

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mikrobiologie und Weinforschung am Institut für Molekulare Physiologie, Mainz

Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung, Kaiserslautern

**Molekulare Mechanismen der Osmoregulation in
Magnaporthe oryzae und deren Modulation
durch das Fungizid Fludioxonil**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

eingereicht von
Stefan Bohnert
geb. am 06.04.1989 in Kaiserslautern

Mainz, Februar 2019

Molekulare Mechanismen der Osmoregulation in
Magnaporthe oryzae und deren Modulation
durch das Fungizid Fludioxonil

Tag der Promotionsprüfung: 01.04.2019

Mainz

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt zu haben und keine weiteren als die angegebenen Hilfsmittel genutzt zu haben. Diese Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Mainz, Februar 2019

Stefan Bohnert

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	V
Summary	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Anmerkungen zur Nomenklatur	IX
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Pflanzenschutz	1
1.1.1 Nahrungssicherung für eine wachsende Weltbevölkerung	1
1.1.2 Phytopathogene Pilze und Fungizide	1
1.1.3 Das Fungizid Fludioxonil.....	3
1.2 Histidinkinasen	4
1.2.1 Histidinkinasen und Zweikomponenten-Systeme.....	4
1.2.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen	5
1.2.3 Gruppe III Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen und die Wirkungsweise von Fludioxonil	8
1.3 Signaltransduktion und Osmoregulation	9
1.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden	9
1.3.2 Der HOG-Signalweg in Hefe und in phytopathogenen Pilzen	10
1.3.3 Osmotischer Salzstress und osmotischer Zuckerstress.....	12
1.3.4 Proteinphosphatasen	13
1.4 <i>Magnaporthe oryzae</i> als Modellorganismus für phytopathogene filamentöse Pilze	14
1.5 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Wasser.....	16
2.1.2 Lösungsmittel.....	16
2.1.3 Säuren und Laugen	16
2.1.4 Antibiotika	16
2.1.5 Medienbestandteile und Chemikalien.....	17
2.1.6 Arbeitsmaterial	18
2.1.7 Lösungen und Puffer	18
2.1.7.1 Lösungen und Puffer für die Southern Blot Analyse	18
2.1.7.2 Sonstige Lösungen und Puffer.....	20
2.1.8 Kulturmedien.....	21
2.1.9 Verwendete Mikroorganismen	23

2.1.10	Reaktionskits	24
2.1.11	Enzyme	24
2.1.12	Plasmide	24
2.1.13	Antikörper.....	25
2.1.14	Primer	25
2.1.15	Software.....	26
2.2	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.1	Präparation von Nukleinsäuren	27
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Magnaporthe oryzae</i>	27
2.2.1.2	Isolierung von RNA aus Myzel von <i>Magnaporthe oryzae</i>	27
2.2.1.3	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.1.4	Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren	27
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.2.2.1	PCR zur Amplifikation von DNA.....	27
2.2.2.2	Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden	28
2.2.2.3	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	29
2.2.3	Restriktion von Nukleinsäuren	29
2.2.4	Dephosphorylierung von Schnittstellen	30
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	30
2.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.2.7	Plasmidkonstruktion nach der Methode von Gibson <i>et al.</i> (2009).....	31
2.2.8	Transformation.....	33
2.2.8.1	Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	33
2.2.8.2	Herstellung kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen.....	33
2.2.8.3	Transformation kompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Zellen durch Hitzeschock	34
2.2.8.4	Transformation von <i>Magnaporthe oryzae</i> durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1.....	34
2.2.9	Southern Blot Analyse	34
2.2.9.1	Isolierung und Fällung genomischer DNA	35
2.2.9.2	Transfer der Nukleinsäuren auf die Nylonmembran	35
2.2.9.3	Hybridisierung	35
2.2.9.4	Detektion der DNA-Sonde.....	36
2.2.10	Western Blot Analyse	36
2.2.10.1	Kultivierung, Zellaufschluss und Proteinextraktion	36
2.2.10.2	SDS-PAGE, Elektroblothing und Detektion	37
2.3	Phänotypische Untersuchungen von <i>Magnaporthe oryzae</i>	37
2.3.1	Wachstum auf verschiedenen Festmedien	37
2.3.2	Herstellung von Konidiensuspensionen	38
2.3.3	Keimungsverhalten und Appressorienbildung	38
2.3.4	Protoplastentest zur Ermittlung der Zellwandstabilität	38
2.3.5	Pathogenitätstest auf Reispflanzen	39
2.3.6	Fluoreszenzmikroskopie mit <i>Magnaporthe oryzae</i>	39

2.3.7	Analyse intrazellulärer Primärmetabolite	40
2.3.7.1	Kultivierung und Induktion von <i>Magnaporthe oryzae</i> Stämmen	40
2.3.7.2	Extraktion intrazellulärer Primärmetabolite	40
2.3.7.3	Quantifizierung von Primärmetaboliten	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Phosphatasen als Modulatoren der Osmoregulation	42
3.1.1	Überexpression des Phosphatasegens <i>MoPTP2</i> führt zu Fludioxonil-Resistenz	43
3.1.2	Überexpression von <i>MoPTP2</i> führt zur verstärkten Dephosphorylierung der MAPK MoHog1p	45
3.1.3	MoPtp2p beeinflusst die Osmoregulation, Zellwandintegrität, Konidiogenese, Konidienkeimung und Virulenz von <i>Magnaporthe oryzae</i>	47
3.2	Visualisierung der Aktivierung des HOG-Signalwegs	49
3.2.1	Fusion der MAPK MoHog1p mit dem Fluoreszenzprotein GFP	49
3.2.2	Die MAPK MoHog1p transloziert bei osmotischem Schock in den Zellkern	50
3.2.3	Die MAPK MoHog1p transloziert bei Fludioxonil-Stress in den Zellkern	51
3.2.4	Nukleäre Translokation der MAPK MoHog1p bei verschiedenen Arten von Stress	54
3.2.5	In Mutantenstämmen mit inaktiviertem HOG-Signalweg transloziert die MAPK MoHog1p nicht in den Zellkern	55
3.2.6	Die Mechanismen der HOG-Signalweg-abhängigen Perzeption von osmotischem Stress und Fludioxonil-Stress sind unterschiedlich	56
3.3	Die metabolische Stressantwort in <i>Magnaporthe oryzae</i>.....	59
3.3.1	HOG-Signalweg-abhängige und Osmostress-bedingte Akkumulation von Osmolyten in <i>Magnaporthe oryzae</i>	60
3.3.2	Osmotischer Stress und Fludioxonil-Stress führen zur intrazellulären Akkumulation von Arabitol in <i>Magnaporthe oryzae</i>	61
3.3.3	Intrazelluläre Akkumulation von Glycerol und Mannitol in <i>Magnaporthe oryzae</i> als schnelle und transiente Reaktion auf hyperosmotischen Schock	63
3.3.4	Die intrazelluläre Akkumulation von Glycerol, Mannitol und Arabitol in <i>Magnaporthe oryzae</i> erfolgt nicht generell durch Zellstress	63
3.3.5	Nur osmotische Stimuli als Aktivatoren des HOG-Signalwegs führen zur intrazellulären Anreicherung von Osmolyten in <i>Magnaporthe oryzae</i>	64
3.3.6	Die Osmolytproduktion als Reaktion auf Salzschock oder Zuckerschock ist nicht MoSln1p- oder MoHik1p-abhängig	65
3.3.7	Die Mechanismen der Initiation der Osmolytproduktion als Reaktion auf osmotischen Schock oder auf Fludioxonil-Stress sind unterschiedlich	68
4	Diskussion.....	71
4.1	Der Wirkmechanismus von Fludioxonil	71
4.1.1	Überexpression der MoHog1p-dephosphorylierenden Phosphatase MoPtp2p vermittelt Fludioxonil-Resistenz	72

4.1.2	Die Perzeptionen von Fludioxonil-Stress und hyperosmotischen Schocks sind unterschiedlich, die initialen zellulären Antwortreaktionen sind ähnlich	77
4.2	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen als spezifische Sensoren in <i>Magnaporthe oryzae</i>.....	81
4.2.1	Hyperosmotischer Schock, Salzenstress und Zuckerstress.....	82
4.2.2	Intrazelluläre Glycerol- und Mannitol-Akkumulation in <i>Magnaporthe oryzae</i> als initiale und transiente Reaktion auf hyperosmotischen Schock	86
4.2.3	MoSln1p-abhängige initiale Mannitol-Akkumulation bei Salzschock – MoSln1p als spezifischer Sensor für Salzen-abhängigen Stress?	88
4.2.4	MoHik1p als spezifischer Sensor des zellulären Redoxstatus, reaktiver Sauerstoffspezies und/oder Hypoxie-assoziiierter Zustände?	91
4.2.5	Der Einfluss von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen auf intrazelluläre Primärmetabolitkonzentrationen ohne Stresssituationen	95
4.2.6	Die Beteiligung von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen bei Differenzierungsprozessen und Zellkernteilungsprozessen	96
4.2.7	MoHog1p-GFP als Screening-Tool und zur Identifizierung und Validierung zellulärer Targets von antifungischen Substanzen.....	98
4.2.8	Signalspezifität bei begrenzter Anzahl an Signalproteinen	101
5	Ausblick.....	104
6	Literaturverzeichnis.....	105
7	Anhang.....	118
7.1	Abbildungen	118
4.1	Tabellen	124

Zusammenfassung

Die stetig größer werdende Herausforderung und unausweichliche, globale Problematik zunehmender Fungizidresistenzen phytopathogener Pilze ist hochaktuell. Das Fungizid Fludioxonil, welches den für die pilzliche Osmoregulation verantwortlichen „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg moduliert, wird seit mehr als 20 Jahren weltweit in der Landwirtschaft eingesetzt – bisher ohne nennenswerte Resistenzbildungen. Der molekulare Wirkmechanismus dieses Fungizids ist noch weitgehend unverstanden und dessen Erforschung deshalb von höchster Relevanz für den integrierten Pflanzenschutz. Die im Rahmen dieser Arbeit mit dem filamentösen Ascomycet *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) erzielten Ergebnisse zu molekularen Mechanismen der Wirkungsweise von Fludioxonil und zu sensorischen Funktionen von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HKs) werden dazu einen wertvollen Beitrag liefern.

Es konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass es neben Genen, welche bisher bekannte Proteine des HOG-Signalwegs von *M. oryzae* kodieren, noch weitere Komponenten gibt, deren genetische Manipulation zu einer veränderten Fludioxonil-Suszeptibilität in filamentösen, phytopathogenen Pilzen führt. Die homologe Überexpression der Phosphatase MoPtp2p resultierte in einer Fludioxonil-resistenten Mutante mit reduziertem Phosphorylierungsgrad der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) MoHog1p. Inaktivierung von *MoPTP2* resultierte hingegen in einem Fludioxonil-sensitiven Phänotyp. Daraus kann geschlossen werden, dass MoPtp2p am Prozess der Signaltransduktion im HOG-Signalweg und auch entscheidend an der Wirkungsweise des Fungizids Fludioxonil beteiligt ist.

Die für die Osmoregulation essentielle MAPK MoHog1p transloziert nach Aktivierung vom Zytosol in den Zellkern. Durch Proteinfusion von MoHog1p mit dem Fluoreszenzprotein GFP konnte ein molekulares Werkzeug generiert werden, welches umfassende Analysen zur Aktivierung des HOG-Signalwegs erlaubt. Durch Expression des Fusionsproteins MoHog1p-GFP in verschiedenen "loss of function"-Mutanten, bei denen einzelne Komponenten des HOG-Signalwegs inaktiviert sind, konnten so Untersuchungen zur Signalspezifität in diesem Signalweg durchgeführt werden. Unterstützt wurden Ergebnisse durch Untersuchungen des Primärmetabolismus von *M. oryzae* zur intrazellulären Akkumulation von Osmolyten nach Induktion mit diversen Stimuli.

Zum einen konnte so zum ersten Mal gezeigt werden, dass Fludioxonil-Applikation analog zu hyperosmotischen Stimuli in *M. oryzae* zur Translokation von MoHog1p in den Zellkern führt, sowie die intrazelluläre Akkumulation des Osmolyts Arabitol bewirkt. Die molekularen Mechanismen der Perzeption und der Signaltransduktion bei Fludioxonil-Stress und hyper-

osmotischem Stress unterscheiden sich jedoch. Für eine Translokation von MoHog1p in den Zellkern und eine intrazelluläre Akkumulation von Arabitol bei Fludioxonil-Stress ist die Anwesenheit der Gruppe III HK MoHik1p essentiell. Für eine nukleäre Translokation von MoHog1p und eine adäquate intrazelluläre Akkumulation von Arabitol bei hyperosmotischem Schock hingegen nicht.

Zum anderen konnte die Hypothese einer spezifischen Detektion von Salzstress bzw. Zuckerstress durch die HKs MoSln1p bzw. MoHik1p untersucht und schließlich spezifiziert werden: MoSln1p bzw. MoHik1p detektieren vermutlich nicht direkt Salz- oder Zuckerkonzentrationen, sondern wahrscheinlich sekundär unterschiedliche zelluläre Mechanismen oder Zustände, welche mit langfristigem Salz- oder Zuckerstress assoziiert sind oder dadurch jeweils spezifisch ausgelöst werden – nämlich möglicherweise Ionenstress, Hypoxie, oxidativen Stress, und/oder Änderungen im zellulären Redoxpotential.

Weiterhin konnten potentiell unterschiedliche Aktivierungsmechanismen des HOG-Signalwegs postuliert werden, welche abhängig vom Stimulus entweder in einer direkten (hyperosmotischer Schock, Fludioxonil-Stress) oder verspäteten (Hypoxie / oxidativer Stress / Redox-Stress) Translokation von MoHog1p in den Zellkern resultieren.

Summary

The results of this work concerning the molecular mechanisms of the mode of action of the fungicide fludioxonil and on signaling functions of two-component hybrid histidine kinases (HKs) will make valuable contributions to the integrated plant protection management.

It could be demonstrated that apart from genes known so far coding for proteins of the "High Osmolarity Glycerol" (HOG) signaling pathway, there are more components involved in fludioxonil susceptibility in the filamentous phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. Homologous overexpression of the phosphatase MoPtp2p resulted in a fludioxonil resistant mutant with low MoHog1p phosphorylation, thus exhibiting a new molecular mechanism of fungicide resistance. Likewise, inactivation of *MoPTP2* led to a fludioxonil hypersensitive phenotype. In conclusion MoPtp2p is involved in the signal transduction process in the HOG signaling pathway and is also crucial for the mode of action of the fungicide fludioxonil.

The mitogen activated protein kinase MoHog1p, which is essential for osmoregulation, translocates from the cytosol into the nucleus upon pathway activation. Fusion of MoHog1p with the fluorescence protein GFP generated a molecular tool suitable for comprehensive visualization of HOG pathway activation. Expression of the fusion protein MoHog1p-GFP in various loss of function mutants of the HOG signaling pathway enabled sophisticated investigations of signaling specificity. These findings were supported by analyses of metabolomic changes upon application of varied stressors.

Thus, it could be demonstrated that fludioxonil treatment leads to nuclear translocation of MoHog1, as well as to intracellular accumulation of the osmolyte arabitol – analogous to hyperosmotic shocks. However, the underlying molecular mechanisms for perception of fludioxonil stress and hyperosmotic stress differ. MoHik1p is essential for nuclear translocation of MoHog1p and intracellular accumulation of arabitol during fludioxonil stress, but not during hyperosmotic stress.

Furthermore, the hypothesis of a specific detection of high molar salt or sugar stress by the HKs MoSln1p or MoHik1p could be investigated and finally specified: MoSln1p or MoHik1p do not detect specifically salt- or sugar concentrations, however, they probably detect secondary mechanisms or states associated with or initiated by long-term salt stress or long-term sugar stress – i.e. ion stress, hypoxia, oxidative stress and/or changing cellular redox potential.

Finally two distinct HOG pathway activation mechanisms could be postulated, which result dependent on the stimulus in a rapid (hyperosmotic shock, fludioxonil stress) or delayed (hypoxia / oxidative stress / redox stress) nuclear translocation of MoHog1p.

