identifiziert werden.

Die Fragestellung weshalb im Kulturfiltrat aus der Fermentation des WT-Stammes in MM + WE keine p-HBS vorhanden war, konnte nicht abschließend beantwortet werden.

Die Bedeutung des Sekundärmetabolismus von *Z. tritici* für den Infektionsprozess wurde des Weiteren durch das Erstellen eines Genexpressionsprofils der zehn aus *Z. tritici* bekannten Polyketidsynthase (*pks*)-Gene im Infektionsverlauf untersucht. Vier *pks*-Gene (*Ztpks1*, *Ztpks2*, *Ztpks4* und *Ztpks10*) mit signifikant gesteigerter Transkriptmenge in einer der Infektionsphasen wurden ausgewählt und im Anschluss inaktiviert.

Die Vermutungen von Lendenmann *et al.* (2014), dass ZtPKS1p das Schlüsselenzym in der Synthese des schwarzbraunen Pigmentes ist, bei dem es sich wahrscheinlich um Dihydroxynaphthalin (DHN)-Melanin handelt, konnten im Zuge dieser Arbeit bestätigt werden. Die Pyknidien von  $\Delta Ztpks1$  waren im Vergleich zum WT nicht melanisiert und auch *in vitro*-Versuche bestätigten, dass bei Kolonien von  $\Delta Ztpks1$  im Vergleich zum WT die schwarze Pigmentierung ausblieb. Die Virulenz von  $\Delta Ztpks1$  war nicht beeinträchtigt, sodass gezeigt werden konnte, dass Melanin im Vergleich zu vielen anderen Phytopathogenen, in *Z. tritici* kein Pathogenitätsfaktor zu sein scheint.

Des Weiteren konnte bei  $\Delta Ztpks4$  ein vermindertes vegetatives Wachstum sowie eine im Vergleich zum WT um ca. 50 % reduzierte Keimungsrate beobachtet werden, welche sich jedoch nicht auf die Virulenz der *loss of function* Mutante auswirkte. Bei den beiden weiteren generierten Mutanten  $\Delta Ztpks2$  und  $\Delta Ztpks10$  konnten keine Unterschiede zum WT beobachtet werden, sodass deren Bedeutung im Infektionsverlauf weiterhin unklar bleibt.

---

**Literaturverzeichnis**

- Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N. S., & Agrawal, V. P. (2001). Signalling molecules and blast pathogen attack activates rice OsPR1a and OsPR1b genes: A model illustrating components participating during defence/stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(12), 1095–1103.
- Ahrabi, F., Enteshari, S., & Moradshahi, A. (2011). Allelopathic potential of para-hydroxybenzoic acid and coumarin on canola: Talaieh cultivar. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(20), 5104-5109.
- Akamatsu, H. O., Chilvers, M. I., Stewart, J. E., & Peever, T. L. (2010). Identification and function of a polyketide synthase gene responsible for 1,8-dihydroxynaphthalene-melanin pigment biosynthesis in *Ascochyta rabiei*. *Current Genetics*, 56(4), 349–360.
- Andrianopoulos, A., Kourambas, S., Sharp, J. A., Davis, M. A., & Hynes, M. J. (1998). Characterization of the *Aspergillus nidulans* nmrA gene involved in nitrogen metabolite repression. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1973–1977.
- Arst, H.N. Jr., & Cove, D. J. (1973). Nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Genetics and Genomics*, 126, 111–141.
- Asai, S., & Shirasu, K. (2015). Plant cells under siege: Plant immune system versus pathogen effectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 28, 1–8.
- Atanasova, L., Knox, B. P., Kubicek, C. P., Druzhinina, I. S., & Baker, S. E. (2013). The polyketide synthase gene pks4 of *Trichoderma reesei* provides pigmentation and stress resistance. *Eukaryotic Cell*, 12(11), 1499–1508.
- Auclair, K., Sutherland, A., Kennedy, J., Witter, D. J., Heever, J. P. Van Den, Hutchinson, C. R., & Vederas, J. C. (2000). Lovastatin Nonaketide Synthase Catalyzes an Intramolecular Diels-Alder Reaction of a Substrate Analogue. *Journal of American Chemical Society*, 122, 11519-11520.
- Ballaré, C. L. (2011). Jasmonate-induced defenses: A tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends in Plant Science*, 16(5), 249–257.
- Bannister, A. J., & Kouzarides, T. (2005). Reversing histone methylation. *Nature*, 436(7054), 1103–1106.
- Bebber, D. P., & Gurr, S. J. (2015). Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62–64.

- Bell, A. A., & Wheeler, M. H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Review of Phytopathology*, 24, 411–451.
- Ben M'Barek, S., Cordewener, J., Tabib Ghaffary, S., van der Lee, T., Liu, Z., Mirzadi Gohari, A., Kema, G. (2015). FPLC and liquid-chromatography mass spectrometry identify candidate necrosis-inducing proteins from culture filtrates of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 54–62.
- Benincasa, P., Galieni, A., Manetta, A. C., Pace, R., Guiducci, M., Pisante, M., & Stagnari, F. (2015). Phenolic compounds in grains, sprouts and wheatgrass of hulled and non-hulled wheat species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 1795–1803.
- Bergh, K. T., & Brakhage, A. A. (1998). Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *acvA* (*pcbAB*) by amino acids: Implication for involvement of transcription factor PacC. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 843–849.
- Bergmann, S., Schümann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. & Hertweck, C. (2007). Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature Chemical Biology*, 3(4), 213–217.
- Berne, S., Kovačič, L., Sova, M., Kraševc, N., Gobec, S., Križaj, I., & Komel, R. (2015). Benzoic acid derivatives with improved antifungal activity: Design, synthesis, structure-activity relationship (SAR) and CYP53 docking studies. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(15), 4264–4276.
- Blum, U. (1996). Allelopathic interactions involving phenolic acids. *Journal of Nematology*, 28(3), 259–67.
- Brakhage, A. (2013). Regulation of fungal secondary metabolism. *Nature Reviews. Microbiology*, 11(1), 21–32.
- Brakhage, A. & Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genetics and Biology*, 48(1), 15–22.
- Brosch, G., Loidl, P., & Graessle, S. (2008). Histone modifications and chromatin dynamics: A focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), 409–439.
- Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183–205.

- Butler, M. J., & Day, A.W. (1998). Fungal melanins: A Review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1115–1136.
- Cabral, M. E., Delgado, O., Sampietro, S. A., Catalán, L. I., Figueroa, C., & Farina, J. I. (2010). Antifungal Activity and the Potential Correlation with Statin-Producing Ability: An Optimized Screening Applied to Filamentous Fungi from Las Yungas Subtropical Rainforest. *Research Journal of Microbiology*, 5(9), 833–848.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447–459.
- Cane, D. E., & Walsh, C. T. (1999). The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry and Biology*, 6(12), 319–325.
- Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G., & Lattanzio, V. (2015). Carbon fluxes between primary metabolism and phenolic pathway in plant tissues under stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26378–26394.
- Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Nayak, T., Davidson, A. D., Sanchez, J. F., Lo, H. C., Ho, W-Y, Hagop, S., Kuo, E., Praseuth, A., Watanabe, K., Oakley, B. R., & Wang, C. C. C. (2008). Molecular Genetic Mining of the *Aspergillus* Secondary Metabolome: Discovery of the Emericellamide Biosynthetic Pathway. *Chemistry and Biology*, 15(6), 527–532.
- Cohen, L., & Eyal, Z. (1993). The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. *Plant Pathology*, 42, 737-743.
- Coleman, M., Henricot, B., Arnau, J., & Oliver, R. P. (1997). Starvation-induced genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* are also induced during growth *in planta*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(9), 1106–1109.
- Conrath, U. (2006). Systemic acquired resistance. *The Plant Cell*, 4(8), 179–184.
- Cotty, P. J. (1988). Aflatoxine and Sclerotial Production by *Aspergillus flavus*: Influence of pH. *Physiology and Biochemistry*, 78(9), 1250-1253.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., López Rivas, C., Requena T., Rodríguez, J. M., & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372–382.

- Dean, R., 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., & Birren, B. W. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, *434*(7036), 980–986.
- Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickmann, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology, *13*, 414–430.
- De Wit, P. J. G. M., Mehrabi, R., Van Den Burg, H. A., & Stergiopoulos, I. (2009). Fungal effector proteins: Past, present and future: Review. *Molecular Plant Pathology*, *10*(6), 735–747.
- Desmond, O. J., Edgar, C. I., Manners, J. M., Maclean, D. J., Schenk, P. M., & Kazan, K. (2006). Methyl jasmonate induced gene expression in wheat delays symptom development by the crown rot pathogen *Fusarium pseudograminearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *67*(3–5), 171–179.
- Dodge, A. G., & Wackett, L. P. (2005). Metabolism of bismuth subsalicylate and intracellular accumulation of bismuth by *Fusarium* sp. strain BI. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(2), 876–882.
- Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, *16*(13), 6127–6145.
- Du, L., King, J. B., & Cichewicz, R. H. (2014). Chlorinated polyketide obtained from a *Daldinia* sp. treated with the epigenetic modifier suberoylanilide hydroxamic acid. *Journal of Natural Products*, *77*(11), 2454–2458.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P., & Raskin, I. (1992). Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. *Cell*, *70*(6), 879–886.
- Espeso, E. A., & Peñalva, M. A. (1996). Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(46), 28825–28830.
- Eyal, Z., & Levy, E. (1987). Variations in pathogenicity patterns of *Mycosphaerella graminicola* within *Triticum* spp. in Israel. *Euphytica*, *36*, 237–250.

- Eyal, Z., Schare, A.L., Prescott, J. M., & van Ginkel, M. (1987). The *Septoria* Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, DF: CIMMYT.
- FAO (2015). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org> (Stand 2015)
- Fischbach, M. A., & Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(8), 3468–3496.
- Floerl, S., Majcherczyk, A., Possienke, M., Feussner, K., Tappe, H., Gatz, C., Feussner, I., Kües, U., & Polle, A. (2012). *Verticillium longisporum* infection affects the leaf apoplastic proteome, metabolome, and cell wall properties in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE*, 7(2), 1-14.
- Fones, H., & Gurr, S. (2015). The impact of *Septoria tritici* Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 3–7.
- French, C. J., Vance, C. P., & Neil Towers, G. H. (1976). Conversion of p-coumaric acid to p-hydroxybenzoic acid by cell free extracts of potato tubers and *Polyporus hispidus*. *Phytochemistry*, 15(4), 564–566.
- Fu, Y. H., & Marzluf, G. (1987). Characterization of nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 7(5), 1691–1696.
- Fu, Y. H., & Marzluf, G. (1990). Nit-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(3), 5331–5335.
- Gauthier, L., Bonnin-Verdal, M. N., Marchegay, G., Pinson-Gadais, L., Ducos, C., Richard-Forget, F., & Atanasova-Penichon, V. (2016). Fungal biotransformation of chlorogenic and caffeic acids by *Fusarium graminearum*: New insights in the contribution of phenolic acids to resistance to deoxynivalenol accumulation in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 221(856), 61–68.
- Gerke, J., Bayram, Ö., Feussner, K., Landesfeind, M., Shelest, E., Feussner, I., & Braus, G. H. (2012). Breaking the silence: Protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(23), 8234–8244.

- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R., Venter, J. C., Iii, C. A. H., Smith, H. O., & America, N. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 12–16.
- González-Fernández, R., Prats, E., & Vorrín-Novo, J.V. (2010). Proteomics of Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-36.
- Goodwin, S. B., Ben M'Barek, S., Dhillon, B., Wittenberg, A. H. J., Crane, C. F., Hane, J. K., Foster, A. J., Van der Lee, T. A. J., Grimwood, J., Aerts, A., Antoniw, J., Bailey, A., Bluhm, B., Bowler, J., Bristow, J., van der Burgt, A., Canto-Canché, B., Churchill, A. C. L., Conde-Ferràez, L., Cools, H. J., Coutinho, P. M., Csukai, M., Dehal, P., de Wit, P., Donzelli, B., van de Geest, H. C., van Ham, R. C. H., Hammond-Kosack, K. E., Henrissat, B., Kilian, A., Kobayashi, A. K., Koopmann, E., Kourmpetis, Y., Kuzniar, A., Lindquist, E., Lombard, V., Maliepaard, C., Martins, N., Mehrabi, R., Nap, J. P. H., Ponomarenko, A., Rudd, J. J., Salamov, A., Schmutz, J., Schouten, H. J., Shapiro, H., Stergiopoulos, I., Torriani, S. F. F., Tu, H., de Vries, R. P., Waalwijk, C., Ware, S. B., Wiebenga, A., Zwiers, L. H., Oliver, R. P., Grigoriev, I. V., & Kema, G. H. J. (2011). Finished genome of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genetics*, 7(6), 1-12.
- Graminha, M. A. S., Rocha, E. M. F., Prade, R. A., & Martinez-Rossi, N. M. (2004). Terbinafine resistance mediated by salicylate 1-monooxygenase in *Aspergillus nidulans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3530–3535.
- Güldener, U., Seong, K. Y., Boddu, J., Cho, S., Trail, F., Xu, J. R., Adam, G., Mewes, H. W., Muehlbauer, G. J., & Kistler, H. C. (2006). Development of a *Fusarium graminearum* Affymetrix GeneChip for profiling fungal gene expression *in vitro* and *in planta*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(5), 316–325.
- Harris, L. J., Balcerzak, M., Johnston, A., Schneiderman, D., & Ouellet, T. (2016). Host-preferential *Fusarium graminearum* gene expression during infection of wheat, barley, and maize. *Fungal Biology*, 120(1), 111–123.
- Harwood, C. S., & Parales, R. E. (1996). The  $\beta$ -Ketoacid Pathway and the Biology of Self-Identity. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 553–590.
- Heinekamp, T., Thywißen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V., & Brakhage, A. A. (2012). *Aspergillus fumigatus* melanins: Interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Frontiers in Microbiology*, 3(1), 1–7.

- Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Joyner, P. M., & Cichewicz, R. H. (2009). A chemical epigenetics approach for engineering the in situ biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 7(3), 435–438.
- Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(26), 4688–4716.
- Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, 24, 393-416.
- Hur, G. H., Vickery, C.R., & Burkart, M.D. (2012). Explorations of Catalytic Domains in Non-Ribosomal Peptide Synthetase Enzymology. *Natural Product Reports*, 29(10), 1074-1098.
- Iwasaki, Y., Gunji, H., Kino, K., Hattori, T., Ishii, Y., & Kirimura, K. (2010). Novel metabolic pathway for salicylate biodegradation via phenol in yeast *Trichosporon moniliiforme*. *Biodegradation*, 21(4), 557–564.
- Jalal, M. A. F., Hossain, M. B., Robeson, D. J., & Van der Helm, D. (1992). *Cercospora beticola* phytotoxins: cebetins that are photoactive, magnesium ion-binding, chlorinated anthraquinone-xanthone conjugates. *Journal of the American Chemical Society*, 114(15), 5967–5971.
- Janus, D., Hortschansky, P., & Kück, U. (2008). Identification of a minimal cre1 promoter sequence promoting glucose-dependent gene expression in the  $\beta$ -lactam producer *Acremonium chrysogenum*. *Current Genetics*, 53(1), 35–48.
- Jarvis, A.P., Schaaf, O., & Oldham, N.J. (2000). 3-Hydroxy-3-phenylpropanoic acid is an intermediate in the biosynthesis of benzoic acid and salicylic acid but benzaldehyde is not. *Planta*, 212, 119-126.
- Jones, D. G., & Cooke, B. M. (1969). The Epidemiology of *Septoria tritici* and *S. nodorum*- I. A tentative key for assessing *Septoria tritici* infection on wheat heads. *Transactions of the British Mycological Society*, 53(1), 39–46.
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329.
- Kanehisa, M., & Goto, S. (1999). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(1), 29–34.

- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(DI), D457–D462.
- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J.W. (2005). Fungal Secondary Metabolism- From Biochemistry to Genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 937-947.
- Kema, G. H. J., Lee, T. A. J., Van Der, Mendes, O., Verstappen, E. C. P., Lankhorst, R. K., Sandbrink, H., van der Burgt, A., Zwiers, L. H., Csukai, M., & Waalwijk, C. (2008). Large-Scale Gene Discovery in the *Septoria tritici* Blotch Fungus *Mycosphaerella graminicola* with a Focus on *In Planta* Expression. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 21(9), 1249–1260.
- Kema, G. H. J., Yu, D., Rijkenberg, F. H. J., Shaw, M. W., & Baayen, R. P. (1996). Histology of pathogenesis of *Mycosphaerella graminicola* in wheat. *Phytopathology*, 86, 777-786.
- Keon, J., Antoniow, J., Carzaniga, R., Deller, S., Ward, J. L., Baker, J. M., Beale, M. H., Hammond-Kosack, K., & Rudd, J. J. (2007). Transcriptional adaptation of *Mycosphaerella graminicola* to programmed cell death (PCD) of its susceptible wheat host. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(2), 178–193.
- Kettles, G. J., & Kanyuka, K. (2016). Dissecting the Molecular Interactions between Wheat and the Fungal Pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Frontiers in Plant Science*, 7(508), 1-7.
- Kim, K. H., Tsao, R., Yang, R., & Cui, S. W. (2006). Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. *Food Chemistry*, 95(3), 466–473.
- Kleinkauf, H., & von Döhren, H. (1990). Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *European Journal of Biochemistry*, 192, 1-15.
- Koocheki, A., Lalegani, B., & Hosseini, S. A. (2013). Ecological Consequences of Allelopathy. *Allelopathy* (S. 23–38). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Korošec, B., Sova, M., Turk, S., Kraševc, N., Novak, M., Lah, L., & Komel, R. (2014). Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). *Journal of Applied Microbiology*, 116(4), 955–966.

- Kramer, B., Thines, E., & Foster, A. J. (2009). MAP kinase signalling pathway components and targets conserved between the distantly related plant pathogenic fungi *Mycosphaerella graminicola* and *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9), 667–681.
- Kudla, B., Caddick, M. X., Langdon, T., Martinez-Rossi, N. M., Bennett, C. F., Sibley, S., Davies, R. W., & Arst, H. N. (1990). The regulatory gene *areA* mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Mutations affecting specificity of gene activation alter a loop residue of a putative zinc finger. *The EMBO Journal*, 9(5), 1355–1364.
- Kuyama, S., & Tamura, T. (1957). Cercosporin. A Pigment of *Cercosporina kikuchii* Matsumoto et Tomoyasu. II. Physical and Chemical Properties of Cercosporin and its Derivatives. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 5726–5729.
- Laluk, K., & Mengiste, T. (2010). Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or covert extortion? *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8, 1-34.
- Lazo, G. R., Stein, P. A., & Ludwig, R. A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology*, 9, 963-967.
- Lee, I. R., Chow, E. W. L., Morrow, C. A., Djordjevic, J. T., & Fraser, J. (2011). Nitrogen metabolite repression of metabolism and virulence in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Genetics*, 188(2), 309–23.
- Lee, W., Rudd, J., Hammond-Kosack, K., & Kanyuka, K. (2014). *Mycosphaerella graminicola* LysM effector-mediated stealth pathogenesis subverts recognition through both CERK1 and CEBiP homologues in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 27(3), 236-243.
- Lendenmann, M. H., Croll, D., Stewart, E. L., & McDonald, B. A. (2014). Quantitative trait locus mapping of melanization in the plant pathogenic fungus *Zymoseptoria tritici*. *G3*, 4(12), 2519–33.
- Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. De, & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933–8952.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> Method. *Methods*, 25, 402–408.

- López-Berges, M. S., Risipail, N., Prados-Rosales, R. C., & Di Pietro, A. (2010). A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, 22(7), 2459–2475.
- Lu, P., Zhang, A., Dennis, L. M., Dahl-Roshak, A. M., Xia, Y. Q., Arison, B., & Tkacz, J. S. (2005). A gene (*pks2*) encoding a putative 6-methylsalicylic acid synthase from *Glarea lozoyensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 273(2), 207–216.
- Lubertozzi, D., & Keasling, J. D. (2006). Marker and promoter effects on heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(5), 1014–1023.
- Lysøe, E., Seong, K.-Y., & Kistler, H. C. (2011). The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(9), 995–1000.
- Ma, M. S., Li, J. W.-H., Choi, J. W., Zhou, H., Lee, M. K. K., Moorthie, V. A., & Tang, Y. (2009). Complete Reconstitution of a Highly-Reducing Iterative Polyketide Synthase. *Science*, 326(5952), 589–592.
- Macreadie, I. G., Johnson, G., Schlosser, T., & Macreadie, P. I. (2006). Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. *FEMS Microbiology Letters*, 262(1), 9–13.
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E., Thomma, B. P., & Rudd, J. J. (2011). Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant Physiology*, 156(2), 756–769.
- Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 17–32.
- Marzluf, G. A. (1993). Regulation of Sulfur and Nitrogen Metabolism in Filamentous Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 41, 31–55.
- Meganathan, R. (2001). Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 203(2), 131–139.
- Mehrabi, R., & Kema, G. H. J. (2006). Protein kinase a subunits of the ascomycete pathogen *Mycosphaerella graminicola* regulate asexual fructification, filamentation, melanization and osmosensing. *Molecular Plant Pathology*, 7(6), 565–577.

- Mehrabi, R., Zwiers, L.-H., de Waard, M., & Kema, G. H. J. (2006). MgHog1 regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19*(11), 1262–1269.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, T. W. D., & Tudzynski, B. (2003). *AREA* directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Molecular Microbiology*, *47*(4), 975–991.
- Milat, M. L., Prange, T., Ducrot, P. H., Tabet, J. C., Einhorn, J., Blein, J. P., & Lallemand, J. Y. (1992). Structures of the beticolins, the yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. *Journal of the American Chemical Society*, *114*(4), 1478–1479.
- Minehart, P. L., & Magasanik, B. (1991). Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Molecular and Cellular Biology*, *11*(12), 6216–6228.
- Möbius, N., & Hertweck, C. (2009). Fungal phytotoxins as mediators of virulence. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(4), 390–398.
- Morel, J. B., & Dangl, J. L. (1997). The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell Death and Differentiation*, *4*(8), 671–83.
- Morozov, I. Y., Galbis-Martinez, M., Jones, M. G., & Caddick, M. X. (2001). Characterization of nitrogen metabolite signalling in *Aspergillus* via the regulated degradation of *areA* mRNA. *Molecular Microbiology*, *42*(1), 269–77.
- Morzfeld, J., Koopmann, B., & Hope H.-H. (2004). Development of fungicide resistance of wheat and barley pathogens against strobilurins: A methodological approach. *Journal of Plant Diseases and Protection* *111*(2), 105–114.
- Mur, L. A. J., Naylor, G., Warner, S. A. J., Sugars, J. M., White, R. F., & Draper, J. (1996). Salicylic Acid potentiates defence gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *The Plant Journal*, *9*(4), 559–571.
- Muria-Gonzalez, M. J., Chooi, Y. H., Breen, S., & Solomon, P. S. (2015). The past, present and future of secondary metabolite research in the Dothideomycetes. *Molecular Plant Pathology*, *16*(1), 92–107.
- Nadal, M., García-Pedrajas, M. D., & Gold, S. E. (2008). Dimorphism in fungal plant pathogens. *FEMS Microbiology Letters*, *284*(2), 127–134.