Abkürzungsverzeichnis

AI-Medium	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Induktionsmedium
ATP	Adenosintriphosphat
BAR	Bialaphos Resistenz Gen
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSD	Blasticidin-S Deaminase Gen
CM	Komplettmedium
CMG	Komplettmedium mit insgesamt 2% Glukose
CFW	Calcofluor White
CSPD	Chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate
DE	Deionisiert
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
HAMP	Histidine kinase, adenylyl cyclase, methyl-accepting protein phosphatase
HATPase	Histidin-ATPase-Domäne
HK	Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase
HisKA	Histidinkinase-Domäne
HOG	High Osmolarity Glycerol
HPAEC-PAD	High-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection
HPT	Hygromycin Phosphotransferase Gen
LB	Lysogeny Broth
lof	"loss of function"
MAPK (-K,-KK)	Mitogen Activated Protein Kinase (-kinase, -kinase kinase)
MM	Minimal-Medium
MoWT	Wildtypstamm

PAS	Period circadian protein, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, single-minded protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
REC	Receiver domain, Regulatorische Domäne
RF	RNase-frei
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrink Alkaline Phosphatase
SREBP	Sterol Response Element Binding Protein
UF	Ultrafiltriert
Upm	Umdrehungen pro Minute

Anmerkungen zur Nomenklatur:

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

MoPTP2: das Gen *PTP2* aus *Magnaporthe oryzae*

$\Delta Moptp2$: die *Magnaporthe oryzae*-Mutante, in der das Gen *MoPTP2* inaktiviert ist

MoEF1::PTP2: Überexpressions des Gens *MoPTP2* mit dem konstitutiv aktiven Promotor *MoEF1* im Wildtypstamm

MoHog1p: das korrespondierende Protein zum Gen *MoHOG1*

MoHog1p-GFP: Fusionsprotein von MoHog1p (N-terminal) mit dem grün fluoreszierenden Protein eGFP (C-terminal)

$\Delta Mohik1/\Delta Mosln1/MoHOG1::GFP$: in der *Magnaporthe oryzae*-Mutante mit den inaktivierten Genen $\Delta Mohik1$ und $\Delta Mosln1$ wird das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimiert

Wurde in der jeweils verwendeten Literatur eine andere Schreibweise genutzt, so wurde diese übernommen.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Der Naturstoff Pyrrolnitrin und das Agrarfungizid Fludioxonil	3
Abb. 2: Schematischer Vergleich der Gruppe VI HK MoSln1p und der Gruppe III HK MoHik1p aus <i>Magnaporthe oryzae</i>	7
Abb. 3: Modell des HOG-Signalwegs in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und in <i>Magnaporthe oryzae</i>	10
Abb. 4: Vegetatives Wachstum von MoWT, der Überexpressionsmutante MoEF1::PTP2 und der lof-Mutanten Δ Mohog1 und Δ Moptp2 unter Fludioxonil-Stress.....	43
Abb. 5: Myzel-Trockengewichte von MoWT, der Überexpressionsmutante MoEF1::PTP2 und den lof-Mutanten Δ Mohog1 und Δ Moptp2 nach Kultivierung in MM bzw. nach Kultivierung in MM mit Fludioxonil	44
Abb. 6: Konidien-Keimungshemmungstest von MoWT, der Überexpressionsmutante MoEF1::PTP2 und den lof- Mutanten Δ Mohog1 und Δ Moptp2 unter Fludioxonil-Stress	45
Abb. 7: Phosphorylierung der MAPK MoHog1p in MoWT, in der Überexpressionsmutante MoEF1::PTP2 und in der lof-Mutante Δ Moptp2 vor und nach Fludioxonil-Behandlung	46
Abb. 8: Vegetatives Wachstum von MoWT, der Überexpressionsmutante MoEF1::PTP2 und der beiden lof-Mutanten Δ Mohog1 und Δ Moptp2 bei osmotischem Stress	47
Abb. 9: Zellkerntranslokation von MoHog1p als Reaktion auf hyperosmotischen Schock	50
Abb. 10: Reversible Zellkerntranslokation von MoHog1p nach hyperosmotischem Schock	51
Abb. 11: Zellkerntranslokation von MoHog1p bei Fludioxonil-Stress	52
Abb. 12: Keine Zellkerntranslokation von MoHog1p bei Geneticin-Stress	53
Abb. 13: Lokalisation von MoHog1p nach Induktion mit hyperosmotischem Salzstress, hyperosmotischen Zuckerstress und Fludioxonil-Stress	58
Abb. 14: Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in MoWT als Reaktion auf hyperosmotischen Schock und Fludioxonil-Stress sowie auf H ₂ O als Kontrolle 61	
Abb. 15: Intrazelluläre Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in Δ Mohog1 nach hyperosmotischem Schock und Fludioxonil-Applikation sowie nach Applikation von H ₂ O als Kontrolle . 62	
Abb. 16: Dynamische Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in MoWT als Reaktion auf hyperosmotischen Schock	63
Abb. 17: Vergleich der Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in MoWT, Δ Mohik1, Δ Mosln1 und Δ Mohog1 als Reaktion auf hyperosmotischen Salzschock bzw. hyperosmotischen Zuckerschock	66
Abb. 18: Vergleich der Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in MoWT, Δ Mohik1, Δ Mosln1, Δ Mohik1/ Δ Mosln1 und Δ Mohog1 als Reaktion auf hyperosmotischen Schock bzw. Fludioxonil-Stress.....	69
Abb. 19: Ein Modell, welches die Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der aktivierten MAPK MoHog1p in <i>Magnaporthe oryzae</i> beschreibt	74
Abb. 20: Ein Modell, welches Unterschiede in der HOG-Signalweg-abhängigen Perzeption von Fludioxonil-Stress und hyperosmotischem Stress in MoWT und Δ Mohik1 beschreibt.....	80
Abb. 21: Zwei Modelle, die die Perzeption und Signaltransduktion bei hyperosmotischem Schock im Gegensatz zu langfristigem hochmolarem Salzstress bzw. Zuckerstress, Hypoxie, oxidativem Stress oder verän- dertem zellulären Redoxpotential in <i>Magnaporthe oryzae</i> beschreiben	85
Abb. 22: Überexpression von MoPTP2 in MoEF1::PTP2	118
Abb. 23: Nachweis der genetischen Inaktivierung von MoPTP2 in Δ Moptp2	118

Abb. 24: SDS-PAGE-chromatographische Auftrennung der Proteinextrakte aus <i>MoWT</i> , Δ <i>Mohog1</i> , <i>MoEF1::PTP2</i> und Δ <i>Moptp2</i> jeweils vor und während Fludioxonil-Stress – Ladekontrolle zur Western Blot-Analyse .	119
Abb. 25: Myzel-Trockengewichte von <i>MoWT</i> , der Überexpressionsmutante <i>MoEF1::PTP2</i> und den lof-Mutanten Δ <i>Mohog1</i> und Δ <i>Moptp2</i> nach Kultivierung in CM bzw. nach Kultivierung in CM mit KCl	119
Abb. 26: Nachweis der Abwesenheit der nativen <i>MoHOG1</i> -Gensequenz im Genom von <i>MoHOG1::GFP</i>	120
Abb. 27: Nachweis der Genom-Integration des Fusionskonstrukts <i>MoHOG1-GFP</i> mittels PCR	121
Abb. 28: Gleichmäßige Verteilung des GFP-Signals in <i>MoEF1::GFP</i> bei hyperosmotischem Stress bzw. Fludioxonil-Stress	121
Abb. 29: Zellkerntranslokation von MoHog1p während der Konidienkeimung.....	122
Abb. 30: Multinukleäre Zellen in Konidien von Δ <i>Mohik1</i> / Δ <i>Mosln1</i> / <i>MoHOG1::GFP</i>	122
Abb. 31: Intrazelluläre Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in <i>MoWT</i> nach Applikation von 200 µg/ml Geneticin	122
Abb. 32: Übersicht über die intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in <i>MoWT</i> , Δ <i>Mohik1</i> , Δ <i>Mosln1</i> , Δ <i>Mohik1</i> / Δ <i>Mosln1</i> und Δ <i>Mohog1</i> vor und nach Induktion mit hyperosmotischem KCl- bzw. Sorbitol-Stress, Fludioxonil oder H ₂ O als Kontrolle	123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primer	25
Tab. 2: Phänotypen von <i>MoEF1::PTP2</i> und Δ <i>Moptp2</i> im Vergleich zu den beiden Referenzstämmen <i>MoWT</i> und Δ <i>Mohog1</i>	48
Tab. 3: Hog1p-interagierende Proteinphosphatasen in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und deren Homologe in <i>Magnaporthe oryzae</i>	124
Tab. 4: Zellkerntranslokation von MoHog1p-GFP nach Stressapplikation	125

1 Einleitung

1.1 Pflanzenschutz

1.1.1 Nahrungssicherung für eine wachsende Weltbevölkerung

Eines der aktuell größten globalen Probleme ist der stetig steigende Bedarf an materiellen Rohstoffen und Nahrungsmitteln, zusammenhängend mit einer stark wachsenden Weltbevölkerung und der Ressourcenbegrenztheit unseres Planeten (Cole *et al.*, 2018; Schramski *et al.*, 2015; Krausmann *et al.*, 2018; Ehrlich und Ehrlich, 1990). Seit mehr als 35 Jahren ist der Ressourcenverbrauch der Menschheit größer als die Erde im gleichen Zeitraum zur Verfügung stellen kann, weshalb ein Umdenken zu einem verantwortungsbewussteren Umgang mit begrenzten Rohstoffen vorrangig in Industrieländern zwingend erforderlich ist (Wackernagel *et al.*, 2002). Vor allem im Bereich der Ernährungssicherung sind verschiedenste Lösungsstrategien zur Versorgung aller Menschen mit ausreichenden Mengen an Nahrungsmitteln unbedingt notwendig. Um einer immer größeren Nachfrage an diese gerecht zu werden, ist ein bewussterer und aufmerksamerer Umgang mit Nahrungsmitteln, eine Ertragssteigerung bei Kulturpflanzen für die Nahrungsmittelproduktion, sowie die Reduktion von Ernteaufwänden unumgänglich (Poore *et al.*, 2018; Peters *et al.*, 2016; Stoll-Kleemann und Schmidt, 2016; Keating *et al.*, 2014).

1.1.2 Phytopathogene Pilze und Fungizide

Pflanzenschädlinge sind neben ungünstigen klimatischen Bedingungen für erhebliche Ernteeinbußen verantwortlich. Im Gegensatz zu abiotischen Faktoren sind die Auswirkungen biotischer Faktoren besser zu beeinflussen. So ist die Schädlingsbekämpfung eine wichtige Eingriffsmöglichkeit, um Kulturpflanzen zu schützen und somit Ertragseinbußen zu verringern (Oerke, 2006). Die in der heutigen Zeit angebauten Hochleistungs-Kulturpflanzen werden durch Züchtung und genetische Modifikation für eine Steigerung des Ernteertragspotentials optimiert, sind jedoch oft anfälliger gegenüber pathogenen Organismen. Des Weiteren hat der weltweit durchgeführte, grundsätzlich ertragreiche Monokulturen-Anbau, aber die damit verbundene geringe Biodiversität im jeweiligen lokalen Ökosystem zur Folge, dass natürliche Regulationen weitestgehend ausbleiben und sich somit lokale Nischen für einzelne Pflanzenpathogene mit großem Ausbreitungspotenzial bilden (McDonald und Stukenbrock, 2016; Vyska *et al.*, 2016).

Phytopathogene Pilze zählen zu den ökonomisch wichtigsten Schädlingen von Kulturpflanzen. Etwa ein Drittel der wirtschaftlich relevanten Pflanzenkrankheiten werden durch Pilze verursacht (Anderson *et al.*, 2004). In einer Science-Spezialausgabe zum Thema

„food security“ wurden unter den sieben ökonomisch wichtigsten Pflanzenpathogenen alleine vier Pilze aufgelistet: Der Reisbranderreger *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) (anamorph: *Pyricularia oryzae*), der die schwarze Blattflecken-Krankheit auslösende Pilz *Mycosphaerella fijiensis*, sowie die beiden Rostpilze *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* und *Phakopsora pachyrhizi*, (Pennisi, 2010). Eine unverzichtbare Strategie zur Bekämpfung phytopathogener Pilze in der Landwirtschaft ist der Einsatz von Fungiziden (Oerke und Dehne, 2004).

Bis in die 1940er Jahre war die chemische Bekämpfung pilzlicher Schädlinge auf anorganische Präparate angewiesen wie z.B. Kupfer, Sulfat, oder die Bordeaux-Brühe (Russel, 2005). In den folgenden Jahrzehnten wurden organische Chemikalien als Fungizide eingeführt. Diese waren eine wesentliche Verbesserung gegenüber den bisher verwendeten anorganischen Fungiziden, da ihre Wirkungsweise spezifischer war, sie waren aktiver gegenüber phytopathogenen Pilzen und gleichzeitig weniger phytotoxisch. Seit 1970 erfuhr der Fungizidmarkt eine rasante Entwicklung. Es wurden verschiedenste Stoffklassen mit unterschiedlichen Wirkungsweisen entwickelt, welche zum Teil auch heute noch als Fungizide verwendet werden. Darunter zählen Triazole, Strobilurine, Dithiocarbamate, Benzimidazole uvm. (Morton und Staub, 2008; Stensvold *et al.*, 2012). Häufige Fungizid-Anwendungen führen jedoch aufgrund eines entsprechend hohen Selektionsdrucks zu Resistenzbildungen auf Pathogenseite gegenüber den entsprechenden Wirkstoffklassen (Hewitt, 2000).

Die immer größer werdende Herausforderung zunehmender Fungizidresistenzen phytopathogener Pilze ist hochaktuell (Fisher *et al.*, 2018). Fungizide werden hinsichtlich der Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung der zu bekämpfenden Pathogene gegenüber des entsprechenden Wirkstoffs in verschiedene FRAC (Fungicide Resistance Action Committee)-Gruppen eingeteilt. Die Ziele sind hierbei Richtlinien für das Management von Fungizidresistenzen zu schaffen und sowie neue Resistenzentwicklungen zu verhindern. Dies kann z.B. durch die kombinatorische Verwendung verschiedener Fungizidklassen, für welche keine Kreuzresistenzen in Pathogenen bekannt oder zu erwarten sind, erreicht werden (Keith und Derek, 2007).

Neben seit langer Zeit eingesetzten, systemischen, kurativen Fungiziden mit hohem Resistenzrisiko und der damit einhergehenden Existenz vieler resistenter Feldisolate pilzlicher Pflanzenpathogene, sind in der „FRAC Code List“ auch Wirkstoffgruppen mit niedrigerem Resistenzrisiko, z.B. Kontaktfungizide für präventive Anwendungen aufgeführt. Das Fungizid Fludioxonil wird in der „FRAC Code List“ innerhalb der *mode-of-action*-Klassifikation „E: signal transduction“ der Gruppe 12 zugeordnet, einer Gruppe mit geringem Resistenzrisiko (http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac_

code_list_2018-final.pdf?sfvrsn=6144b9a_2, FRAC Code List 2018). Trotz des intensiven Einsatzes dieses Wirkstoffs sind im Gegensatz zu Fungiziden, die anderen Gruppen der „FRAC Code List“ zugeordnet sind, annähernd keine Resistenzen in phytopathogenen Pilzen beschrieben, was Fludioxonil zu einem attraktiven Wirkstoff macht, dessen Wirkungsweise jedoch bis dato nicht umfassend verstanden ist.

1.1.3 Das Fungizid Fludioxonil

Fludioxonil ist eine synthetische Verbindung, die zur Gruppe der Phenylpyrrole gehört. Es ist ein 3-Cyano-4-Phenylpyrrol-Derivat des antifungischen Naturstoffs Pyrrolnitrin, der ursprünglich aus *Pseudomonas pyrocinia* isoliert wurde (Arima *et al.*, 1964) (Abb. 1). Pyrrolnitrin ist lichtempfindlich, weshalb u.a. das Analogon Fludioxonil synthetisiert wurde, um die Photostabilität zu verbessern (Nyfeler und Ackermann, 1992).

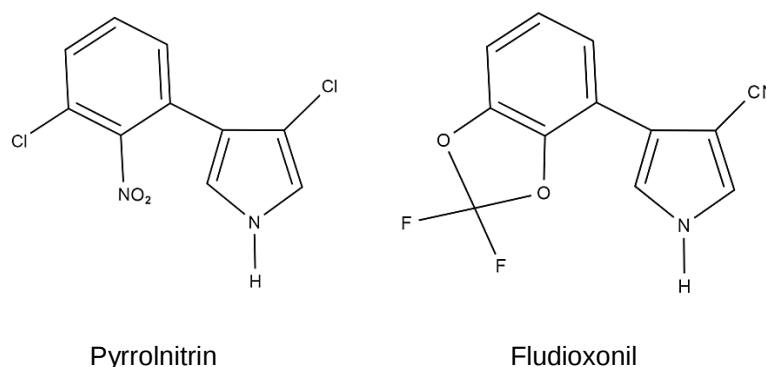


Abb. 1: Der Naturstoff Pyrrolnitrin und das Agrarfungizid Fludioxonil. Abgebildet sind die Strukturformeln dieser beiden Phenylpyrrole.

Als Fungizid wurde Fludioxonil 1993 von Ciba-Geigy auf den Markt gebracht. Es wird seitdem weltweit als nicht-systemisches Breitbandfungizid zur Bekämpfung von Pilzkrankheiten verschiedenster Kulturpflanzen eingesetzt, sowohl in der Saatgutbehandlung (z.B. „Maxim“ oder „Celest“ von Syngenta), als Spritzmittel während der Anbauperiode (z.B. „Switch“ von Syngenta, Wirkstoffkombination mit Cyprodinil), sowie auch für Behandlungen nach der Ernte (Börner, 2009).

Fludioxonil hemmt die pilzliche Sporenkeimung und das Myzelwachstum (Leroux, 1996). Es ist bekannt, dass Fludioxonil in filamentösen Pilzen durch Hyperaktivierung des für die Osmoregulation verantwortlichen „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg den Zelltod induziert (Kojima *et al.*, 2004; Yoshimi *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2002). Der Wirkmechanismus ist jedoch auch über 20 Jahre nach Markteinführung noch nicht im Detail verstanden (Lawry *et al.*, 2017).