- Navarro-Meléndez, A. L., & Heil, M. (2014). Symptomless Endophytic Fungi Suppress Endogenous Levels of Salicylic Acid and Interact With the Jasmonate-Dependent Indirect Defense Traits of Their Host, Lima Bean (*Phaseolus lunatus*). *Journal of Chemical Ecology*, 40(7), 816–825.
- Nimura, Y., Tsujiyama, S., & Ueno, M. (2010). Bioconversion of cinnamic acid derivatives by *Schizophyllum commune*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 387, 381–387.
- Nützmann, H., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., & Horn, F. (2011). Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga / Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 108(34), 14282–14287.
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31–43.
- Orton, E. S., Deller, S., & Brown, J. K. M. (2011). *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Molecular Plant Pathology*, 12(5), 413–424.
- Palmer, C. L., & Skinner, W. (2002). *Mycosphaerella graminicola*: Latent infection, crop devastation and genomics. *Molecular Plant Pathology*, 3, 63–70.
- Pellier, A. L., Laugé, R., Veneault-Fourrey, C., & Langin, T. (2003). CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Molecular Microbiology*, 48, 639–655.
- Pérez-García, A., Snoeijsers, S. S., Joosten, M. H., Goosen, T., & De Wit, P. J. (2001). Expression of the Avirulence Gene *Avr9* of the Fungal Tomato Pathogen *Cladosporium fulvum* Is Regulated by the Global Nitrogen Response Factor NRF1. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(3), 316–325.
- Podobnik, B., Stojan, J., Lah, L., Kraševc, N., Seliškar, M., Rižner, T. L., Rozman, D., & Komel, R. (2008). CYP53A15 of *Cochliobolus lunatus*, a target for natural antifungal compounds. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(12), 3480–3486.
- Ponomarenko, A., Goodwin, S. B., & Kema, G. H. J. (2011). *Septoria tritici* blotch (STB) of wheat. *Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2011-0407-01
- Prescott, J., Burnett, P., & Saari, E. (1986). Wheat diseases and pests. A guide for field identification. CIMMYT. Mexico, D.F., Mexico.

- Prusky, D. (1996). Pathogen Quiescence in Postharvest Diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 413-434.
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., & Fluhr, R. (2013). Quiescent and Necrotrophic Lifestyle Choice During Postharvest Disease Development. *Annual Review of Phytopathology*, 51, 155-176.
- Quaedvlieg, W., Kema, G. H. J., Groenewald, J. Z., Verkley, G. J. M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., & Crous, P. W. (2011). *Zymoseptoria* gen. nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 26, 57–69.
- Rabe, F., Ajami-Rashidi, Z., Doehlemann, G., Kahmann, R., & Djamei, A. (2013). Degradation of the plant defence hormone salicylic acid by the biotrophic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 89(1), 179–188.
- Rasmussen, S., & Dixon, R. A. (1999). Transgene-Mediated and Elicitor-Induced Perturbation of Metabolic Channeling at the Entry Point into the Phenylpropanoid Pathway. *The Plant Cell*, 11, 1537-1551.
- Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F. I., & Goodwin, S. B. (2003). Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Molecular Biology*, 53(5), 701–714.
- Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Engineering*, 12(2), 85–94.
- Rudd, J. J. (2015). Previous bottlenecks and future solutions to dissecting the *Zymoseptoria tritici*–wheat host-pathogen interaction. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 24–28.
- Rudd, J. J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J., & Courbot, M. (2015). Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle def. *Plant Physiology*, 167(3), 1158–1185.
- Saboki, E., Usha, K., & Singh, B. (2011). Pathogenesis Related ( PR ) Proteins in Plant Defense Mechanism. Age-Related Pathogen Resistance. *Current Research and Technological Advances*, 1043–1054.

- Sachan, A., Ghosh, S., & Mitra, A. (2006). Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *Letters in Applied Microbiology*, 42(1), 35–41.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (2001). Molecular cloning, a laboratory manual. 3rd edition, Book 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M. C., Solomon, P. S., & McDonald, B. A. (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology*, 79, 29–32.
- Sansom, C. (2000). Database searching with DNA and protein sequences: an introduction. *Briefings in Bioinformatics*, 1(1), 22–32.
- Schindler, D., & Nowrousian, M. (2014). The polyketide synthase gene *pks4* is essential for sexual development and regulates fruiting body morphology in *Sordaria macrospora*. *Fungal Genetics and Biology*, 68, 48–59.
- Scholten, H. J., & Pierik, R. L. M. (1998). Agar as a gelling agent: Chemical and physical analysis. *Plant Cell Reports*, 17(3), 230–235.
- Shetty, N. P., Mehrabi, R., Lütken, H., Haldrup, A., Kema, G. H. J., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. L. (2007). Role of hydrogen peroxide during the interaction between the hemibiotrophic fungal pathogen *Septoria tritici* and wheat. *New Phytologist*, 174(3), 637–647.
- Shigenaga, A. M., & Argueso, C. T. (2016). No Hormone to Rule Them All: Interactions of Plant Hormones During the Responses of Plants to Pathogens. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Article in press.
- Shukla, A., & Dwivedi, S. K. (2013). Antifungal approach of phenolic compounds against *Fusarium udum* and *Fusarium oxysporum f. sp. ciceri*. *African Journal of Agriculture Research*, 8(7), 596–600.
- Shwab, E. K., Jin, W. B., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S., & Keller, N. P. (2007). Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic Cell*, 6(9), 1656–1664.
- Smith, D. J., Burnham, M. K., Bull, J. H., Hodgson, J. E., Ward, J. M., Browne, P., Brown, J., Barton, B., Earl, A. J., & Turner, G. (1990). Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *The EMBO Journal*, 9(3), 741–747.

- Smith-Becker, J., Marois, E., Huguet, E. J., Midland, S. L., Sims, J. J., & Keen, N. T. (1998). Accumulation of salicylic acid and 4-hydroxybenzoic acid in phloem fluids of cucumber during systemic acquired resistance is preceded by a transient increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in petioles and stems. *Plant Physiology*, *116*(1), 231–238.
- Snoeijs, S. S., & Alejandro, P. (2000). The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, *106*, 493–506.
- Soanes, D. M., Kershaw, M. J., Cooley, R. N., & Talbot, N. J. (2002). Regulation of the *MPG1* hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*(12), 1253–1267.
- Solomon, P. S., & Oliver, R. P. (2001). The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta*, *213*(2), 241–249.
- Soukup, A. A., Keller, N. P., & Wiemann, P. (2016). Enhancing Nonribosomal Peptide Biosynthesis in Filamentous Fungi. *Methods in Molecular Biology*, *1401*, 149–160.
- Stephenson, S. A., Hatfield, J., Rusu, A. G., Maclean, D. J., & Manners, J. M. (2000). CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(9), 929–941.
- Still, W. C., Kahn, M., & Mitra, A. (1978). Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *The Journal of Organic Chemistry*, *43*(14), 2923–2925.
- Strahl, B. D., & Allis, C. D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature Progress*, *403*, 41–45.
- Subazini, T. K., & Kumar, G. R. (2011). Characterization of Lovastatin biosynthetic cluster proteins in *Aspergillus terreus* strain ATCC 20542. *Bioinformation*, *6*(7), 250–254.
- Sweigard, J.A., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L., & Valent, B. (1997). A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genetics Newsletter*, *44*, 52–53.
- Sze, I., & Dagley, S. (1984). Properties of salicylate hydroxylase and hydroxyquinol 1,2-dioxygenase purified from *Trichosporon cutaneum*. *Journal of Bacteriology*, *159*(1), 353–359.

- Szkopińska, A. (2000). Ubiquinone. Biosynthesis of quinone ring and its isoprenoid side chain. Intracellular localization. *Acta Biochimica Polonica*, 47(2), 469–480.
- Takahama, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: Physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1–2), 207–219.
- Talbot, N. J., Ebbole, D. J., & Hamer, J. E. (1993). Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 5(11), 1575–1590.
- Tao, Y., & Marzluf, G. A. (1999). The NIT2 nitrogen regulatory protein of *Neurospora*: Expression and stability of nit-2 mRNA and protein. *Current Genetics*, 36(3), 153–158.
- Thomma, B. P. H. J., Van Esse, H. P., Crous, P. W., & De Wit, P. J. G. M. (2005). *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology*, 6(4), 379–393.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A., & Arst Jr., H. N. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *The EMBO Journal*, 14(4), 779–790.
- Torriani, S. F. F., Melichar, J. P. E., Mills, C., Pain, N., Sierotzki, H., & Courbot, M. (2015). *Zymoseptoria tritici*: A major threat to wheat production, integrated approaches to control. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 8–12.
- Trail, F., Mahanti, N., Rarick, M., Mehigh, R., Liang, S. H., Zhou, R., & Linz, J. E. (1995). Physical and transcriptional map of an aflatoxin gene cluster in *Aspergillus parasiticus* and functional disruption of a gene involved early in the aflatoxin pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(7), 2665–2673.
- Tudzynski, B. (2014). Nitrogen regulation of fungal secondary metabolism in fungi. *Frontiers in Microbiology*, 5(11), 1–15.
- UN (2015). United Nations, Department of Economic and Social Affairs. <http://www.un.org> (Stand 2015).
- Upchurch, R. G., Walker, D. C., Rollins, J. A., Ehrenshaft, M., & Daub, M. E. (1991). Mutants of *Cercospora kikuchii* Altered in Cercosporin Synthesis and Pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(10), 2940–2945.

- Vaher, M., Matso, K., Levandi, T., Helmja, K., & Kaljurand, M. (2010). Phenolic compounds and the antioxidant activity of the bran, flour and whole grain of different wheat varieties. *Procedia Chemistry*, 2(1), 76–82.
- van den Brink, J. M., van den Hondel, C. A., & van Gorcom, R. F. M. (1996). Optimization of the benzoate-inducible benzoate p-hydroxylase cytochrome P450 enzyme system in *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 360–364.
- van Gorcom, R. F., Boschloo, J. G., Kuijvenhoven, A., Lange, J., van Vark, A. J., Bos, C. J., van Balken, J. A. M., Pouwels, P. H., & van den Hondel, C. A. (1990). Isolation and Molecular Characterization of the Benzoate-Para-Hydroxylase Gene (*bphA*) of *Aspergillus niger* - a Member of a New Gene Family of the Cytochrome-P450 Superfamily. *Molecular & General Genetics*, 223(2), 192–197.
- van Klan, J.A.L. (2005). Infection Strategies of *Botrytis cinerea*. *Proc. VIIIth IS Post-harvest Phys. Ornamentals, Acta Hort.* 669, ISHS, 77-89.
- van Wijk, D. J., Kroon, S. G., & Garttner-Arends, I. C. (1998). Toxicity of chlorate and chlorite to selected species of algae, bacteria, and fungi. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40, 206–211.
- Vernooij, B., Friedrichya, L., Reist, R., Kolditzjawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessman, H., & Ryals, J. (1994). Salicylic Acid is Not the Translocated Signal Responsible for Inducing Systemic Acquired Resistance but Is Required in Signal Transduction. *Plant Cell*, 6, 959–965.
- Volk, T. (2015). Gelbrost- und *Septoria*-Strategie. *Getreidemagazin*, 2, 18–21.
- Walker, J. M. (2012). Fungal Secondary Metabolism- Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*, 531, 47-58.
- Wasil, Z., Pahirulzaman, K. A. K., Butts, C. P., Simpson, T. J., Lazarus, C. M., & Cox, R. J. (2013). One pathway, many compounds: heterologous expression of a fungal biosynthetic pathway reveals its intrinsic potential for diversity. *Chemical Science*, 4(10), 3845–3856.
- Wei, N., & Deng, X. (2003). The COP9 Signalosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19, 261-286.
- Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E., & Cichewicz, R. H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 6(11), 1895–1897.

- Wilson, R. A., Fernandez, J., Quispe, C. F., Gradnigo, J., Seng, A., Moriyama, E., & Wright, J. D. (2012). Towards Defining Nutrient Conditions Encountered by the Rice Blast Fungus during Host Infection. *PLoS ONE*, 7(10), 1–9.
- Wong, K., Hynes, M. J., & Davis, M. A. (2008). Recent advances in nitrogen regulation: A comparison between *Saccharomyces cerevisiae* and filamentous fungi. *Eukaryotic Cell*, 7(6), 917–925.
- Xie, X.-G., & Dai, C.-C. (2015). Biodegradation of a model allelochemical cinnamic acid by a novel endophytic fungus *Phomopsis liquidambari*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 498-507.
- Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H., & Hayaishi, O. (1965). Salicylate Hydroxylase, a Monooxygenase Requiring Flavin Adenine Dinucleotide. *Journal of Biological Chemistry*, 240(8), 3408–3413.
- Yu, J.-H., & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *The Annual Review of Phytopathology*, 43(114), 437–458.
- Zhang, A., Lu, P., Dahl-Roshak, A. M., Paress, P. S., Kennedy, S., Tkacz, J. S., & An, Z. (2003). Efficient disruption of a polyketide synthase gene (pks1) required for melanin synthesis through *Agrobacterium-mediated* transformation of *Glarea lozoyensis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(5), 645–655.
- Zwiers, L. H., & De Waard, M. A. (2001). Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene disruption in the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Current Genetics*, 39(5–6), 388–393.

## Anhang

### Anhang I: Oligonukleotid-Primer

#### Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Vektoren für die Geninaktivierung

In Tabelle 7 und 8 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer zur Herstellung von Inaktivierungsvektoren dargestellt. Die Primer wurden ebenfalls verwendet um mit einem Schnellverfahren Rekombinationsereignisse nach der Transformation zu untersuchen, um somit eine Vorselektion von passenden Kandidaten für den Southern Blot zu treffen (vgl. 2.2.2.3). Dafür wurde jeweils der *forward* Primer bzw. 5'-for und der *reverse* Primer bzw. 3'-rev verwendet.

**Tabelle 7: Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Inaktivierungsvektoren nach der *gene disruption* Methode.** Die Sequenzen sind in 5'-3'Richtung angegeben. Eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind in Kleinbuchstaben geschrieben.

Name	Sequenz (5'-3')
Mg_HDA2404_for	GGCCCTACTTAAATTCGTCGT
Mg_HDA2404_rev	TTGTGCGTCGTTTTGTGCAT
myco <i>AreA</i> -for	ATGTGGCGCTGGCATGGTCC
myco <i>AreA</i> -rev	AGGGTGGCCCTCAGGGTTGC
myco <i>CRE1</i> -for	CAGTCGCAAACGACCGTGCG
myco <i>CRE1</i> -rev	CGCGCCGATCTGGACTGGAG
mycoCSN5-5'-for	GCGAACGCCTCCGTCACTGAA
mycoCSN5-3'-rev	TGCACCGAGGTAGCTTGGAGTG

**Tabelle 8: Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von Inaktivierungsvektoren mit dem Gibson-Assembly.** Die Sequenzen sind in 5' - 3' Richtung angegeben. Die mit den Primern eingefügten Überhänge für die Ligationsreaktion sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

Name	Sequenz (5'-3')
GA_3'-For_PKS1	ccagttaacgATGCCTACGAACTGGCCA
GA_3'-Rev_PKS1	ccatggtggactcctcttaaTCATACGCGGTGACCAAA
GA_5'-For_PKS1	cggcgcgccgaattcccgggAGCGAGCTTCCTGCAGTATC
GA_5'-Rev_PKS1	ttaacgtcgaTCTCCGAGACGATGGGCT
GA_HPT-PKS1-For	gtctcggagaTCGACGTAACTGATATTGAAG
GA_HPT-PKS1-Rev	tcgtaggcatCGTAACTGGTTCCCGGT
GA_PKS2-3'-For	ttaacgtcgaTCATTGACGATACGCTGTC
GA_PKS2-3'-Rev	ccatggtggactcctcttaaCTCTTGTGTCATCAAAGGG
GA_PKS2-5'-For	cggcgcgccgaattcccgggCTCAAAGATCGCGCCACT
GA_PKS2-5'-Rev	ttaacgtcgaTGAGAGGTGGTCAACCAAC
GA_PKS2-HPT-For	ccacctcgaTCGACGTAACTGATATTGAAG
GA_PKS2-HPT-Rev	tcgtcaatgaTCGACGTAACTGGTTCC
GA3ForPKS10	ccagttaacgAAAGTGCACTGTGCAAC
GA3ForPKS4	ccagttaacTCCCGACAGTGTACATT
GA3RevPKS10	ccatggtggactcctcttaaCTGTCCGTCGTATACGCT
GA3RevPKS4	ccatggtggactcctcttaaTAATACCGTGTCCCCACA
GA5ForPKS10	cggcgcgccgaattcccgggCTCACGCCATCCTTGAGG
GA5ForPKS4	cggcgcgccgaattcccgggGCAACAATTGCAGGCTCC
GA5RevPKS10	ttaacgtcgaCCCCTATGCGTGACTGAG
GA5RevPKS4	ttaacgtcgaGAGTTGACACAGGCGACG
GAHPTForPKS10	cgcataagggTCGACGTAACTGATATTGAAG
GAHPTForPKS4	gtgtcaactcTCGACGTAACTGATATTGAAG
GAHPTRevPKS10	agtgcactttCGTAACTGGTTCCCGGT
GAHPTRevPKS4	actgtcgggaCGTAACTGGTTCCCGGT

### Oligonukleotid-Primer zur Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für den Southern Blot

Die DIG-markierten DNA-Sonden wurden mit Hilfe der in Tabelle 9 aufgelisteten Primer in einer PCR-Reaktion hergestellt (vgl. 2.2.2).