Obwohl unter Laborbedingungen Fludioxonil-resistente Pilzmutantenstämme generierbar sind, ist der große Erfolg dieses Fungizids in der Landwirtschaft darauf zurückzuführen, dass bisher nur von sehr wenigen Fällen resistenter Feldisolate berichtet wurde (Kilani und Fillinger, 2016). Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich ein starker Fitness-Trade-off in resistenten Mutantenstämmen: Fludioxonil-Resistenz in Labormutanten von *M. oryzae*, *Botrytis cinerea* und *Alternaria brassicae* ist oft mit Sensitivität entsprechender Mutantenstämme gegenüber hoher Osmolarität und mit reduzierter Virulenz verbunden (Jacob *et al.*, 2015; Viaud *et al.*, 2006, Fillinger *et al.*, 2012).

Genetische Inaktivierungen von mit dem HOG-Signalweg assoziierten, und somit in der Osmoregulation beteiligten Gruppe III Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen filamentöser Pilze, führen zu Fludioxonil-resistenten Mutantenstämmen (Jacob *et al.*, 2015; Ajouz *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2016). Heterologe Expression der Gruppe III Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase MoHik1p aus *M. oryzae* in der natürlich Fludioxonil-resistenten Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) resultiert in einer Mutante mit Sensitivität gegenüber diesem Fungizid (Motoyama *et al.*, 2005). Daraus folgte die Hypothese, dass Gruppe III HKs die zellulären Zielproteine von Fludioxonil sind: In Abhängigkeit ihrer Anwesenheit wird der HOG-Signalweg durch Fludioxonil hyperaktiviert. Neue Erkenntnisse über physiologische Funktionen von Gruppe III Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen werden zum Verständnis der Wirkungsweise von Fludioxonil beitragen.

1.2 Histidinkinasen

1.2.1 Histidinkinasen und Zweikomponenten-Systeme

Histidinkinasen wurden Anfang der 1980er Jahre im Bakterium *Escherichia coli* identifiziert (Mizuno *et al.*, 1982). In den 1990er Jahren wurde die Existenz von Histidinkinasen auch in Archaeen (Rudolph und Oesterhelt, 1995), Cyanobakterien (Kehoe und Grossman, 1996), Amöben (Schuster *et al.*, 1996), Pflanzen (Chang *et al.*, 1993) und Pilzen (Ota und Varshavsky, 1993) bestätigt. Bald darauf wurde deutlich, dass Histidinkinasen als sensorische Proteine in der Regulation vieler Prozesse in pathogenen Bakterien und pathogenen Pilzen beteiligt sind. Zu typisch bakteriellen oder pilzlichen sensorischen Histidinkinasen ähnliche Proteine sind in Säugetieren noch nicht bekannt, was diese Proteine zu idealen Angriffspunkten für zukünftige spezifische Therapeutika macht (Attwood, 2013; Shor und Chauhan, 2015; Hérivaux *et al.*, 2016).

Bakterielle Histidinkinasen bestehen typischerweise aus einer Histidinkinase-Domäne (HisKA), einer Histidin-ATPase-Domäne (HATPase) sowie aus einer sensorischen Domäne (SD), sind membranständig und in der Signalperzeption verschiedenster extrazellulärer

Stimuli beteiligt. Histidinkinasen zeichnen sich wie Tyrosinkinasen durch eine Homodimerisierung und konstitutive gegenseitige Phosphorylierung der Monomere aus, die oft auch als Autophosphorylierung bezeichnet wird. Dabei werden γ -Phosphorylgruppen von ATP-Molekülen hydrolysiert (Johnson, 2009; Johnson und Barford, 1993) und mit Histidinresten über Phosphoramidatbindungen verknüpft; im Gegensatz zu Phosphoesterbindungen bei Serin-, Threonin- und Tyrosinkinasen (Islas-Flores *et al.*, 2011). Histidinkinasen sind zusammen mit regulatorischen Antwortproteinen in sogenannten Zweikomponenten-Systemen organisiert. Die Phosphatgruppe des phosphorylierten Histidinrests der HisKA in der sensorischen Histidinkinase wird nach Hydrolyse auf einen Aspartatrest einer regulatorischen Domäne (REC) in einem regulatorischen Antwortprotein übertragen, welches mit der Histidinkinase interagiert. Durch die Hydrolyse von Phosphoramidaten wird im Gegensatz zur Hydrolyse von Phosphoestern eine höhere Energie freigesetzt, was eine Modulation physiologischer Prozesse in biologischen Systemen effizienter macht (Stock *et al.*, 2000). Das regulatorische Antwortprotein ist mittels einer zusätzlichen Effektdomäne an einer physiologischen Antwortregulation beteiligt. Nach der abschließenden Hydrolyse der Phosphoramidat-Gruppe am Aspartatrest der REC des regulatorischen Antwortproteins steht der Aspartatrest für eine erneute Phosphorylierung zur Verfügung. Bakterielle Zweikomponenten-Systeme stellen also Verbindungsstellen zwischen äußeren Reizen und intrazellulärer Signalweiterleitung dar und erfüllen somit die Aufgabe von Reiz-Perzeption gefolgt von einer Umwandlung in ein intrazellulär übertragbares Signal. Dabei unterscheiden sich unterschiedliche Zweikomponenten-Systeme in den sensorischen Domänen und somit der Stimulus-Spezifität der entsprechenden Histidinkinasen sowie an jeweilig interagierenden regulatorischen Antwortproteinen. Dadurch sind Histidinkinasen bei der Perzeption einer Vielzahl von Stimuli und somit bei der Anpassung des Bakteriums bei verschiedenen sich ändernden Parametern in der Umwelt beteiligt (Gao und Stock, 2009; Skerker *et al.*, 2005; Mascher *et al.*, 2006). Die Anzahl an Genen im Genom eines Bakteriums, die Zweikomponenten-Systeme kodieren, korreliert dabei mit der Komplexität der ökologischen Nische des Bakteriums (Galperin *et al.*, 2010; Ulrich und Zhulin, 2010).

1.2.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen

In Eukaryoten wie z.B. phytopathogenen Pilzen, mit teilweise erheblich differenzierteren Lebenszyklen im Vergleich zu vielen Bakterien, existieren sogenannte Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HKs). HKs vereinen die in bakteriellen Zweikomponenten-Systemen involvierten Domänen HisKA, HATPase und SD von bakteriellen Histidinkinasen sowie die REC des bakteriellen regulatorischen Antwortproteins in einem einzigen Protein. Durch

Beteiligung dieser HKs in sogenannten Phosphorelaysystemen, die im Unterschied zu bakteriellen Zweikomponenten-Systemen zusätzliche Phosphotransferproteine und regulatorische Antwortproteine beinhalten, scheinen differenziertere Signalintegrationen und somit auch differenziertere zelluläre Antwortreaktionen möglich. Des Weiteren besitzen HKs eine enzymatische Phosphatase-Aktivität, was die Komplexität an Signalintegration innerhalb von Phosphorelaysystemen zusätzlich erhöht (Bhate *et al.*, 2015; Lawry *et al.*, 2017).

Neben den 3 Proteindomänen HisKA, HATPase und REC, die die Gemeinsamkeit von HKs ausmachen, besitzen HKs verschiedene SDs, wodurch sie in insgesamt 11 (Catlett *et al.*, 2003) unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Während es im Genom von *S. cerevisiae* nur ein einziges HK kodierendes Gen gibt, welches die membranständige Gruppe VI HK Sln1p kodiert, sind im Gegensatz dazu in den Genomen von pathogenen Pilzen mit differenzierteren Lebenszyklen etliche HK-kodierenden Gene vorhanden, in Analogie zur Korrelation der steigenden Anzahl von Zweikomponenten-Systemen mit komplexeren Lebensräumen in Bakterien. Gerade fakultativ pathogene Erreger sind im Rahmen ihres Lebenszyklus vielen, sich schnell verändernden Umweltbedingungen inner- und außerhalb ihrer Wirtsorganismen ausgesetzt und müssen für eine erfolgreiche Besiedelung und Infektion sensible und effiziente Mechanismen zur Signalerkennung und -Integration besitzen (Tanaka und Izumitsu, 2010). Bei Sequenzanalysen konnten so z.B. 10 HK-kodierende Gene im Genom von *M. oryzae*, 16 in *Fusarium verticillioides*, und 20 in *Botrytis cinerea* identifiziert werden (Defosse *et al.*, 2015). *M. oryzae* ist dabei der einzige Organismus, in dem bisher alle in seinem Genom identifizierten HKs durch genetische Inaktivierung charakterisiert werden konnten (Jacob *et al.*, 2014).

Dabei reichen die unterschiedlichen Aufgaben von HKs verschiedener Gruppen unter anderem von der Beteiligung in der Zellwandintegrität, über Lichtperzeption, bis hin zur Perzeption osmotischer Bedingungen (Hérivaux *et al.*, 2016). Die genauen molekularen Mechanismen sowohl der Detektion verschiedener Stimuli als auch der Signalintegration von HKs im Phosphorelaysystem sind jedoch bisher nicht im Detail verstanden.

HKs in Eukaryoten sind mit der Ausnahme von Gruppe VI HKs, welche membranständig sind, im Gegensatz zu bakteriellen Histidinkinasen, zytosolische Proteine. Dies wirft die Frage auf, wie ein extrazelluläres Signal von intrazellulären HKs perzipiert werden kann bzw. wie ein Umweltsignal in ein intrazelluläres Input-Signal übersetzt wird. So kann die zytosolische Gruppe III HK aus *Debaryomyces hansenii* auch ohne Transmembrandomäne die Funktionen der membranständigen Gruppe VI HK Sln1p vollständig übernehmen (Meena *et al.*, 2010). Es wird die Hypothese diskutiert, dass HKs dafür mit anderen membrangebundenen Sensorproteinen interagieren könnten (Hérivaux *et al.*, 2016).

Im Folgenden werden, stellvertretend für die Proteinfamilie der HKs, die membranständige Gruppe VI HK MoSln1p und die zytosolische Gruppe III HK MoHik1p aus dem filamentösen phytopathogenen Ascomycet *M. oryzae* näher beschrieben (Abb. 2).

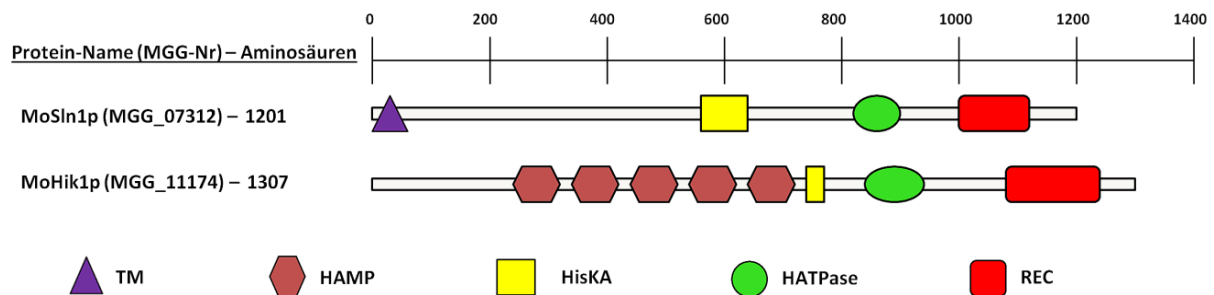


Abb. 2: Schematischer Vergleich der Gruppe VI HK MoSln1p und der Gruppe III HK MoHik1p aus *Magnaporthe oryzae*. Beide HKs besitzen die konservierten Proteindomänen HisKA, HATPase und REC. Zusätzlich besitzt MoSln1p eine Transmembrandomäne (TM), MoHik1p dagegen fünf aufeinanderfolgende HAMP-Domänen (HAMP) (modifiziert nach Jacob *et al.*, 2014).

Die HKs MoSln1p und MoHik1p sind beide aus den drei für HKs typischen Proteindomänen HisKA, HATPase und REC aufgebaut. Darüber hinaus besitzt MoSln1p eine Transmembrandomäne (TM) und MoHik1p fünf aufeinanderfolgende HAMP-Domänen (Histidine kinase, Adenylyl cyclase, Methyl-accepting protein Phosphatase). Die zu Sln1p aus dem Modellorganismus *S. cerevisiae* homologe Gruppe VI HK MoSln1p scheint in *M. oryzae* ebenso als Osmosensor zu fungieren: Eine genetische Inaktivierung des MoSln1p-kodierenden Gens *MoSLN1* resultiert in Sensitivität der entsprechenden Mutante gegenüber hyperosmotischem Salzstress (Jacob *et al.*, 2014). Der genaue Mechanismus der Detektion von hyperosmotischem Stress ist noch nicht geklärt.

Ebenso sind die Funktionen und molekularen Mechanismen der die Gruppe III HKs auszeichnenden HAMP-Domänen bisher noch nicht vollständig verstanden. Es gibt Hinweise, dass diese Domänen durch Konformationsänderung die Aktivität von HisKAs regulieren und somit eine Rolle bei der Wahrnehmung osmotischer Zustände spielen (Meena *et al.*, 2010; El-Mowafy *et al.*, 2013; Hagiwara *et al.*, 2016). Des Weiteren wurde beschrieben, dass HAMP-Domänen wichtig sind für eine Sensitivität von Pilzen gegenüber dem Fungizid Fludioxonil (Yoshimi *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2014). Ihre Erforschung kann somit eine wichtige Rolle spielen bei der Aufklärung des Wirkmechanismus von Fludioxonil (Furukawa *et al.*, 2012).

Die Funktion von Gruppe III HKs in der Wirkungsweise von Fludioxonil, sowie deren weite Verbreitung in pathogenen Pilzen bei gleichzeitiger Abwesenheit in Tieren und Menschen, aber auch ihre noch weitgehend ungeklärten physiologischen Funktionen in filamentösen Pilzen, machen HKs somit zu einem interessanten Forschungsobjekt – sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der anwendungsorientierten Forschung.

1.2.3 Gruppe III Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen und die Wirkungsweise von Fludioxonil

Der *mode of action* antibiotischer Substanzen beschreibt wirkstoffbedingte funktionale und anatomische Veränderungen auf zellulärer Ebene. Der Ausdruck *mechanism of action* ist spezifischer und bezieht sich auf die Interaktion zwischen dem Wirkstoff selbst mit einem Enzym oder Rezeptor (<http://www.frac.info/resistance-overview/mechanisms-of-fungicide-resistance>, FRAC, Stand 2018).

Im Gegensatz zum *mode of action* ist der *mechanism of action* von Fludioxonil noch in weiten Teilen unverstanden (Kilani und Fillinger, 2016). Bisher ist bekannt, dass die Anwesenheit einer Gruppe III HK inklusive funktionaler HAMP-Domänen notwendig ist für eine Fludioxonil-Sensitivität. Modifikationen der Aminosäuresequenz von HAMP-Domänen der Gruppe III HK Dic1 in *Cochliobolus heterostrophus* sowie DhNik1p in *Debaryomyces hansenii* resultierten in Fludioxonil-Resistenz der entsprechenden Mutanten (Yoshimi *et al.*, 2004; Kaur *et al.*, 2014). Eine direkte Bindung von Fludioxonil an eine HK oder gar an die HAMP-Domänen dieser Proteine konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

In der aktuellen Literatur wird diskutiert, ob durch Interaktion von Fludioxonil mit einem noch unbekannten Zielprotein sekundär die enzymatische Aktivität der Gruppe III HK Drk1 des Pilzes *Blastomyces dermatitidis* von einer Kinase-Aktivität zu einer Phosphatase-Aktivität geändert wird. Die veränderte enzymatische Aktivität führt zu einer erhöhten Dephosphorylierung des in der Signalkette downstream gelegenen Phosphotransferproteins Ypd1p im Phosphorelaysystem und resultiert schließlich in einer konstitutiven Hyperaktivierung der dem Phosphorelaysystem nachgeschalteten Signalkaskade im HOG-Signalweg (Lawry *et al.*, 2017). Eine solche konstitutive Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs durch Fludioxonil führt im humanpathogenen Ascomycet *Hansenula anomala* zur Akkumulation von Glycerol, Triglyceriden und freien Fettsäuren, zur Erhöhung der Membranpermeabilität für niedermolekulare Substanzen und schließlich zur Störung der gesamten Zellorganisation und zum Zelltod (Knauth und Reichenbach, 2000).

Für eine Aufklärung des *mechanism of action* von Fludioxonil, aber auch der Signalspezifität im HOG-Signalweg pathogener Pilze, ist ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Stressor-spezifischen Signalperzeption durch HKs und der nachgeschalteten Signaltransduktion von essentieller Bedeutung.

1.3 Signaltransduktion und Osmoregulation

1.3.1 Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskaden

Eine ständige Kommunikation mit der äußeren Umgebung und die damit einhergehende Perzeption von Signalen aus der Umwelt, welche z.B. Proliferation, Differenzierung oder Stressreaktionen induzieren, ist eine Grundvoraussetzung für die Vitalität von Mikroorganismen. Dementsprechend müssen lebende Zellen verschiedene exogene Signale integrieren, um intrazelluläre Abläufe situationsspezifisch anzupassen und zu steuern. Mikroorganismen haben dafür reversible Mechanismen entwickelt, um zelluläre Bestandteile wie z.B. Proteine zu modifizieren, welche äußere Reize vermitteln können. Über die Signalweiterleitung mittels Mitogen-aktivierter Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden werden viele zelluläre Reaktionen in Eukaryoten reguliert. MAPKs werden durch duale Phosphorylierung am Threonin- und Tyrosin-Rest des TxY-Motivs in ihrer Aktivierungsschleife durch MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert, die wiederum von vorgeschalteten MAPKK-Kinasen (MAPKKK) phosphoryliert und somit aktiviert wurden. Um entsprechende physiologische Reaktionen zu initiieren, aktivieren phosphorylierte MAPKs Transkriptionsfaktoren und weitere nachgeschaltete Komponenten (Chen und Thorner, 2007; Qi und Elion, 2005).

Bei Pilzspezies-übergreifenden Proteinsequenzvergleichen wurde festgestellt, dass die zentralen Komponenten von MAPK-Signalwegen generell hohe Sequenzähnlichkeiten besitzen, während Proteinsequenzen homologer, upstream gelegener, sensorischer Komponenten und downstream gelegener transkriptioneller Regulatoren in unterschiedlichen Spezies deutlich voneinander abweichen können (Nikolaou *et al.*, 2009).

Im Folgenden sind Gemeinsamkeiten und Unterschiede des für die Osmoregulation verantwortlichen „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg zum einen der Hefe *S. cerevisiae* und zum anderen des filamentösen Pilzes *M. oryzae* dargestellt.

1.3.2 Der HOG-Signalweg in Hefe und in phytopathogenen Pilzen

Unter physiologischen Normalbedingungen wird in *S. cerevisiae* durch kontinuierliche Autophosphorylierung der HK Sln1p („synthetic lethal of N-end rule“) und anschließend Phosphatgruppentransfer über das Phosphotransferprotein Ypd1p („tyrosine (y) phosphatase dependent“) zu dem Antwort-Regulator Ssk1p („suppressor of sensor kinase“) ein starkes Phosphorylierungsmuster im Phosphorelaysystem aufrechterhalten. Phosphorylierung von Ssk1p verhindert eine Aktivierung der nachgeschalteten MAPK-Kaskade mit ihren Komponenten Ssk2p (MAPKKK), Pbs2p („polymyxin B sensitivity“) (MAPKK) und Hog1p („high osmolarity glycerol“ response) (MAPK) (Abb. 3 a). Durch eine gestörte Phosphatgruppenübertragung im Phosphorelaysystem, z.B. durch eine Termination der Autophosphorylierung von Sln1p ausgelöst durch extrazellulären hyperosmotischen Stress, liegt Ssk1p in unphosphoryliertem Zustand vor. Es folgt eine Interaktion von Ssk1p mit Ssk2p, wodurch eine Autophosphorylierung von Ssk2p ausgelöst wird. Im Folgenden wird die MAPKK Pbs2p sowie die MAPK Hog1p über eine duale Phosphorylierung durch die jeweils upstream gelegene Kinase aktiviert (Hohmann, 2002).

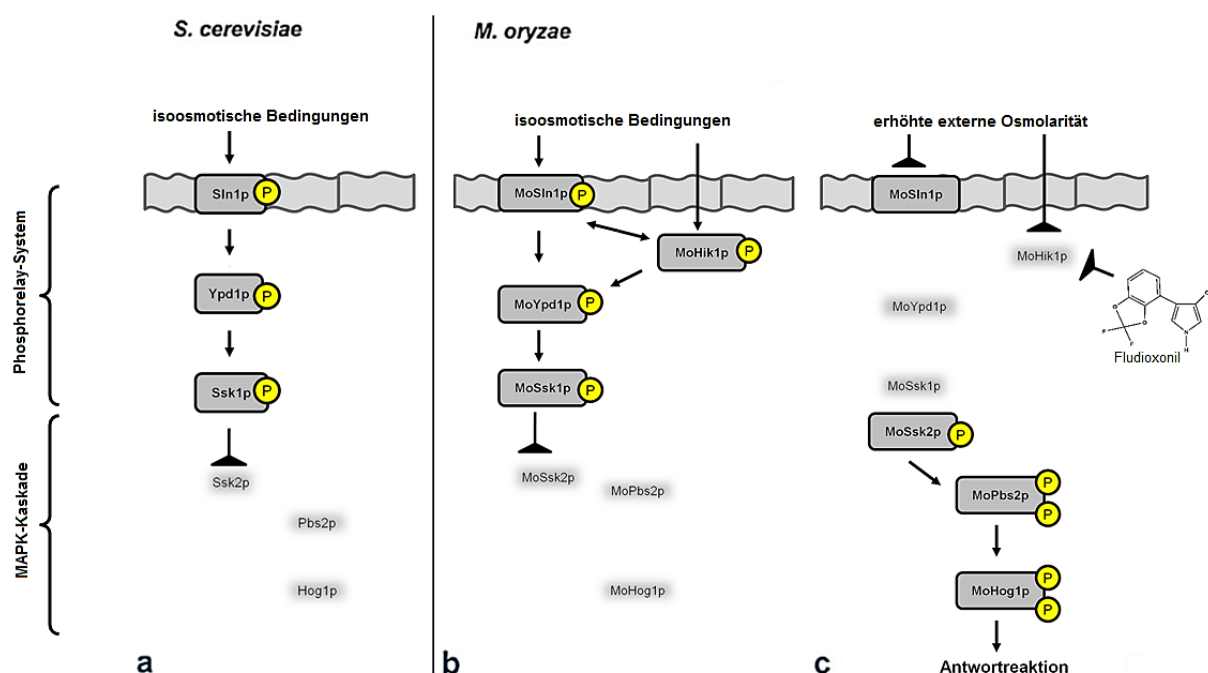


Abb. 3: Modell des HOG-Signalwegs in *Saccharomyces cerevisiae* und in *Magnaporthe oryzae*. Dargestellt ist ein vereinfachtes Modell des bei isoosmotischen Bedingungen inaktiven (a, b) und bei hoher externer Osmolarität aktiven (c) HOG-Signalwegs. Unter isoosmotischen Bedingungen verhindert ein kontinuierlicher Phosphotransfer im Phosphorelaysystem die Aktivierung der MAPK-Kaskade. Das Phosphorelaysystem von *M. oryzae* unterscheidet sich durch (mindestens) eine weitere HK, MoHik1p, als zweites putatives Sensorprotein neben Sln1p. Fludioxonil bewirkt bei Anwesenheit von MoHik1p eine Aktivierung der MAPK-Kaskade (c) (modifiziert nach Jacob *et al.*, 2015).

Neben einer hohen Homologie auf Ebene der Proteinsequenzen der Komponenten des HOG-Signalwegs in *S. cerevisiae* und *M. oryzae* (Krantz *et al.*, 2006), wurde zusätzlich aufgrund von experimentellen Ergebnissen aus Untersuchungen von "loss of function"-Mutanten (lof-Mutanten) einzelner Komponenten des Signalwegs in *M. oryzae* festgestellt, dass der Sln1p-Zweig des HOG-Signalwegs in diesen beiden Organismen grundsätzlich ähnlich aufgebaut sein muss (Jacob *et al.*, 2015).

In *S. cerevisiae* kann im Gegensatz zu *M. oryzae* die MAPKK Pbs2p unabhängig von Ssk2p über den Sho1p-Zweig aktiviert werden. Unterschiede im Sln1p-Zweig bestehen darin, dass neben der Gruppe VI HK MoSln1p im Genom von *M. oryzae* – im Gegensatz zum Genom von *S. cerevisiae* – noch neun weitere HKs, darunter die Fludioxonil-Suszeptibilität verleihende Gruppe III HK MoHik1p, gefunden wurden (Motoyama *et al.*, 2005; Jacob *et al.*, 2014). Eine Beteiligung von MoHik1p im Phosphorelaysystem von *M. oryzae* wurde bereits nachgewiesen (Jacob *et al.*, 2015) (Abb. 3 b). Durch Fludioxonil-Applikation wird das Phosphorylierungsmuster im Phosphorelaysystem von *M. oryzae* abhängig von MoHik1p gestört, das Phosphorylierungsmuster im Phosphorelaysystem von *S. cerevisiae* bleibt wegen Fehlen einer Gruppe III HK unbeeinflusst von Fludioxonil. Somit wird in *M. oryzae* sowohl durch hyperosmotischen Stress als auch durch Fludioxonil der HOG-Signalweg aktiviert und schließlich die MAPK MoHog1p phosphoryliert (Abb. 3 c) (Jacob *et al.*, 2015).

Nach Phosphorylierung transloziert die MAPK Hog1p in den Zellkern, um dort Transkriptionsfaktoren zu aktivieren und die Genregulation zu steuern (Ferrigno *et al.*, 1998; Rep *et al.*, 2000). Als zellphysiologisch wichtige Antwortreaktion auf eine extrazellulär hyperosmotische Stresssituation werden HOG-Signalweg-abhängig intrazellulär niedermolekulare Substanzen akkumuliert (Brewster *et al.*, 1993), welche der Zelle als Osmolyte dienen. Dadurch werden Proteine stabilisiert und einem Wasserausstrom aus der Zelle entgegengesteuert (Yancey *et al.*, 1982; Blomberg und Adler, 1992). In *S. cerevisiae* wird dabei hauptsächlich Glycerol akkumuliert, in *M. oryzae* hauptsächlich Arabitol (Brown, 1978; Dixon *et al.*, 1999).

Im Brotschimmel *Neurospora crassa* und im humanpathogenen Pilz *Candida albicans* wurden bei Fludioxonil-bedingter Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs eine zur Reaktion auf osmotischen Stress analoge intrazelluläre Akkumulation von Osmolyten festgestellt (Fujimura *et al.*, 2000a; Fujimura *et al.*, 2000b; Ochiai *et al.*, 2002). Ohne extrazelluläre Hyperosmolarität führt diese intrazelluläre Akkumulation von Osmolyten zu einem nach innen gerichteten osmotischen Potential und somit zu einem Wassereinstrom und einem Aufblähen der Zellen (Lara-Rojas *et al.*, 2011), sowie zu einer Störung der Membranintegrität, was zur Folge hat, dass durch Erhöhung der Membranpermeabilität letztendlich die gesamte Zellorganisation gravierend gestört wird und der Zelltod folgt (Knauth und Reichenbach, 2000). In *M. oryzae* wurde bisher kein Nachweis einer Fludioxonil-bedingten intrazellulären Akkumulation von Osmolyten erbracht.

1.3.3 Osmotischer Salzstress und osmotischer Zuckerstress

Mittels gezielter genetischer Manipulation konnten in *M. oryzae* lof-Mutanten einzelner Komponenten des HOG-Signalwegs generiert werden (Jacob *et al.*, 2015). In den entsprechenden Mutantenstämmen ist die Signalweiterleitung im HOG-Signalweg gestört und somit folgt keine zelluläre Antwortreaktion als Folge von hyperosmotischem Stress oder Fludioxonil-Stress. Die Mutanten haben Defizite im Wachstum auf Medien hoher Osmolarität im Vergleich zum Wildtypstamm. Im Gegensatz dazu sind diese Mutanten in der Lage auf Fludioxonil-haltigen Medien zu wachsen, weil keine Fungizid-bedingte Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs und somit keine unphysiologische zelluläre Antwortreaktion erfolgt (Jacob *et al.*, 2015).

Neben einer generellen Sensitivität dieser lof-Mutanten gegenüber osmotischem Stress wurde bei den beiden lof-Mutanten der zwei Sensor-HKs MoHik1p und MoSln1p, $\Delta Mohik1$ und $\Delta Mosln1$, eine differenzielle Wachstumsgeschwindigkeit auf Medium mit Salzstress bzw. Zuckerstress festgestellt: $\Delta Mohik1$ kann auf Medium mit Salzstress besser wachsen als $\Delta Mosln1$, im Gegensatz dazu kann $\Delta Mosln1$ auf Medium mit Zuckerstress besser wachsen als $\Delta Mohik1$. Die Wachstumsgeschwindigkeit der Doppel-Mutante $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$, in der die beiden sensorischen HKs MoHik1p und MoSln1p inaktiviert sind, ist sowohl bei Salzstress als auch bei Zuckerstress stark reduziert. Dies führte zur Hypothese, dass MoHik1p und MoSln1p als spezifische Sensoren für Zucker- bzw. Salzstress fungieren, bei Zuckerstress oder Salzstress also ein jeweils entsprechendes HOG-Signalweg-abhängiges Signal auslösen, und somit eine jeweils spezifische physiologische zelluläre Antwortreaktion initiieren (Jacob *et al.*, 2014). Ob und wie es eine differenzielle Signalweiterleitung im HOG-Signalweg geben kann, ausgelöst durch MoSln1p oder MoHik1p als putative spezifische Sensoren für Salzstress bzw. Zuckerstress, wurde bisher nicht untersucht.

Eine genetische Inaktivierung der einzigen sensorischen HK Sln1p in *S. cerevisiae* ist letal. Grund dafür ist eine Störung der Phosphatgruppenübertragung im Phosphorelaysystem, was eine unphysiologische Hyperaktivierung der nachgeschalteten MAPK-Kaskade des HOG-Signalwegs zur Folge hat und schließlich zum Zelltod führt (Ota und Varshavsky, 1993; Ostrander und Gorman, 1999). Da in *M. oryzae* hingegen jedoch eine Doppel-Inaktivierung beider bekannter HKs im HOG-Signalweg möglich ist, deutet dies darauf hin, dass neben MoSln1p und MoHik1p noch weitere Komponenten in der Aufrechterhaltung des Phosphorylierungsmusters im Phosphorelaysystem beteiligt sein müssen. Interessante Kandidaten in diesem Zusammenhang sind die Genprodukte der weiteren 8 identifizierten Gene, welche HKs kodieren (Jacob *et al.*, 2014).

In *S. cerevisiae* kann eine genetische Inaktivierung der HK Sln1p durch Überexpression von Hog1p-dephosphorylierenden Phosphatasen ermöglicht werden. Durch eine somit verstärkte

Dephosphorylierung von Hog1p kann eine durch genetische Inaktivierung von Sln1p ausgelöste Hyperaktivierung des Signalwegs verhindert werden – die entsprechende Doppel-Mutante ist vital (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Die Aktivität von Hog1p-interagierenden Phosphatasen ist also essentiell für die Signaltransduktion im HOG-Signalweg und somit auch für eine Beendigung einer HOG-Signalweg-vermittelten zellulären Antwortreaktion.

1.3.4 Proteinphosphatasen

Die Signalübertragung im Phosphorelaysystem und der MAPK-Kaskade des HOG-Signalwegs ist durch Phosphatgruppenübertragungen bzw. Phosphorylierungen gekennzeichnet. Phosphorylierung und Dephosphorylierung gehören zu den wichtigsten molekularen Modifikationen, welche zelluläre Signalwege ein- oder ausschalten, oder sogar ihren Intensitätsgrad regulieren (Dickman und Yarden, 1999). Für eine differenzierte Regulation der Signalintensität, sowie für eine Unterbrechung bzw. Beendigung der Signalübertragung ist eine Dephosphorylierung von dual phosphorylierten MAPK essentiell. Dies wird durch spezifische MAPK-Phosphatasen sichergestellt. (Kojima *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007).

Phosphatasen spielen eine Schlüsselrolle bei der Osmoregulation, da die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der MAPK Hog1p als wesentlich für die Regulierung der nukleären Translokation der MAPK angesehen wird (Reiser *et al.*, 1999). In *S. cerevisiae*, transloziert Hog1p nach Phosphorylierung der beiden Aminosäuren Threonin174 und Tyrosin176 in den Zellkern. Im Laufe der zellulären Adaptation an hyperosmotische Bedingungen wird Hog1p dephosphoryliert, was zum Rücktransport der inaktivierten MAPK ins Zytosol führt. Experimentelle Untersuchungen in Hefe bewiesen, dass die Phosphatasen Ptc1p, Ptp2p und Ptp3p die MAPK Hog1p durch Dephosphorylierung negativ regulieren (Warmka *et al.*, 2001; Mapes und Ota, 2004; Wurgler-Murphy *et al.*, 1997), sowie auch – allerdings in geringerem Ausmaß – die Phosphatasen Ptc2, Ptc3 und Ptc4 (Young *et al.*, 2002; Shitamukai *et al.*, 2004; Saito und Tatebayashi, 2004).

Trotz ihrer generellen großen Bedeutung in der Regulation von wichtigen zellulären Signalwegen, die in Stressreaktionen, Entwicklungsprozessen und Pathogenität involviert sind, wurden MAPK-Phosphatasen und ihre Beteiligung innerhalb des HOG-Signalwegs in filamentösen Pilzen bisher nicht detailliert untersucht. Lediglich durch Charakterisierung von lof-Mutanten der zu Ptp2p und Ptp3p bzw. Ptc1p homologen MAPK-Phosphatasen in *Botrytis cinerea* bzw. in *Aspergillus fumigatus* konnte eine Beteiligung der entsprechenden Genprodukte in der Osmoregulation beschrieben werden (Yang *et al.*, 2013a; Winkelströter *et al.*, 2015).