**Tabelle 9: Oligonukleotid-Primer für die Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für den Southern Blot.** Die Sequenzen sind in 5' - 3'-Richtung angegeben.

Name	Sequenz (5'-3')
AreA-Sonde-for	TGAGAACGACGCGGTTGAAA
AreA-Sonde-rev	TCCACCCAAAGTCTGCAACA
CRE1-Sonde-for	CGGCAATGCGGAATTGAGCCG
CRE1-Sonde-rev	CGCGCCGATCTGGACTGGAG
CSN5-Sonde-for	TTCCGCACATACCAGAAGG
CSN5-Sonde-rev	GTATCAGTGCCATTCGCGTC
HDA-Sonde-for	CTTGACTGACGGGCATAGGG
HDA-Sonde-rev	CGATCAGTCGTGTTTGCAGC
HPT-Sonde-for	CGAAGAATCTCGTGCTTTCAGC
HPT-Sonde-rev	GTCGTCCATCACAGTTTGCC
PKS10-Sonde-for	GTATTCTCGGCTGGTTCCGA
PKS10-Sonde-rev	TGGGGAGGTTCTGTAGGACA
PKS2-Sonde-for	TGACGATACGCTGTCCAAC
PKS2-Sonde-rev	CCCATCCTCTGATAGCCACC
Sonde-PKS4-for	GGCGACCACTACGCCTAAG
Sonde-PKS4-rev	GTAAGGCACCGAAGTAGCCA
Zt-PKS1-Dig-for	AGATCGGCCATTACCCTTGC
Zt-PKS1-Dig-rev	AAGGGTCGCAGTGAGCATC

### Oligonukleotid-Primer für die q-PCR

Für die Genexpressionsanalysen mittels q-PCR wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Primerpaare verwendet.

**Tabelle 10: Oligonukleotid-Primer für die Genexpressionsanalyse in *Z. tritici*.** Die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Name	Sequenz (5'-3')
<i>AreA</i> -RT-for	AGCGAAGGGTGAGAACGAAA
<i>AreA</i> -RT-rev	ACGTCTCGAGGTTGAAAGGG
CYP53-RT-for	GCATCATAGCAAGGAGATCTGGG
CYP53-RT-rev	AAGCACGAGGACCATAGGAGA
Mg_PKS1_RT_For	AACCACCGCACCGACTTTT
Mg_PKS1_RT_Rev	CTTCCACTCGATGCCTTCCTT
Mg_PKS10_RT_For	CTCCGCCAACTCTCCCGAT
Mg_PKS10_RT_Rev	GTTCCCATGACGAGTGAATGGT
Mg_PKS17_RT_For	CAATGCAGTCCTCACCGTGG
Mg_PKS17_RT_Rev	GGCGAGGGAATCACGTCAA
Mg_PKS2_RT_For	GACTGGTTATTTGAGGCCCA
Mg_PKS2_RT_Rev	TCACGGACCCGATCAAGAGA
Mg_PKS3_RT_For	CGGAATGCCACGGAAGTGG
Mg_PKS3_RT_Rev	ACATTTGACTTGACCGAGCCG
Mg_PKS4_RT_For	CTTTAGTTCCGTGGCCGATTGC
Mg_PKS4_RT_Rev	CCGGTCAAGCCGTGAGACTT
Mg_PKS5_RT_For	GAAGATCTAGCACCGGGCG
Mg_PKS5_RT_Rev	TGGAAGCTCAACAATGCCCA
Mg_PKS7_RT_For	TGTCGCTTCGTTTGTCTCG
Mg_PKS7_RT_Rev	GTCGTTCCAAGGGATGAGCC
Mg_PKS8_RT_For	GATCCGGCCATTATCATCCAGA
Mg_PKS8_RT_Rev	CGACAATGCTTCTCCTTTCGTG
Mg_PKS9_RT_For	TGCACTGTATTCTCCGACCG
Mg_PKS9_RT_Rev	TTCTTCAGGTTCAAGGGCGT
RT-Mg- $\beta$ Tub-for	CTTCCGCCAGACAACTTCGT
RT-Mg- $\beta$ Tub-rev	TCTGGAAACCCTGGAGGCAGT

## Anhang II: Klonierungsstrategien

### *Zthda* (JGI Protein-ID 37223)

Für die Generierung von  $\Delta Zthda$  wurde zunächst, ausgehend von genomischer DNA aus *Z. tritici* IPO323, ein 4130 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar Mg\_HDA2404-for und Mg\_HDA2404-rev amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pJET1.2/blunt Vektor ligiert (pJET-HDA, 7104 bp). Nach dem Öffnen des Vektors pJET-HDA mit *SalI*, wurde eine ebenfalls mit *SalI* restringierte *hpt*-Sequenz aus pCAMB-HPT (*SalI*) eingefügt. Es entstand der pJET-HDA-HPT Vektor, mit einer Größe von 5781 bp. Das mit *XhoI/XbaI* restringierte HDA-HPT Fragment aus pJET-HDA-HPT wurde in den mit *SalI/SpeI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Somit entstand der finale Vektor pCAMB-HDA-HPT (9597 bp).

### *Ztcsn5* (JGI Protein-ID 99069)

Für die Generierung von  $\Delta Ztcsn5$  wurde, ausgehend von genomischer DNA aus *Z. tritici* IPO323, ein 1400 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar mycoCSN5-5'-for und mycoCSN5-3'-rev amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM-T easy Vektor ligiert (pGEM-CSN5, 4417 bp). Nach dem Öffnen des Vektors pGEM-CSN5 mit *XhoI*, wurde eine mit *SalI* restringierte *hpt*-Sequenz aus pCAMB-HPT (*SalI*) eingefügt. Es entstand der pGEM-CSN5-HPT Vektor, mit einer Größe von 5873 bp. Das mit *PspOMI/PstI* restringierte CSN5-HPT Fragment aus pGEM-CSN5-HPT wurde in den mit *PspOMI/PstI* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Somit entstand der finale Vektor pCAMB-CSN5-HPT (9708 bp).

### *Ztcre1* (JGI Protein-ID 100278)

Für die Generierung von  $\Delta Ztcre1$  wurde, ausgehend von genomischer DNA aus *Z. tritici* IPO323, ein 2800 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar mycoCRE1-for und mycoCRE1-rev amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM-T easy Vektor ligiert (pGEM-Cre1, 5818 bp). Durch Restriktion des Vektors pGEM-Cre1 mit *BglII/XhoI* wurde ein 1638 bp-großes Fragment der kodierenden Sequenz entfernt. An dieser Stelle wurde eine mit *BamHI/XhoI* restringierte *hpt*-Sequenz aus pCB1636 eingefügt. Es entstand der pGEM-Cre1-HPT Vektor, mit einer Größe von 5687 bp. Das mit *NotI/SpeI* restringierte *Cre1*-HPT Fragment aus pGEM-Cre1-HPT wurde in den mit

---

*PspOMI/AvrII* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Somit entstand der finale Vektor pCAMB-*CreI*-HPT (9484 bp).