Der Einfluss einer gezielten Überexpression von MAPK-Phosphatase-kodierenden Genen auf die Osmoregulation, sowie auf die Suszeptibilität gegenüber HOG-Signalweg-modulierenden Fungiziden wie Fludioxonil, wurde hingegen bisher nicht untersucht. Mit diesem Hintergrund stellt sich jedoch die Frage, ob die durch Fludioxonil ausgelöste Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs in filamentösen Pilzen durch eine Überexpression von Hog1p-interagierenden Phosphatasen verhindert werden kann. Könnte somit die Sensitivität einer entsprechenden Phosphatase-Überexpressionsmutante gegenüber Fludioxonil herabgesetzt bzw. eine Resistenz generiert werden?

1.4 *Magnaporthe oryzae* als Modellorganismus für phytopathogene filamentöse Pilze

Die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurden an dem phytopathogenen, filamentösen Ascomycet *M. oryzae* durchgeführt. Das anamorphe, pflanzenpathogene Stadium *Pyricularia oryzae* befällt seine Wirtspflanzen, vor allem Reis, Gerste, Mais und Weizen (Zellerhoff *et al.*, 2006; Islam *et al.*, 2016), unter subtropischen klimatischen Bedingungen mit einer Luftfeuchtigkeit von > 90 % und einer Temperatur von 26–28 °C (Talbot, 2003). Bei Kontakt einer Konidie mit Wasser beginnt sich ein Keimschlauch zu bilden, gefolgt von der Ausdifferenzierung einer kugelförmigen Infektionsstruktur, dem Appressorium. Während dieser Ausdifferenzierung wird osmotisch aktives Glycerol aus Lipidtröpfchen gebildet und zu einer Konzentration von mehr als 3 M im Appressorium akkumuliert (Thines *et al.*, 2000). Ein osmotischer Gradient zur Umgebung entsteht, woraufhin Wasser in das Appressorium einströmt und sich ein hoher Turgordruck von bis zu ca. 80 bar aufbaut, der es dem Pilz ca. 24 Stunden nach Beginn des Keimungsprozesses ermöglicht, mittels mechanischer Kraft in die Pflanzenzelle einzudringen und somit schließlich die Wirtspflanze zu infizieren und zu kolonisieren (Howard und Valent, 1996; Tucker und Talbot, 2001; Loehrer *et al.*, 2014; Talbot, 2003; Sakulkoo *et al.*, 2018).

Der Reisbranderreger *M. oryzae* ist fakultativ pathogen. Eine damit verbundene einfache und stabile Kultivierbarkeit des Pilzes auf artifiziellen Medien, sowie die Tatsache, dass effiziente Transformationssysteme für eine genetische Manipulation verfügbar sind, machen *M. oryzae* zu einem geeigneten Modellorganismus, stellvertretend für filamentöse, phytopathogene Pilze. Des Weiteren besitzt *M. oryzae* einen haploiden Chromosomensatz, das Genom ist sequenziert und mittlerweile ist die 8. Annotation verfügbar und über die Datenbank des JGI frei zugänglich (Dean *et al.*, 2005; Jeon *et al.*, 2007, Nordberg *et al.*, 2014; <https://genome.jgi.doe.gov/Maggr1/Maggr1.home.html>). Wissenschaftlich und wirtschaftlich ist *M. oryzae* einer der bedeutendsten phytopathogenen Pilze weltweit (Dean *et al.*, 2012).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse zur Erweiterung des Verständnisses der spezifischen Signaltransduktion bei der osmotischen und fungizidabhängigen Stressantwort in phytopathogenen Pilzen zu erlangen. Als Untersuchungssystem wurde dabei der Modellorganismus und fakultativ pathogene Ascomycet *Magnaporthe oryzae* gewählt.

Zum einen sollten in der aktuellen Literatur diskutierte Fragestellungen zu molekularen Mechanismen der Wirkungsweise des Fungizids Fludioxonil adressiert werden. Dabei sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Perzeption, Signaltransduktion und zellulären Antwortreaktion bei hyperosmotischem Stress und Fludioxonil-Stress mit Hilfe von molekularbiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Methoden sowie der Analyse des Metaboloms herausgearbeitet werden.

Zum anderen sollte die Hypothese einer differenziellen Funktion von in der Signaltransduktion beteiligten Sensorproteinen zur spezifischen Erkennung von Salzstress bzw. Zuckerstress in *Magnaporthe oryzae* überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Wasser

Für molekularbiologische und chromatographische Arbeiten wurde autoklaviertes, ultrafiltriertes Reinstwasser H_2O_{UF} verwendet (Milli-Q[®] Synthesis, Quantum[®] EX, Q-Gard[®] 2, Millipore GmbH, Schwalbach). Für die Isolierung von RNA wurde RNase-freies Wasser eingesetzt (H_2O_{RF} , Invitrogen GmbH, Darmstadt). Für alle anderen Arbeiten sowie für Medien, Puffer und Lösungen wurde entionisiertes Wasser H_2O_{DE} verwendet (Seradest SD 2000, SERAL-Reinstwasser-Systeme GmbH, Ransbach-Baumbach).

2.1.2 Lösungsmittel

Acetonitril	Scharlau Chemie A.S., Barcelona, Spanien
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EtOH	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
MeOH	Merck KGaA, Darmstadt
Dichlormethan	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.1.3 Säuren und Laugen

HCl	Merck KGaA, Darmstadt
KOH	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.4 Antibiotika

Blasticidin	Invivogen, San Diego, USA
Cefotaxim-Natrium	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Fludioxonil	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glufosinamatmonium (Basta [®])	Bayer CropScience Deutschland GmbH, Langenfeld
Hygromycin B (HygroGold [™])	Invivogen, San Diego, USA
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rifampicin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Streptomycinsulfat	Merck KGaA, Darmstadt

2.1.5 Medienbestandteile und Chemikalien

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

Bacto™ Casamino Acids	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Pepton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Trypton	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Biozym Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	RdH Laborchemikalien GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CSPD	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Difco™ Agar	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Difco™ Potato Dextrose Broth	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Digoxigenin-11-dUTP (alkali lable)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Molecular Weight Marker III	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dNTP's	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glukose	SHS, Gesellschaft für Klinische Ernährung GmbH, Heilbronn
H ₃ BO ₃	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Hefeextrakt Typ 695	Hartge Ingredients GmbH & Co. KG, Hamburg
Hoechst 33258	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
KCl	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Magermilchpulver Bio	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Orange Loading Dye	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SDS	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Sorbitol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris/Glycine/SDS-Laufpuffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

2.1.6 Arbeitsmaterial

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

Bonater[®]

Einheitserde Typ ED-73	Balster Einheitserdewerk GmbH, Fröndenberg
Expositionskassette (X-Ray-Cassette)	Rego X-Ray GmbH, Augsburg
Filtrierpapiere (MN615)	Macherey-Nagel, Düren
Glukose-Teststreifen DiaburTest [®] 5000	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Kordelzugbeutel Rotilabo [®]	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Myracloth	Calbiochem, San Diego, USA
Nitrozellulose-Filter NC45ST, Ø 47 mm, 0,45 µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Röntgenfilm CL-X Posure [™]	Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Sterilfilter (Syringe Filter 0,2 µm)	VWR International GmbH, Darmstadt
PVDF transfer membrane	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Transfermembran Roti [®] Nylon Plus	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

2.1.7 Lösungen und Puffer

2.1.7.1 Lösungen und Puffer für die Southern Blot Analyse

Alle Angaben beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf ein Endvolumen von 1 l H₂O.

Antikörperlösung (Anti-Digoxigenin-AP)

Anti-Digoxigenin-AP	1,5 µl
Blocking-Puffer	ad 20 ml

Blocking-Puffer

Magermilchpulver	1,5 g
Maleinsäure-Puffer	100 ml

Denaturierungslösung

NaCl	46,8 g
NaOH	16,0 g

Denhardt's Lösung (100x)

Ficoll® 400	20,0 g
PVP	20,0 g
BSA, Fraktion V	20,0 g

Detektionspuffer (pH 9,5)

NaCl	5,8 g
Tris	12,1 g

Der pH-Wert von 9,5 wurde mit 1 M HCl eingestellt.

Hybridisierungspuffer

Denhardt's Lösung	50,0 ml
SDS-Lösung (10 %)	50,0 ml
SSPE-Puffer (20x)	300 ml

Neutralisierungspuffer (pH 7,6)

NaCl	87,7 g
Tris	60,6 g

Der pH-Wert von 7,6 wurde mit 32 % HCl *p. a.* eingestellt.

Maleinsäurepuffer (pH 7,5)

Maleinsäure	11,6 g
NaCl	8,8 g

Der pH-Wert von 7,5 wurde mit 10 M NaOH eingestellt.

SDS-Lösung (10 %)

SDS	100,0 g
-----	---------

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

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	8,2 g
NaCl	210,0 g
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	27,6 g

Der pH-Wert von 7,4 wurde mit 10 M NaOH eingestellt.

SSPE-Puffer (0,2x) + 0,1 % SDS

SDS-Lösung (10 %)	10,0 ml
SSPE-Puffer (20x)	10,0 ml

SSPE-Puffer (2x) + 0,1 % SDS

SDS-Lösung (10 %)	10,0 ml
SSPE-Puffer (20x)	100,0 ml

Waschpuffer

Maleinsäure-Puffer	100 ml
Tween [®] 20	500 µl

2.1.7.2 Sonstige Lösungen und Puffer

Alle Angaben beziehen sich, falls nicht anders angegeben, auf ein Endvolumen von 1 l H₂O.

Acetosyringon-Lösung (100 mM)

Acetosyringon	196 mg
DMSO	ad 10 ml

K-Puffer

K ₂ HPO ₄	200,0 g
KH ₂ PO ₄	145,0 g

MN-Puffer

MgSO ₄ x 7 H ₂ O	30,0 g
NaCl	15,0 g

Nitratsalz-Lösung (20x)

NaNO ₃	120,0 g
KCl	10,4 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10,4 g
KH ₂ PO ₄	30,4 g

Spurenelement-Lösung (pH 6,5 (1000x))

CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,7 g
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,6 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	5,0 g
H ₃ BO ₃	11,0 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	5,0 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	50,0 g

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	1,5 g
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	22,0 g

Die Komponenten lösen sich erst bei einer Erwärmung auf $> 50^\circ\text{C}$. Der pH-Wert von 6,5 wurde mit KOH eingestellt.

TAE-Puffer 50x (pH 8)

Tris	242,2 g
$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{ H}_2\text{O}$	18,6 g

Der pH-Wert von 8,0 wurde mit CH_3COOH p.a. eingestellt.

Thiamindichlorid-Lösung (1 %)

Thiamindichlorid	10,0 g
------------------	--------

2.1.8 Kulturmedien

Die Kulturmedien wurden vor Gebrauch ca. 30 min bei einer Temperatur von ca. 120°C und einem Druck von ca. 1,8 bar autoklaviert. Für Festmedien wurde zuvor 2 % Agar zugegeben. Der angegebene pH-Wert wurde mit HCl bzw. mit NaOH eingestellt. Waren die Medien mit Antibiotika oder anderen Stammlösungen versetzt, wurden diese nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf $< 50^\circ\text{C}$ steril zugegeben. Die Angaben beziehen sich jeweils auf ein Gesamtvolumen von 1 l H_2O .

AI-Medium (*Agrobacterium tumefaciens* Induktions Medium)

CaCl_2 -Lösung (1 %)	1,0 ml
Biotin-Lösung (0,01 %)	1,0 ml
FeSO_4 -Lösung (0,01 %)	10,0 ml
Glukose-Lösung (20 %)	5,0 ml
Glyzerin-Lösung (50 %)	10,0 ml
MES-Lösung (1 M)	40,0 ml
NH_4NO_3 -Lösung (20 %)	2,5 ml
Spurenelement-Lösung	5,0 ml
K-Puffer	0,8 ml
MN-Puffer	20,0 ml

Die Medienbestandteile wurden sterilfiltriert und 900 ml autoklaviertes, auf Raumtemperatur abgekühltes H_2O zugegeben. Wurde AI-Medium als Festmedium benötigt, erfolgte vor dem Autoklavieren die Zugabe von 2 % granuliertem DifcoTM Agar. Nach Abkühlen auf $< 50^\circ\text{C}$ wurden zusätzlich 2 ml einer 100 mM Acetosyringon-Lösung zugegeben.

Komplettmedium (CM, pH 6,5)

Bacto™ Casamino Acids	1,0 g
Hefeextrakt <i>Typ 695</i>	1,0 g
Bacto™ Pepton	2,0 g
Glukose	10,0 g
Nitratsalz-Lösung (20x)	50,0 ml
Spurenelementlösung	1,0 ml

LB-Medium (pH 7,4)

Bacto™ Trypton	10,0 g
Bacto™ Yeast Extract	5,0 g
NaCl	5,0 g

LB+Kanamycin

Kanamycin	60 mg
-----------	-------

LB+Rifampicin

Rifampicin	60 mg
------------	-------

LB+Rifampicin+Kanamycin

Kanamycin	60 mg
Rifampicin	60 mg

Minimal-Medium (MM) (pH 6,5)

Biotin-Lösung (0,01 %)	250 µl
Nitratsalz-Lösung (20x)	50 ml
Spurenelement-Lösung	1,0 ml
Thiamindichlorid-Lösung	1,0 ml
Glukose	1,0 g

MM+Cefotaxim+Blasticidin+Streptomycin

Cefotaxim-Natrium	350 mg
Blasticidin	30 mg
Streptomycin	200 mg

MM+Cefotaxim+Glufosinatummonium+Streptomycin

Cefotaxim-Natrium	350 mg
Glufosinatummonium (Basta®)	100 mg
Streptomycin	200 mg

PDA-Medium (PDA)

Potatoe Dextrose Broth	24,0 g
------------------------	--------

PDA+Cefotaxim+Hygromycin+Streptomycin

Cefotaxim-Natrium	350 mg
Hygromycin	400 mg
Streptomycin	200 mg

2.1.9 Verwendete Mikroorganismen*Agrobacterium tumefaciens*

Stamm: *A. tumefaciens* AGL1 (BAA-101), (ATCC, Manassas, USA)

Genotyp: AGL0 *recA::bla pTlBo542deltaT Mop+ CbR* [50648] (Lazo *et al.*, 1991)

Escherichia Coli

Stamm: NEB® 10-beta *E. coli*, (New England Biolabs (NEB), Ipswich, USA)

Genotyp: $\Delta(\text{ara-leu})$ 7697 *araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)*

Magnaporthe oryzae (*Pyricularia oryzae*)

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

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm handelt es sich um den Wildtyp-Stamm *Magnaporthe oryzae* 70-15 (fortlaufend als *MoWT* bezeichnet). Er diene als Grundlage aller molekularbiologischen Arbeiten, der Isolation von genomischer DNA, für Transformationsversuche, sowie als Referenz für die Southern Blot Analyse.

MoEF1::GFP sowie die "loss of function"-Mutanten (lof-Mutanten) Δ *Mohog1*, Δ *Mopbs2*, Δ *Mosk2*, Δ *Mosk1*, Δ *Moypd1*, Δ *Mohik1*, Δ *Mosln1* und Δ *Mohik1*/ Δ *Mosln1* als Ausgangsstämme für Transformationen sowie zur Charakterisierung wurden von Dr. Stefan Jacob (IBWF gGmbH, Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Reaktionskits

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die nachfolgend aufgelisteten Reaktionskits nach Herstellerangaben verwendet, falls nicht anders angegeben.

DNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden
GeneJET [™] Plasmid Miniprep Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
iScript [™] One-Step RT-PCR Kit with SYBR [®] Green	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NEBuilder [®] HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments	NEB, Ipswich, USA
NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Phototope [®] -HRP Western Blot Detection System	Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA
RNase-free DNase-Set	Qiagen, Hilden
RNeasy [®] Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden

2.1.11 Enzyme

Die hier aufgelisteten Enzyme wurden, falls nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

DreamTaq [™] DNA Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
FastDigest [®] Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Lysing Enzymes von <i>Trichoderma harzianum</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Phusion [®] Hot Start High Fidelity DNA Pol Restriktionsendonukleasen	Finnzymes, Vantaa, Finland MBI Fermentas, St. Leon-Rot / NEB, Ipswich, USA
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.12 Plasmide

Die hier aufgelisteten Plasmide wurden für die molekularbiologischen Arbeiten verwendet. Die jeweiligen Sequenzen und weitere Informationen sind den Herstellerangaben bzw. den Literaturverweisen zu entnehmen.

<i>pCAMBIA 0380</i>	(CAMBIA, Canberra, Australien)
<i>pCAMB+BAR</i>	(Kramer <i>et al.</i> , 2009)
<i>pCB1525</i>	(Sweigard <i>et al.</i> , 1997)
<i>pSJ+GFP</i>	(Bohnert <i>et al.</i> , 2018a)
<i>pSJ+GFP(BAR)</i>	(Bohnert <i>et al.</i> , 2018a)
<i>pSJ+GFP(BSD)</i>	(Bohnert <i>et al.</i> , 2018a)

2.1.13 Antikörper

Die hier aufgelisteten Antikörper wurden, falls nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

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

2.1.14 Primer

Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Nukleotidsequenzen von Überhang-Oligonukleotiden (Sequenzen mit Kleinbuchstaben, Tab. 1) wurden mit Hilfe des Programm „NEBuilder“ der Firma NEB (Ipswich, USA; <http://nebuilder.neb.com/>, Stand 2014) erstellt. Anlagerungstemperaturen für diese Oligonukleotide wurden entsprechend den komplementären Bereichen von dem Programm „NEBuilder“ berechnet.

Zur Ermöglichung einer homologen Rekombination im Verlauf der Transformation von *M. oryzae* wurden die Primer-Paare so gewählt, dass die Amplifikate an beiden Enden flankierende Regionen von 800–1000 bp neben dem zu ersetzenden Gen haben. Das Primer-Paar *00912_DIG_fwd/rev* zur Herstellung einer Digoxigenin (DIG)-markierten DNA-Sonde wurde so gewählt, dass die Sonde eine Größe von 400 bp hatte.

Tab. 1: Primer. Die Oligonukleotidsequenzen sind jeweils vom 5'-Ende zum 3'-Ende angegeben. Überhang-Oligonukleotide für eine korrekte Anlagerung während der Gibson Assemblierungsreaktion sind in Kleinbuchstaben angegeben, zum jeweiligen Template komplementäre Bereiche in Großbuchstaben.

Name	Sequenz (5'→ 3')
<i>Mo00912-for</i>	gagagcaccacaaaccgcccacccctgcaatgtggagccacccgcagttcgaaaagGAGCGCTTTTCCAAATTCCGCCGG
<i>Mo00912-rev</i>	agccgggcgccgctttactgtttCTATTGCCCAACGAAGGGATCGCCC
<i>00912-flank1-for</i>	aattcctaggccaccatgttgggccGACTTGCTAGATATCACAGGGCGAGACAAGC
<i>00912-flank1-rev</i>	aatatcatcttctgtcCTCGAAGAGGGCGCGCTTCAACGTA
<i>BAR-for</i>	cgcctcttcgagGACAGAAGATGATATTGAAGGAGCACTTTTTGG
<i>BAR-rev</i>	atctggttctgctCGACCTAAATCTCGGTGACGGGCAG
<i>00912-flank2-for</i>	gagatttaggtcgAGCAGAACCAGATCGGTTGGGAGCT
<i>00912-flank2-rev</i>	cacgtgtgtgtgtgtgtgtgtagcgtaacaACCCTCCTTTACTTTTCCTCATGCCG
<i>00912_DIG_for</i>	GATGACGACTGCGCCATGCC
<i>00912_DIG_rev</i>	GGCCTCTAGGCGCCCAAC

<i>MoHOG1-for(a)</i>	aattaacgccgaattaattcctagccaccatgttgggccGACCTGTGCGAGCCCATCTTCTCCAACGCA
<i>MoHOG1-rev(a)</i>	tcctcgcccttgctcaccatTTGGCCGGTAAACTGGTCGTCCATCTGTTG
<i>MoHOG1-term-for</i>	actcacggcatggacgagctAAGAAAAGAAAAACGCCTTGGCGCGAGGCA
<i>MoHOG1-term-rev</i>	aaagtgtccttcaatatcatcttctgtcgacggatccccACGCCTGAGCTCCGAAAGAGTATCCACTGTAATTAC
<i>MoEF1-for(a)</i>	gcgcaacaaaggattgacaatctccccGTCGACTGAGAGCGAGAAAAAAACTCTTC
<i>MoEF1-rev(a)</i>	cgaattccgcatGGTGGCGGTTTGGTGCTCTCTTTTGTAT
<i>eGFP-for</i>	acgaccagtttaccggccaaATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG
<i>eGFP-rev</i>	caaggcggtttcttcttAGCTCGTCCATGCCGTGAGTGATCCCGGCG
<i>MoHOG1-for(b)</i>	ccaaaccgccaccATGGCGGAATTCGTGCGGGCCCAGATCT
<i>MoHOG1-rev(b)</i>	cgcccttgctcacTTGGCCGGTAAACTGGTCGTCCATCTGTTG
<i>eGFP-NOS-for</i>	gtttaccggccaaGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCG
<i>eGFP-NOS-rev</i>	tattttatttctctctgttccGATCTAGTAACATAGATGACACCGCGCGCG
<i>MoHOG1_screen_for</i>	TGTGGTACACAGGGATCTG
<i>MoHOG1_screen_rev</i>	GACCTCATACTCTGCATCTC
<i>BSD-for</i>	gggtggacggcgaggtcgccggcatcgccacgcggCGAAGAAGATGATATTGAAGGAGCACTTTTGGG
<i>BSD-rev</i>	acacgtggtggtggtggtggtgctagcgtaacaCCCGGGCTGCAGTACCATCAACTC
<i>MoEF1-for(b)</i>	tcctagggccaccatgttgggccccCTGAGAGCGAGAAAAAAACTCTTCGTCG
<i>MoEF1-rev(b)</i>	ctccacatcctgcaggGTGGCGGTTTGGTGCTCTCTTTTGTATGAT
<i>RT-tubulin-for</i>	GACCGCCACCTCCGTTGTTG
<i>RT-tubulin-rev</i>	CGGGGAGTAGGCGACCAGAG
<i>RT-MGG_00912-for</i>	CTGCGCGGTTTCTCTAC
<i>RT-MGG_00912-rev</i>	CACTTCCAGTGCTCCTG

2.1.15 Software

Datenbanken

Die zur Amplifikation und Inaktivierung der ausgewählten Gene von *M. oryzae* benötigten Sequenzinformationen wurden der Datenbank des Joint Genome Institute entnommen (Nordberg *et al.*, 2014) (<https://genome.jgi.doe.gov/Maggr1/Maggr1.home.html>, Annotation *M. oryzae* 70-15 MG8, Stand 2015).

Mit den zugehörigen Aminosäuresequenzen wurden Homologievergleiche in den Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information, 2016) unter Verwendung des Tools „BLASTp“ (BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, p: protein sequences) durchgeführt.

Programme und Dokumentation

Zur Bearbeitung von DNA-Sequenzen und zum Primerdesign wurden das Programm EditSeq aus dem Softwarepaket Lasergene® (DNASTAR, Madison, USA) verwendet. Die grafische Darstellung von DNA erfolgte mit Hilfe des Programms pDRAW32 (Kjeld Olesen, AcaClone Software). Um Primer für die Konstruktion von Plasmiden zu erstellen wurde das Programm „NEBuilder“ (NEB, Ipswich, USA; <http://nebuilder.neb.com/>, Stand 2014) verwendet. „CFX Manager™ 2.1“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurde genutzt, um die Rohdaten der quantitativen RT-PCR Experimente umzurechnen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA aus *Magnaporthe oryzae*

M. oryzae Flüssigkulturen wurden in 50 ml CM-Medium bei 26 °C und 120 Upm für 3–4 Tage in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Anschließend wurde das Myzel mittels Vakuumflasche über Filtrierpapier mit einem Büchnertrichter von der Kulturbrühe separiert, lyophilisiert und in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörst. Die Isolierung genomischer DNA aus dem pulverisierten Myzel wurde mit Hilfe des DNeasy® Plant Mini Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.2 Isolierung von RNA aus Myzel von *Magnaporthe oryzae*

Die Isolierung von RNA aus dem Myzel von *M. oryzae* erfolgte analog zu der Isolierung genomischer DNA. Nach Anzucht der Kulturen wurde das Myzel nach der Separation von der Kulturbrühe sofort in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörst und die RNA-Isolierung mittels des „RNeasy® Plant Mini Kit“ und unter Verwendung des „RNase-free DNase-Set“ gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.3 Isolierung von Plasmid DNA aus *Escherichia coli*

Zur Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* wurde eine Schüttelkultur von 5 ml bei 37 °C und 220 Upm über Nacht in dem entsprechenden Selektionsmedium inkubiert. Die Isolierung von Plasmid DNA für analytische Zwecke erfolgte mittels des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers.

2.2.1.4 Bestimmung der Konzentration und Qualität von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten Nukleinsäuren wurde das NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies, Rocky River, USA) genutzt. Die Messung erfolgte durch UV/VIS Spektroskopie nach Angaben des Herstellers. 1,25 µl Probevolumen wurden jeweils eingesetzt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.2.1 PCR zur Amplifikation von DNA

Die PCR wurde genutzt, um Amplifikate der gewünschter Gensequenzen von Plasmiden und aus genomischer DNA von *M. oryzae* herzustellen. In Standardreaktionsansätzen wurden die Phusion® Hot Start High Fidelity DNA Polymerase im mitgelieferten Puffersystem sowie das GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) verwendet.

Standard PCR-Reaktionsansatz

PCR-Puffer mit MgCl ₂ (25 mM) (10x)	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Primer forward (5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer reverse (5 pmol/µl)	2,5 µl
Template-DNA (ca. 100 ng/µl)	1,0 µl
Phusion® Hot Start High Fidelity DNA Pol	1,0 µl
H ₂ O	ad 50,0 µl

Zu Beginn wurde die Denaturierung der genomischen Template-DNA einmalig für 3 min bei 98 °C durchgeführt. Danach folgten 35 Zyklen Denaturierung (30 s), Anlagerung und Elongation.

Die Anlagerungstemperatur wurde jeweils etwa 2 °C unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur des Primerpaares durch den Hersteller gewählt. Die Elongationszeit bei 72 °C richtet sich nach der Größe des Produkts bzw. nach der Größe des zu amplifizierenden Abschnitts der Template-DNA. Je kb erwarteter Produktgröße wurden 30 Sekunden elongiert. Nach 35 Zyklen erfolgte eine terminale Elongationsphase von 5 min.

2.2.2.2 Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Der generierte Vektor *pCAMB-PTP2-BAR* diente als Template-DNA für die Amplifikation einer DIG-markierten DNA-Sonde für die Southern Blot Hybridisierungsexperimente. Hierbei wurde die DNA in einer PCR durch den Einbau DIG-konjugierter Nukleotide markiert. Diese Markierung ließ sich bei der Detektion im Verlauf der Southern Blot Analyse mittels spezifischer Antikörper nachweisen.

PCR-Reaktionsansatz zur Herstellung DIG-markierter DNA-Sonden

PCR-Puffer mit MgCl ₂ (25 mM) (10x)	5,0 µl
dNTPs (10 mM)	1,0 µl
Digoxigenin-11-dUTP alkali lable	1,5 µl
Primer forward (5 pmol/µl)	2,5 µl
Primer reverse (5 pmol/µl)	2,5 µl
Template-DNA (ca. 10 ng/µl)	1,0 µl
DreamTaq™ DNA Polymerase	1,0 µl
H ₂ O	ad 50,0 µl

2.2.2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurde mit dem „iScript™ One-Step RT-PCR Kit with SYBR® Green“ gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Template für die cDNA-Synthese wurde aus dem Myzel von *M. oryzae* isolierte RNA von 3 biologischen Replikaten verwendet. Die Experimente wurden am C1000™ Thermal Cycler (CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem mathematischen Modell für die „relative Quantifizierung in real-time RT-PCR Experimenten“ (Pfaffl, 2001). Das in *M. oryzae* konstitutiv exprimierte Gen MGG_06650 (β -Tubulin) wurde als Referenzgen für die relative Quantifizierung verwendet.

2.2.3 Restriktion von Nukleinsäuren

Die folgenden Methoden der Restriktion bakterieller und pilzlicher DNA wurden nach den allgemeinen Vorschriften von Sambrook/Russel (2001) durchgeführt. Die Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers in den entsprechenden Puffern verwendet.

Bei Restriktionen zu Analyse Zwecken wurden 250–500 ng DNA eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1,5 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Bei der Nutzung von FastDigest®-Restriktionsenzymen wurde der Ansatz bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur 15 min inkubiert.

Restriktionsansatz zu Analyse Zwecken

DNA	x μ l (250–500 ng)
Enzympuffer (10x)	2,0 μ l
Restriktionsenzym	1,0 μ l
H ₂ O	ad 20,0 μ l

Bei Restriktionen zu Klonierungszwecken wurde 1,0–1,5 μ g DNA eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug 1,5 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur. Bei der Nutzung von FastDigest®-Restriktionsenzymen wurde der Ansatz bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur 15 min inkubiert.

Restriktionsansatz zu Klonierungszwecken

DNA	x μ l (1,0–1,5 μ g)
Enzympuffer (10x)	10,0 μ l
Restriktionsenzym	3,0 μ l
H ₂ O	ad 100,0 μ l

Bei der Restriktion zur Vorbereitung auf Southern Blot Analysen wurden 10 µg genomischer DNA jeweils von möglichen Deletionsmutanten und von *MoWT* eingesetzt. Die Inkubation erfolgte hier über Nacht bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur.

Restriktionsansatz zur Vorbereitung auf Southern Blot Analysen

DNA	x µl (10 µg)
Enzympuffer (10x)	20,0 µl
Restriktionsenzym	5,0 µl
H ₂ O	ad 200 µl

2.2.4 Dephosphorylierung von Schnittstellen

Nachdem die Vektoren mittels Restriktionsenzym geschnitten wurden, wurden 5 µl der Phosphatase SAP zum Ansatz gegeben und für weitere 10 min inkubiert. Hierbei werden die Enden der Vektorfragmente dephosphoyliert um unerwünschte Religationen zu vermeiden. Danach folgte eine Denaturierung der Enzyme für 15 min bei 65 °C.

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die folgenden Methoden der Gelelektrophorese bakterieller und pilzlicher DNA wurden nach den allgemeinen Vorschriften von Sambrook/Russel (2001) durchgeführt. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Agarosegel (1 % Agarose in 1x TAE-Puffer) in einer entsprechenden Standard-Gelkammer (Bio-Rad, München). Die zu analysierenden Proben wurden mit einer entsprechenden Menge an Orange Loading Dye versetzt und danach bei konstanter Spannung von 80–100 V in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Um die Fragmentgrößen abschätzen zu können, dienten jeweils mindestens zwei Taschen mit GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder als Referenz. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (ca. 5 µg/ml) für 10 Sekunden angefärbt und danach im Wasserbad für ca. 20 min wieder entfärbt. Die Geldokumentation wurde mit dem QUANTUM Geldokumentationssystem Modell 1100 der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) durchgeführt.

2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese wurden die DNA-Fragmente aus PCR-Ansätzen oder Restriktionen aus den Agarosegelen mit einem Skalpell entnommen und mit Hilfe des Reaktionskits „NucleoSpin® Extract II“ nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit auf 70 °C erhitztem H₂O.

2.2.7 Plasmidkonstruktion nach der Methode von Gibson *et al.* (2009)

Die Generierung der Plasmide, die zur Transformation von *M. oryzae* eingesetzt wurden, erfolgte mittels der Gibson-Assembly-Methode unter Verwendung des Programms „NEBuilder“ (NEB, Ipswich, USA; <http://nebuilder.neb.com/>, Stand 2014) für die Erstellung von Primer-Sequenzen und unter Verwendung des Cloning Kits „NEBuilder® HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments“ (NEB, Ipswich, USA) nach Herstellerangaben (<https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/manuale2621.pdf>, Stand 2018). Das Gibson-Assembly ist eine Weiterentwicklung der Methode von Li & Elledge (2007) zum nahtlosen Zusammenfügen von DNA-Fragmenten mit Hilfe überlappender, komplementärer Nukleotidsequenzen und durch die kombinierte Aktivität einer 5'-Exonuklease, einer DNA-Polymerase und einer DNA-Ligase in einer einzigen isothermalen Reaktion (Gibson *et al.*, 2009).

Für die Konstruktion von Plasmiden zur Transformation von *M. oryzae* wurden drei verschiedene Resistenzmarker verwendet. *M. oryzae*-Transformanten wurden unter Verwendung einer Hygromycin-Resistenz (HPT) (Sweigard *et al.*, 1997), Glufosinat-Ammonium-Resistenz (modifiziertes Bialaphos-Resistenzgen, BAR) (Kramer *et al.*, 2009) oder Blastidicin-Resistenz (BSD) (Kimura *et al.*, 1994) selektiert. Die Selektion der gegen Hygromycin resistenten Transformanten erfolgte in PDA mit 300 µg/ml des Antibiotikums, die der gegen Glufosinat-Ammonium resistenten Transformanten erfolgte in MM mit 100 µg/ml des Antibiotikums, und die der gegen Blastidicin resistenten Transformanten in MM mit 30 µg/ml des Antibiotikums.