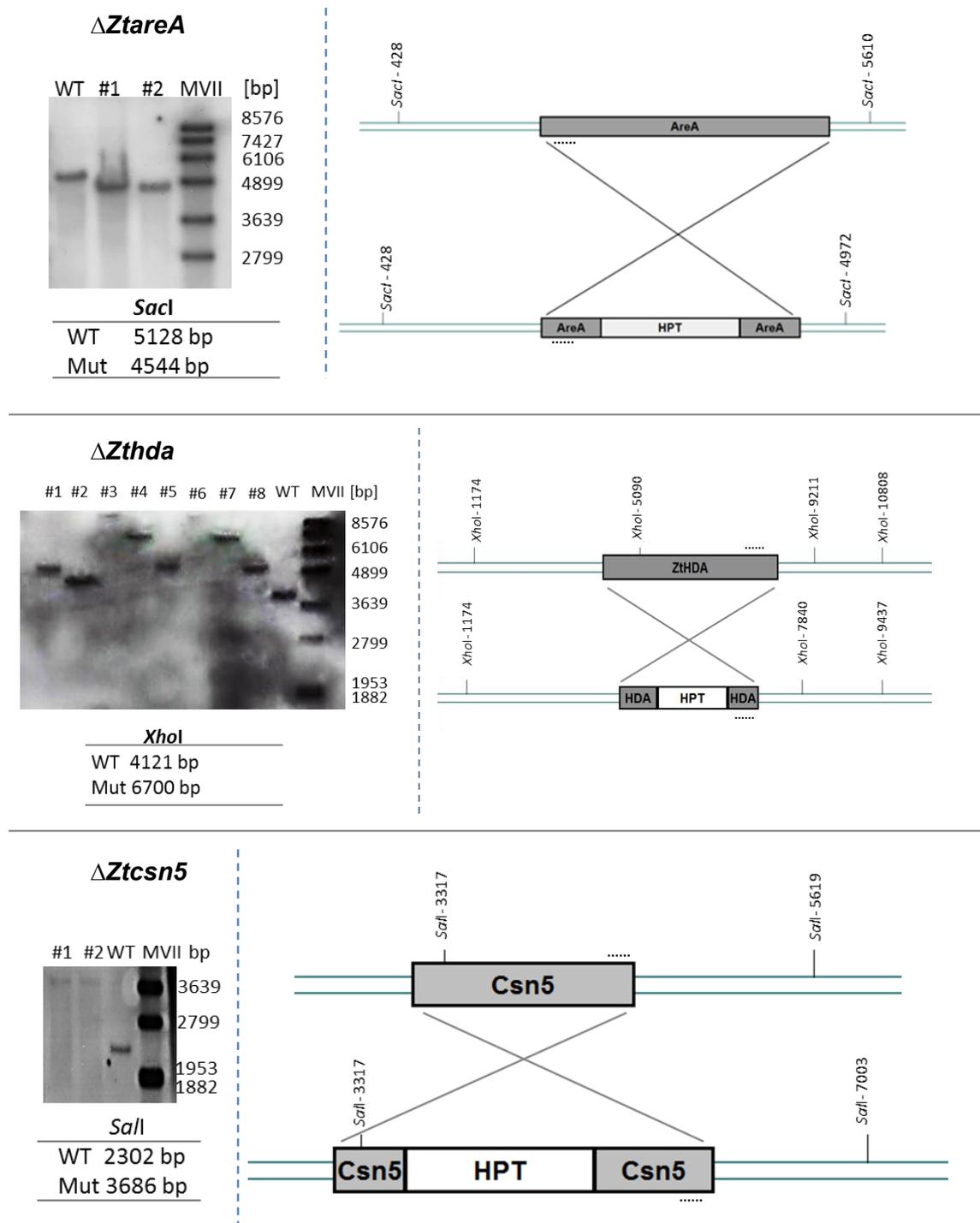
#### ***ZtareA*** (JGI Protein-ID 109392)

Für die Generierung von  $\Delta ZtareA$  wurde, ausgehend von genomischer DNA aus *Z. tritici* IPO323, ein 3200 bp großes PCR-Produkt mit dem Primerpaar *mycoAreA*-for und *mycoAreA*-rev amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den pGEM-T easy Vektor ligiert (pGEM-*AreA*, 6237 bp). Durch Restriktion des Vektors pGEM-*AreA* mit *BamHI/XhoI* wurde ein 2021 bp-großes Fragment der kodierenden Sequenz entfernt. An dieser Stelle wurde eine mit *BamHI/XhoI* restringierte *hpt*-Sequenz aus pCB1636 eingefügt. Es entstand der pGEM-*AreA*-HPT Vektor, mit einer Größe von 5723 bp. Das mit *NotI/SpeI* restringierte *AreA*-HPT Fragment aus pGEM-*AreA*-HPT wurde in den mit *PspOMI/AvrII* restringierten pCAMBIA0380 ligiert. Somit entstand der finale Vektor pCAMB-*AreA*-HPT (9525 bp).

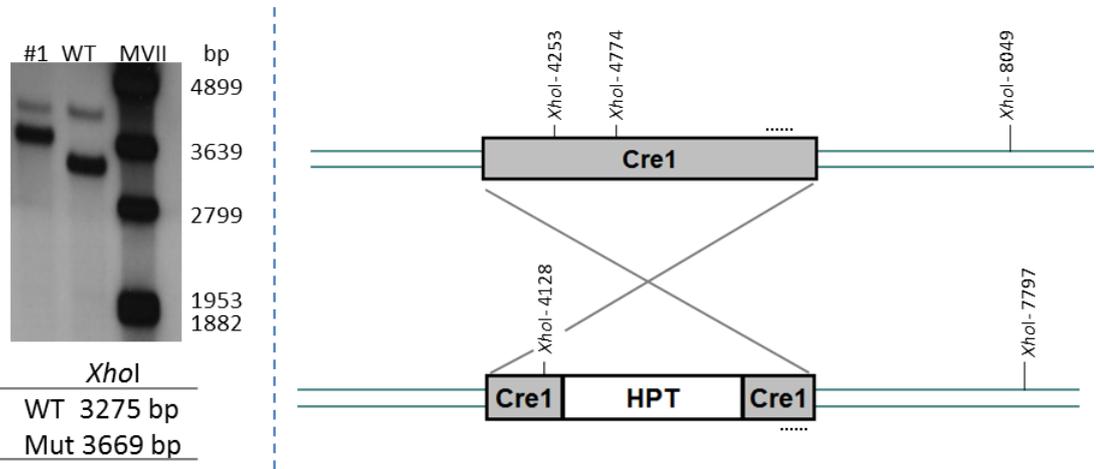
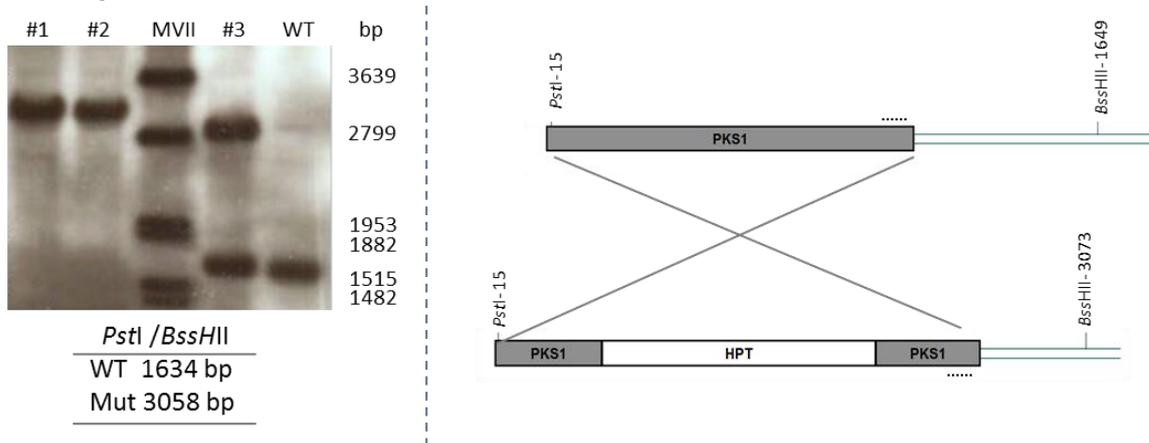
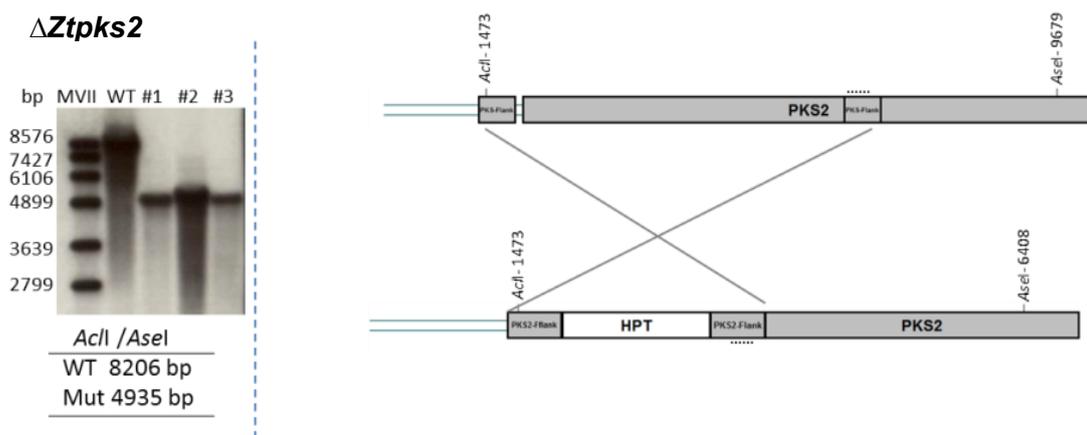
#### ***Ztpks***