Das für die Transformation von *M. oryzae* verwendete Plasmid *pMoEF1::PTP2* wurde mit der Gibson Assembly® Klonierungsmethode erzeugt (Gibson *et al.*, 2009). Der *EF1α*-Promoter wurde von *pSJ+GFP* mit den Primern *MoEF1-for(b)/rev(b)* amplifiziert und Fragment 1 benannt. Das Phosphatasegen *MoPTP2* (MGG_00912) wurde mit einer StrepTagII-Sequenz nach dem Startcodon mit den Primern *Mo00912-for/rev* amplifiziert und Fragment 2 benannt. Für die Assemblierung des 11516 bp Plasmids *pMoEF1::PTP2* wurde der *Apal/SpeI*-restringierte Backbone-Vektor *pCAMB-HPT* (Kramer *et al.*, 2009) verwendet und mit den Fragmenten 1 und 2 nach Herstellerangaben ligiert. Das Plasmid *pMoEF1::PTP2* wurde zur Transformation von *MoWT* mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation verwendet um den Mutantenstamm *MoEF1::PTP2* zu generieren.

Für die Generierung der lof-Mutante $\Delta Moptp2$ wurde die kodierende Gensequenz von *MoPTP2* vollständig durch das *BAR*-Gen von *pCB1525* (Sweigard *et al.*, 1997) ersetzt. Die Flankenbereiche von *MoPTP2* wurden mittels PCR aus genomischer DNA von *M. oryzae* unter Verwendung der Primer *00912-flank1-for/-rev* und *00912-flank2-for/-rev* amplifiziert.

Die *BAR*-Sequenz wurde aus *pCB1525* mit den Primern *BAR-for/rev* amplifiziert. Als Backbone-Vektor wurde der *Apal/SpeI*-restringierte *pCambia0380* verwendet. Bei der Assemblierungsreaktion wurde das *BAR*-Gen flankiert von den *MoPTP2*-Flankenbereichen mit dem Backbone-Vektor ligiert. Das 9671 bp Plasmid *pCambia-PTP2-BAR* wurde zur Transformation von *MoWT* mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation verwendet, um die lof-Mutante $\Delta Moptp2$ zu generieren. Die Kontrolle des erwünschten Rekombinationsereignisses in der genomischen DNA von $\Delta Moptp2$ am Locus von *MoPTP2* erfolgte mittels Southern Blot Analyse (2.2.9, Anhang Abb. 23).

Für die Generierung des Plasmids *pMoHOG1::GFP* wurde das *Apal/SmaI*-restringierte Plasmid *pCambia+BAR* als Backbone-Vektor verwendet. Das Gen *MoHOG1* (MGG_01822) inklusive einer 1000 bp nativen Promotorregion, wurde mit den Primern *MoHOG1-for(a)/rev(a)* amplifiziert und als Fragment 1 bezeichnet. Mittels dieser Primer wurde das Stoppcodon von *MoHOG1* entfernt um nach Assemblierung eine Fusion des Gens *MoHOG1* mit dem Gen *eGFP* zu erzielen. Das *eGFP*-Gen wurde aus dem Plasmid *pSJ+GFP* mit den Primern *eGFP-for/rev* amplifiziert und als Fragment 2 bezeichnet. Die 1000 bp C-terminale Terminatorregion der kodierenden Sequenz von *MoHOG1* wurde aus genomischer DNA mit den Primern *MoHOG1-term-for/rev* amplifiziert und als Fragment 3 bezeichnet. Der mit *Apal/SmaI* restringierte Backbone-Vektor wurde mit den Fragmenten 1, -2 und -3 für die Herstellung des 12056 bp Plasmids *pMoHOG1+GFP(nativ)* nach Anweisungen des Herstellers assembliert. Das Plasmid *pMoHOG1+GFP(nativ)* wurde mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation (2.2.8.4) in *M. oryzae* transformiert. Da GFP-Fluoreszenzsignale in entsprechenden Transformanten nicht stark genug waren, wurde der *EF1 α* Promotor von *M. oryzae* (MGG_03641) N-terminal der *MoHOG1*-Sequenz kloniert, um eine starke Expression von *MoHog1p-GFP* zu erzielen. Dafür wurde das mit *SmaI/Bsu36I* restringierte Plasmid *pMoHOG1+GFP(nativ)* als Backbone-Vektor für eine Klonierung mit der Gibson Assembly[®] Methode verwendet. Der *EF1 α* Promotor wurde von *pSJ+GFP* mit den Primern *MoEF1-for(a)/rev(a)* amplifiziert, um das Fragment 4 zu erhalten. Die kodierende Sequenz von *MoHOG1* wurde aus genomischer DNA von *M. oryzae* mit den Primern *MoHOG1-for(b)/rev(b)*, die das Fragment 5 ergaben, amplifiziert. Mit diesen Primern wurde das Stoppcodon von *MoHOG1* entfernt. Die *eGFP*-Sequenz (ohne Startcodon) mit C-terminalem *NOS*-Terminator wurde von *pSJ+GFP* mit den Primern *eGFP-NOS-for/rev* zu Fragment 6 amplifiziert. Der *SmaI/Bsu36I* restringierte Backbone-Vektor wurde mit den Fragmenten 4, 5 und 6 für die Herstellung des 13046 bp Plasmids *pMoHOG1::GFP(BAR)* gemäß den Anweisungen des Herstellers assembliert. Das Plasmid *pMoHOG1::GFP(BAR)* wurde zur Transformation von *MoWT* und $\Delta Mohik1$, $\Delta Moypd1$, $\Delta Mossk1$, $\Delta Mossk2$, $\Delta Mopbs2$ (Jacob *et al.*, 2015) mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation verwendet,

um die Mutantenstämme *MoHOG1::GFP*, Δ *Mohik1/HOG1::GFP*, Δ *Moypd1/MoHOG1::GFP*, Δ *Mossk1/MoHOG1::GFP*, Δ *Mossk2/MoHOG1::GFP* und Δ *Mopbs2/MoHOG1::GFP* zu generieren. Um die Stämme Δ *Mosln1/HOG1::GFP* und Δ *Mohik1/\Delta**Mosln1/HOG1::GFP* zu erzeugen, deren Ausgangsstämme Δ *Mosln1* und Δ *Mohik1/\Delta**Mosln1* bereits das Selektionsmarkergen *BAR* besitzen (Jacob et al., 2015), wurde das Plasmid *pMoHOG1::GFP(BSD)* erzeugt. Dazu wurde *pMoHOG1::GFP(BAR)* mit *KflI/SpeI* restringiert und als Backbone-Vektor verwendet. Das Gen *BSD* wurde aus dem Plasmid *pSJ+GFP(BSD)* mit den Primern *BSD-for/rev* amplifiziert und mittels der Gibson Assembly®-Klonierungsmethode in das Backbone kloniert, wodurch die Sequenz des Gens *BAR* durch die Sequenz von *BSD* ersetzt und somit das 13532 bp Plasmid *pMoHOG1::GFP(BSD)* generiert wurde. Das Plasmid *pMoHOG1::GFP(BSD)* wurde zur *A. tumefaciens* vermittelten Transformation (2.2.8.4) von Δ *Mosln1* und Δ *Mohik1/\Delta**Mosln1* verwendet.

2.2.8 Transformation

2.2.8.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Kompetente 10-beta *E. coli* Zellen wurden nach Herstellerangaben mittels Hitzeschock transformiert, inkubiert und selektiert („NEBuilder® HiFi DNA Assembly Bundle for Large Fragments“; NEB, Ipswich, USA; <https://www.neb.com/-/media/catalog/datacards-or-manuals/manuale2621.pdf>, Stand 2018). Zur weiteren Analyse der Transformanten wurde von einzelnen Kolonien Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalysen überprüft.

2.2.8.2 Herstellung kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde von einer Glyzerinkultur ein Verdünnungsausstrich auf LB+Rifampicin Festmedium angefertigt und für 2–4 Tage bei einer Temperatur von 28 °C in Dunkelheit inkubiert. Folgend wurden mehrere Kolonien in 5 ml Flüssigmedium LB+Rifampicin überführt und bei 28 °C über Nacht bei 225 Upm inkubiert. Diese Kultur wurde als Inokulum für 500 ml LB-Medium in einem 1000 ml Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen verwendet. Dieser Ansatz wurde bei 28 °C und 220 Upm im Schüttelinkubator bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5–0,8 inkubiert und anschließend 10 min auf Eis gekühlt. Danach wurde der Ansatz bei 4 °C und 4000 Upm 15 min zentrifugiert und das Pellet einmal in 100 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung gewaschen. Nach einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 4000 Upm wurde das Zellpellet in 2,5 ml eiskalter 20 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und Aliquots zu 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, die direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden.

2.2.8.3 Transformation kompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen durch Hitzeschock

Zur Transformation kompetenter *A. tumefaciens*-AGL1-Zellen wurden diese auf Eis angetaut und anschließend mit 500 ng des entsprechenden Expressionsvektors bzw. Inaktivierungsvektors versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 37 °C im Wasserbad für 5 min und eine anschließende Lagerung auf Eis. Es wurden 400 µl LB-Flüssigmedium hinzugefügt, wonach eine Inkubation bei 28 °C und 225 Upm im Schüttelinkubator für 4–6 h erfolgte. Die Zellsuspension wurde auf LB+Rifampicin+Kanamycin-Selektionsmedium zu je 50 µl und 450 µl ausplattiert und in Dunkelheit für 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.8.4 Transformation von *Magnaporthe oryzae* durch *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

Einzelkolonien von transformierten *A. tumefaciens* AGL1 Zellen wurden zur Inokulation einer 5 ml LB+Rifampicin+Kanamycin Flüssigkultur genutzt. Die Inkubation erfolgte bei 28 °C und 225 Upm im Schüttelinkubator. Nach 16 h wurden 1,5 ml der Kultur für 5 min bei 2300 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 750 µl AIM-Flüssigmedium resuspendiert. In ein 10 ml Zentrifugenröhrchen wurden 4 ml AI-Medium steril vorgelegt und die resuspendierte Zellsuspension hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde 6–8 h bei 28 °C und 225 Upm inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden Konidien von *M. oryzae* auf eine Konzentration von 10^5 Konidien/ml in H₂O eingestellt. Diese Konidiensuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension transformierter *A. tumefaciens* AGL1 Zellen vermengt. Für die Transformation des Stammes dMoypd1, welcher keine Konidien ausbildet, wurde Myzel, welches für 2–3 Tage in CM-Flüssigmedium kultiviert wurde, verwendet und analog im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension transformierter *A. tumefaciens* AGL1 Zellen vermengt. Ein Gesamtvolumen von 400 µl wurde auf den Rand eines sterilen Nitrocellulose-Filters auf AI-Festmedium gegeben und nach Trocknung für 48 h bei 28 °C in Dunkelheit inkubiert. Es folgte der Transfer der Nitrocellulosefilter auf Selektionsmedium (PDA+Cefotaxim+Hygromycin+Streptomycin oder MM+Cefotaxim+Glufosinatammonium+Streptomycin oder MM+Cefotaxim+Blasticidin+Streptomycin) und eine weitere Inkubation für 4–6 Tage bei 28 °C. Einzelne vom Rand des Filters gewachsene *M. oryzae*-Transformanten wurden auf Selektionsmedium überführt und bei 28 °C inkubiert. Gut gewachsene Kolonien wurden auf CM überführt.

2.2.9 Southern Blot Analyse

Mit der Southern Blot Analyse nach Green und Sambrook (2012) wurde die korrekte Inaktivierung von *MoPTP2* in Transformanten von *M. oryzae* überprüft. Abweichungen von der Standardmethode sind nachfolgend beschrieben.

2.2.9.1 Isolierung und Fällung genomischer DNA

Genomische DNA von *M. oryzae* wurde, wie zuvor beschrieben, isoliert und ein Restriktionsansatz zur Vorbereitung auf die Southern Blot Analysen durchgeführt. Danach wurden zur Fällung der DNA 20 µl einer 3 M Natriumacetatlösung und 400 µl EtOH *p.a.* zu dem Restriktionsansatz (200 µl) zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei -20 °C für mindestens 1 h inkubiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 11500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete Pellet in 25 µl H₂O aufgenommen.

2.2.9.2 Transfer der Nukleinsäuren auf die Nylonmembran

Die isolierte, restringierte und gefällte genomische DNA aus *M. oryzae* wurde zusammen mit einem DIG-markierten Marker (DIG III, Roche, Mannheim) in einem 1 % Agarosegel bei konstanter Spannung von 90 V aufgetrennt. Nach Auftrennung wurde das Agarosegel zur Depurinierung der DNA 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Anschließend folgte zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA zweimal ein 10-minütiges Schwenken in Southern Blot Denaturierungslösung und danach zweimal 10-minütiges Schwenken in Southern Blot Neutralisierungs-Puffer. Zwischen jedem Pufferwechsel wurde das Agarosegel kurz in H₂O gewaschen.

Der Southern Blot wurde als Kapillar-Blot nach der Standardvorschrift (Green und Sambrook, 2012) aufgebaut. Über Nacht wurden beim Ansaugen des SSPE-Puffers die denaturierten DNA-Fragmente durch Kapillarkräfte aus dem Agarosegel auf die Transfermembran Roti® Nylon Plus übertragen. Anschließend wurde die übertragene DNA mit einem UV-Crosslinker (FLX-20M, Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Frankreich) mit der Nylon-Membran quervernetzt (120 mJ/cm²).

2.2.9.3 Hybridisierung

Die Nylon-Membran wurde für 1,5 h bei 65 °C in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungssofen in 20 ml Hybridisierungs-Puffer mit 40 µl Heringssperma (10 mg/ml) inkubiert. Das Heringssperma wurde zuvor 5 min lang bei 95 °C denaturiert und danach 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Puffer durch 20 ml Hybridisierungs-Puffer, welcher mit 400 ng der DIG-markierten DNA-Sonde gemischt wurde, ausgetauscht. Die DNA-Sonde wurde zuvor 5 min lang bei 95 °C denaturiert und unmittelbar danach 5 min auf Eis abgekühlt. Es folgte die Hybridisierungsreaktion über Nacht bei 65 °C im Hybridisierungssofen. Die Nylon-Membran wurde am nächsten Tag zweimal für 5 min mit 2x SSPE + 0,1 % SDS und anschließend zweimal 5 min mit 0,2x SSPE + 0,1 % SDS bei 65 °C im Hybridisierungssofen gewaschen.

2.2.9.4 Detektion der DNA-Sonde

Die Detektion der gebundenen DIG-markierten DNA-Sonde erfolgte bei RT. Die Nylon-Membran wurde 1 min in 50 ml Wasch-Puffer inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Nylon-Membran für mindestens 30 min in 100 ml Blocking-Puffer inkubiert, der anschließend mit 20 ml Antikörperlösung ausgetauscht wurde. Es folgte eine 30-minütige Inkubationsphase in welcher durch die am Antikörper gebundenen Fab Fragmente die Bindung an die DIG-markierte DNA-Sonde erfolgt. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden durch zwei Waschschrte von 15 min in 50 ml Wasch-Puffer entfernt. Es folgte eine abschließende Inkubation für 3 min in 20 ml Detektions-Puffer. Nach dem Abschütten des Detektionspuffers wurde die Nylon-Membran in eine Kunststoff-Folie (Fisherbrand Polyethylene-bag, Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) gelegt, 1,5 ml CSPD-Lösung zugegeben und diese in der Kunststoff-Folie eingeschweißt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C, wobei die am Antikörper gebundene Alkalische Phosphatase das CSPD unter Freisetzen eines Chemolumineszenzsignals dephosphoryliert. Die verschweißte Folie wurde wieder geöffnet, die CSPD-Lösung wurde komplett ausgestrichen und die Membran wieder eingeschweißt. Anschließend wurde unter Rotlicht die Nylon-Membran in einer Expositionskassette befestigt und ein Röntgenfilm eingelegt, welcher 1 h bei Raumtemperatur belichtet wurde. Die Entwicklung des Filmes erfolgte im AGFA CP-1000 (AGFA Healthcare GmbH, Bonn).

2.2.10 Western Blot Analyse

Die Phosphorylierung der MAPK MoHog1p in *M. oryzae* wurde mittels Western-Blot-Analyse (Burnette, 1981) mit dem monoklonalen Antikörper „Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP™ Rabbit mAB“ und dem „Phototope®-HRP Western Blot Detection System“ untersucht. Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder sowie der im „Phototope®-HRP Western Blot Detection System“ enthaltene Biotinylated Protein Ladder verwendet.

2.2.10.1 Kultivierung, Zellaufschluss und Proteinextraktion

Die *M. oryzae* Stämme wurden als Flüssigkultur in CM inkubiert. Jeweils 250 ml CM wurden mit der gleichen Menge an Myzel (jeweils 4 Rondelle, Ø 4 mm) inokuliert und bei 26 °C und 100 Upm für 72 h in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 1 Schikane kultiviert. In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen für 10 min mit 10 µg/ml Fludioxonil inkubiert. Myzel wurde mit Filterpapier (MN 615, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) von dem Kulturfiltrat abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, in flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver gemörsert und gleiche Mengen an Pulver (150 mg) in 300 µl Laemmli-Puffer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) für 5 min extrahiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C für

5 min bei $12.000 \times g$ wurden die Überstände 10 min bei 99°C erhitzt und je $10\ \mu\text{l}$ in Geltaschen von „10 % Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 12-well, $20\ \mu\text{l}$ “ (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) überführt.