Der Inaktivierungsvektor für  $\Delta Ztpks1$  (JGI Protein-ID 96592),  $\Delta Ztpks2$  (JGI Protein-ID 47832),  $\Delta Ztpks4$  (JGI Protein-ID 72709) und  $\Delta Ztpks10$  (JGI Protein-ID 67477) wurden mit dem NEB® HiFi DNA Assembly Mix generiert. Es wurden je zwei 550 bp umfassende DNA-Abschnitte (5'- und 3'-*Flank*) der kodierenden PKS-Sequenzen in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Zur Amplifikation wurde genomische DNA von *Z. tritici* IPO323 als Template verwendet und die Primer aus Tabelle 8 eingesetzt. Die HPT-Gensequenz wurde mit ebenfalls in einer PCR-Reaktion amplifiziert, wobei das pCAMBIA-HPT(*SalI*)-Plasmid als Template diente. Die amplifizierten Fragmente wurden mit dem zuvor durch *BamHI* und *HindIII* linearisierten pCAMBIA0380-Plasmid in einer Assembly-Reaktion zu dem finalen Inaktivierungsvektor pCAMB-PKSX-HPT ligiert.

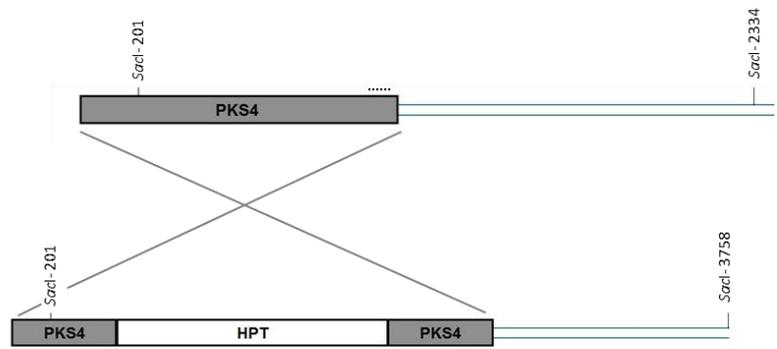
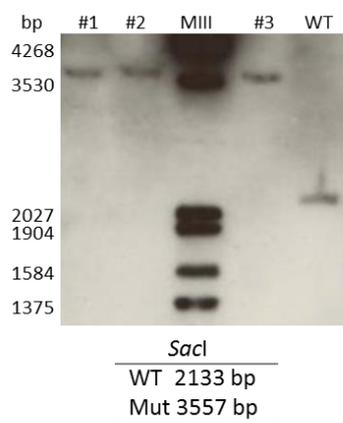
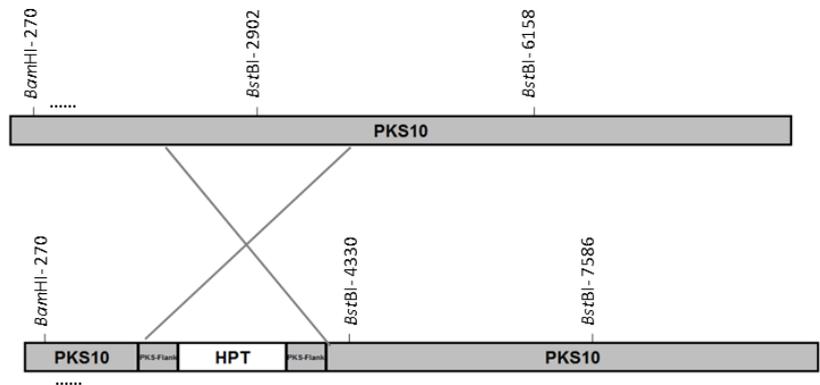
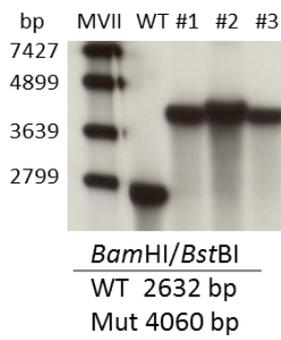
## Anhang III: Southern Blot Analysen



**Abbildung 30: Southern Blot Analyse zur Bestätigung homologer Rekombinationsereignisse im Genom der generierten Mutanten.** Links im Bild ist der Röntgenfilm mit den detektierten Hybridisierungssignalen gezeigt. Darunter ist das verwendete Enzym zur Restriktion genomischer DNA sowie die erwarteten Fragmentgrößen für die WT- bzw. die Mutanten-DNA (Mut) abgebildet. Rechts im Bild ist jeweils eine schematische Darstellung der Modifikation des Genlokus gezeigt. Mit der gestrichelten Linie ist die Bindestelle der DIG-Sonde markiert. Zudem sind die Schnittstellen des verwendeten Enzyms gekennzeichnet.

**$\Delta Ztcre1$**  **$\Delta Ztpps1$**  **$\Delta Ztpps2$** 

**Fortsetzung Abbildung 30: Southern Blot Analyse zur Bestätigung homologer Rekombinationsergebnisse im Genom der generierten Mutanten.** Links im Bild ist der Röntgenfilm mit den detektierten Hybridisierungssignalen gezeigt. Darunter ist das verwendete Enzym zur Restriktion genomischer DNA sowie die erwarteten Fragmentgrößen für die WT- bzw. die Mutanten-DNA (Mut) abgebildet. Rechts im Bild ist jeweils eine schematische Darstellung der Modifikation des Genlokus gezeigt. Mit der gestrichelten Linie ist die Bindestelle der DIG-Sonde markiert. Zudem sind die Schnittstellen des verwendeten Enzyms gekennzeichnet.

**$\Delta Ztpks4$**  **$\Delta Ztpks10$** 

**Fortsetzung Abbildung 30: Southern Blot Analyse zur Bestätigung homologer Rekombinationsergebnisse im Genom der generierten Mutanten.** Links im Bild ist der Röntgenfilm mit den detektierten Hybridisierungssignalen gezeigt. Darunter ist das verwendete Enzym zur Restriktion genomischer DNA sowie die erwarteten Fragmentgrößen für die WT- bzw. die Mutanten-DNA (Mut) abgebildet. Rechts im Bild ist jeweils eine schematische Darstellung der Modifikation des Genlokus gezeigt. Mit der gestrichelten Linie ist die Bindestelle der DIG-Sonde markiert. Zudem sind die Schnittstellen des verwendeten Enzyms gekennzeichnet.

## **Lebenslauf**