2.2.10.2 SDS-PAGE, Elektroblothing und Detektion

Die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Tris/Glycine/SDS-Laufpuffer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) in einer Mini PROTEAN™-Kammer (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer konstanten Stromstärke von $35\ \text{mA/Gel}$ (maximale Spannung $200\ \text{V}$). Als Größenstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder sowie der im „Phototope®-HRP Western Blot Detection System“ enthaltene Biotinylated Protein Ladder verwendet. Gegebenenfalls wurden identisch beladene Gele im Anschluss an die Elektrophorese mit der „Coomassie Brilliant Blue R-250 Staining Solution“ (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gefärbt und entfärbt um eine äquivalente Proteinkonzentration in den verschiedenen Spuren zu visualisieren.

Mittels elektrophoretischer Übertragung (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) gemäß der Anleitung des Herstellers transferiert. Inkubation der Proteine mit dem primären Antikörper „Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP™ Rabbit mAB“ und den sekundären Antikörpern (HRP-linked anti-rabbit IgG und HRP-linked anti-biotin) sowie die Detektion mittels des „Phototope®-HRP Western Blot Detection System“ erfolgten nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die PVDF-Membran unter Rotlicht in einer Expositionskassette befestigt und ein Röntgenfilm eingelegt. Je nach Signalintensität der Chemolumineszenzreaktion wurde 5–15 min bei Raumtemperatur belichtet. Die Entwicklung des Filmes erfolgte im Entwickler AGFA CP-1000 (AGFA Healthcare GmbH, Bonn).

2.3 Phänotypische Untersuchungen von *Magnaporthe oryzae*

2.3.1 Wachstum auf verschiedenen Festmedien

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Kulturen der Mutantenstämme wurde im Vergleich zur Wachstumsgeschwindigkeit von Kulturen von *MoWT* untersucht, um Hinweise auf mögliche Funktionen der inaktivierten oder überexprimierten Gene bzw. deren Genprodukte zu erhalten. Ausgangsmaterial für die Wachstumstests waren Rondelle ($\varnothing 5\ \text{mm}$) der zu untersuchenden Stämme. Die Inkubation erfolgte auf CM oder MM unter der Zugabe von

den zu untersuchenden Reagenzien in für *MoWT* subletalen Mengen für 10 Tage bei 26 °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h. Diese Tests wurden je dreimal wiederholt und repräsentative Ergebnisse fotografisch dokumentiert (IMX179, Sony).

2.3.2 Herstellung von Konidiensuspensionen

M. oryzae-Kulturen wurden auf CM-Festmediumplatten bei einer Temperatur von 26 °C und einem Hell-/Dunkelrhythmus von 12:12 h kultiviert. Konidien wurden von 9–11 Tage alten *M. oryzae* Kulturen gewonnen, indem sie mit H₂O mit Hilfe eines Glasspatels dispergiert und über zweilagiges Miracloth filtriert wurden. Gegebenenfalls wurden Konidiensuspension für 5 min bei RT mit 2900 x g zentrifugiert, um die Konidiendichte zu erhöhen. Die gewünschte Endkonzentration von 5×10^4 Konidien/ml in H₂O wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer improved, Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) eingestellt.

Die Konidiogenese der in dieser Arbeit generierten Mutantenstämme *MoEF1::PTP2* und $\Delta Moptp2$ wurde mit der von *MoWT* und $\Delta Mohog1$ verglichen. Pro Stamm wurden Triplikate von Konidiensuspensionen ausgehend von jeweils drei auf CM gewachsenen Kulturen hergestellt. Dafür wurden Konidien von einer Fläche von jeweils 50 cm² einer 11 Tage alten, auf CM gewachsenen Kultur, dispergiert. Für die Bestimmung der Konidienproduktion pro cm² Kultur wurde die Konidienzahl für je 3 unabhängige biologische Replikate ermittelt, sowie der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.3.3 Keimungsverhalten und Appressorienbildung

Zur Analyse des Keimungsverhaltens und der Appressorienbildung pro 100 Konidien je untersuchtem *M. oryzae*-Stamm wurden Keimungstests auf hydrophoben Deckgläsern (76 x 51 mm, Nr. 653081, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) in 3 unabhängigen biologischen Replikaten durchgeführt. Dazu wurden Konidiensuspensionen der entsprechenden Stämme hergestellt, jeweils 100 µl auf die Objektträger appliziert und bei 26 °C für 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 24 h erfolgte die mikroskopische Auswertung.

2.3.4 Protoplastentest zur Ermittlung der Zellwandstabilität

Untersuchungen zur Stabilität der Zellwand von *M. oryzae* wurden mit Kulturen durchgeführt, die zuvor in 50 ml CM bei 26 °C und 100 Upm für drei Tage in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert wurden. Nach dem Separieren der Kulturbrühe wurde 1 g Myzel in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Myzel wurde zweimal mit 20 ml einer 20 %-Saccharoselösung gewaschen und dazwischen bei RT für 10 min mit 2900 x g zentrifugiert. Die Lyse der Zellwände wurde mit lytischen Enzymen aus *Trichoderma harzianum* (3 mg/ml Endkonzentration) in 20 ml einer 20 % (w/v)-Saccharoselösung für

60 min auf einem Kippschüttler durchgeführt. Danach wurden die Lysate durch zweilagiges Miracloth filtriert und für 10 min mit 2900 x g zentrifugiert. Die Protoplastenpellets wurden schließlich vorsichtig in 1 ml einer 20 %-Saccharoselösung resuspendiert und die Anzahl der Protoplasten unter dem Mikroskop bestimmt. Drei Wiederholungen mit je drei Replikaten wurden ausgewertet.

2.3.5 Pathogenitätstest auf Reispflanzen

Die Infektionsfähigkeit der *M. oryzae*-Stämme wurde mit Pflanzentests überprüft. Zur Kultivierung von Reispflanzen (*Oryza sativa* Kultivar CO39) wurden jeweils 5 Samenkörner in einem Pflanztopf mit Einheitserde® Typ ED 73 gepflanzt. Die Pflanzen wurden bei 22 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h angezogen.

Konidiensuspensionen wurden mit 0,2 % Gelatine versetzt und 5 ml der Suspension mit einer Sprühflasche auf 21 Tage alte Reispflanzen gesprüht. Danach wurden die infizierten Pflanzen in verschließbaren Kordelzugbeuteln für 120 h bei 28 °C, 90 % Luftfeuchtigkeit und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 16:8 h in einer Pflanzentestkammer inkubiert. Daraufgehend wurden die Läsionen pro Blatt bei den fünf am stärksten infizierten Blättern ausgezählt und dokumentiert. Dreimal wurden je fünf Replikate ausgewertet.

2.3.6 Fluoreszenzmikroskopie mit *Magnaporthe oryzae*

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die Lokalisation der MAPK MoHog1p und die dynamische Lokalisationsänderung als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli *in vivo* in Echtzeit visualisiert werden. Konidiensuspensionen von entsprechenden MoHog1p-GFP-exprimierenden Mutantenstämmen wurden wie in 2.3.2 beschrieben hergestellt und mit zu testenden Reagenzien bzw. Substanzen versetzt. Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Myzel wurden Konidiensuspensionen mit CM versetzt und bei RT für 24–48 h inkubiert. Danach wurden Proben der Kultur entnommen und mit zu testenden Reagenzien bzw. Substanzen versetzt. So induzierte Myzelproben bzw. Kondidien-suspensionen wurden unmittelbar auf Glasobjektträger gegeben und fluoreszenz-mikroskopisch mit dem Mikroskop „Zeiss Axio Imager.M2“ (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen) unter Verwendung der Fluoreszenzlampe „HXP 120 C“ und folgenden Filtersätzen untersucht: Filtersatz 38 HE (High Efficiency) („GFP“) (EX (Excitation) BP (Bandpass) 470/40, FT (Farbteiler) 495, EM (Emission) BP 525/50), Filtersatz 43 HE („RFP/YFP“) (EX BP 550/25, FT 570, EM BP 605/70), Filtersatz 47 HE („CFP“) (EX BP 436/25, FT 455, EM BP 480/40), Filtersatz 49 („DAPI“) (EX G 365, FT 395, EM BP 445/50). Zur Zellkernfärbung wurde Hoechst 33258 (5 µg/ml) 25 min vor Induktion appliziert. Zur Bildaufnahme bzw. Bearbeitung wurde die „CCD-Videokamera MC-3255P“ von Sony und das Programm „AxioVision“ von Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) verwendet.

2.3.7 Analyse intrazellulärer Primärmetabolite

2.3.7.1 Kultivierung und Induktion von *Magnaporthe oryzae* Stämmen

Dafür wurde *MoWT* in 250 ml CMG-Medium (Komplettmedium mit 2 % Glukose) in 500 ml-Erlenmeyerkolben mit 1 Schikane bei 26 °C und 100 Upm kultiviert und 72 h nach Inokulation, in der exponentiellen Wachstumsphase, mit verschiedenen Stimuli behandelt. Es wurde im Rahmen der Methodenetablierung festgestellt, dass nach vollständigem Verbrauch der freien Glukose im Medium intrazellulär fast ausschließlich Trehalose angereichert wurde und dass sich die intrazellulären Konzentrationen der vier o.g. Carbohydrate dann auch nach osmotischem Schock nicht deutlich und nicht wie bei Dixon *et al.* (1999) beschrieben änderten (Daten nicht gezeigt). Das Experiment musste also beendet sein, bevor die freie Glukose im Medium vollständig verbraucht war. Für eine gute und stabile Handhabbarkeit der Probenaufarbeitung musste bei jeder entnommenen Probe ausreichend Myzel vorhanden sein, weshalb die Experimente erst 72 h nach Inokulation gestartet werden konnten – zu einem Zeitpunkt, bei dem die kultivierten Stämme bereits ausreichend Myzel produziert hatten. Da auch ein Wert der intrazellulären Osmolytkonzentrationen 24 h nach Stimulus von Interesse war, wurden die Stämme in CM mit 2 % Glukose statt 1 % Glukose kultiviert, wodurch die Glukose im Medium erst ca. 100–120 h nach Inokulation verbraucht war, und somit gewährt wurde, dass zu jedem Zeitpunkt der Experimente ausreichend freie Glukose vorhanden war. Die Induktion der kultivierten Stämme erfolgte mit Stoffen und Substanzen in 5-facher Konzentration gelöst in einem Volumen von 50 ml H₂O, sodass nach Zufügen dieser 50 ml zu den 200 ml Kultur (250 ml Ausgangskultur minus 50 ml Probeentnahme unmittelbar vor Induktion) im Erlenmeyerkolben zum Zeitpunkt $t = 0$ eine 1-fache Konzentration des entsprechenden Stimulus im Erlenmeyerkolben erreicht wurde. Für die Negativ-Kontrolle wurden die entsprechenden Kulturen mit 50 ml H₂O behandelt. Unmittelbar vor (0 h) sowie 5 h und 24 h nach Induktion der kultivierten Stämme mit verschiedenen Stimuli wurden jeweils 50 ml der jeweiligen 250 ml Kultur steril entnommen, wie in 2.3.7.2 beschrieben aufgearbeitet und die intrazellulären Primärmetabolite mittels HPAEC-PAD (2.3.7.3) bestimmt.

2.3.7.2 Extraktion intrazellulärer Primärmetabolite

Das in den entnommenen Proben (2.3.7.1) enthaltene Myzel wurde durch Filtration mit Hilfe einer Vakuumflasche, einem Büchnertrichter und Filtrierpapier von der Kulturbrühe separiert, zügig mit 3 Volumeneinheiten H₂O (150 ml) gespült, unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach Gefriertrocknung unter Vakuum wurden die Myzeltrockengewichte bestimmt und die Myzelproben anschließend mit jeweils 4 ml eines Gemischs aus Methanol und Dichlormethan 12:5 (v/v) für 30 min bei 37 °C und 220 Upm in

einen Rundschüttler (Orbital Shaker, Thermo Forma, Marietta, USA) inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in Szintillationsfläschchen (Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe) überführt. Die Myzelpellets wurden in 3 ml Methanol:Dichlormethan 12:5 (v/v) aufgenommen und erneut 30 min im Rundschüttler inkubiert, gefolgt von Zentrifugation und Überführen der Überstände in die entsprechenden Szintillationsfläschchen. Nach Trocknung in einem Vakuumrotationsverdampfer (Rotationsverdampfer Heidolph Laborota 4002; SpeedVac Jouan RC 10.11) wurden die Extrakte bei -20 °C gelagert.

2.3.7.3 Quantifizierung von Primärmetaboliten

Die hergestellten Extrakte (2.3.7.2) wurden in je 1 ml H₂O gelöst (sonifiziert) und zentrifugiert (4 °C, 13 000 Upm). Die im Überstand enthaltenen niedermolekularen Substanzen wurden mittels hochleistungsfähiger Anionenaustauschchromatographie analysiert. Sie wurden als Anionen unter hochalkalischen Bedingungen (pH > 12) getrennt und mittels gepulster Amperometrie detektiert (HPAEC-PAD = High-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection).

Die HPAEC-PAD-Analyse wurde an einem Shimadzu LC-System durchgeführt, ausgestattet mit zwei LC-10Ai-Pumpen, einer DGU-20A-Entgasungseinheit, einem SIL-10Ai-Autosampler, einer CBM-20A-Steuerung und einem Säulenofen CTO-20AC. Es wurde eine Anionenaustauschsäule von CarboPac MA1 (4 x 250 mm) in Kombination mit einer Schutzsäule von CarboPac MA1 (4 x 50 mm) bei 20 °C verwendet. Ein elektrochemischer Detektor Dionex ED40 wurde für den Nachweis von Kohlenhydraten und Zuckeralkoholen im gepulsten amperometrischen Modus durch eine Standard-Vierfachwellenform verwendet (t = 0–0,40 s, p = +0,1 V; t = 0,41–0,42 s, p = -2,0 V; t = 0,43 s, p = +0,6 V; t = 0,44–0,50 s, p = -0,1 V). Eine isokratische Elution wurde bei 0,4 ml/min mit 0,48 M NaOH-Lösung als Eluent durchgeführt (wässriges Natriumhydroxid (50 %, w/w) von Merck, Deutschland).

Alle Proben wurden durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl. Lösungen mit Carbohydrat-Standards (Sigma-Aldrich, Deutschland und Carl Roth, Deutschland) wurden mit einer Konzentration von 10 mg/l in H₂O hergestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Phosphatasen als Modulatoren der Osmoregulation

Die Dephosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Hog1p im „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg in *S. cerevisiae* wird von den Hog1p-interagierenden Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen Ptc1p (Phosphatase type Two C), Ptp2p (Protein Tyrosine Phosphatase) und Ptp3p vermittelt (Warmka *et al.*, 2001; Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). In *S. cerevisiae* ist die gezielte Inaktivierung der Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinase (HK) Sln1p im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs nicht möglich, da Abwesenheit von Sln1p in einer Hyperaktivierung der MAPK-Kaskade resultiert. Eine Überexpression von Ptp2p und Ptp3p kann diese Letalität kompensieren. Durch genetische Inaktivierung von Ptp2p und Ptp3p in *S. cerevisiae* wird eine adäquate Dephosphorylierung von Hog1p und somit eine Beendigung der Signalweiterleitung im HOG-Signalweg verhindert (Jacoby *et al.*, 1997). Darüber hinaus sind die Phosphatasen Ptc2p, Ptc3p und Ptc4p als Interaktionspartner von Hog1p beschrieben, jedoch mit vergleichsweise geringem Einfluss auf die Dephosphorylierung von Hog1p (Young *et al.*, 2002; Shitamukai *et al.*, 2004).

Der Einfluss von Phosphatasen auf die Regulation des HOG-Signalwegs sollte in *M. oryzae* untersucht werden. Dabei stand die Frage im Vordergrund, ob Überexpression einer MoHog1p-dephosphorylierenden Phosphatase in *M. oryzae* eine durch das Fungizid Fludioxonil bedingte Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs kompensieren kann und somit als molekularer Mechanismus einer Fludioxonil-Resistenz angesehen werden kann.

Dafür wurden zunächst die zu Ptc1p, Ptp2p und Ptp3p aus *S. cerevisiae* homologen Phosphatasen in *M. oryzae* mittels BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool) identifiziert (Anhang Tab. 3). Da in *S. cerevisiae* durch Manipulation des Phosphatasegens *PTP2* die größten Effekte hinsichtlich einer Modulation des HOG-Signalwegs beobachtet wurden (Jacoby *et al.*, 1997), wurde das homologe Gen *MoPTP2* für die genetischen Überexpressions- und Inaktivierungsstudien in *M. oryzae* ausgewählt.

Mittels *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelter Transformation konnten der lof-Stamm $\Delta Moptp2$ und der Überexpressionsstamm *MoEF1::PTP2* erfolgreich generiert werden. Die Klonierungsstrategien und die Nachweise der genetischen Manipulationen sind in 2.2.7 und im Anhang (Abb. 22, Abb. 23) zu finden. Neben dem hier beschriebenen Überexpressionsstamm *MoEF1::PTP2* wurden weitere Überexpressionsstämme erzeugt, mit jeweils ähnlichem Phänotyp wie *MoEF1::PTP2* (Daten nicht gezeigt). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden nur der Stamm *MoEF1::PTP2* stellvertretend für die anderen Überexpressionsstämme beschrieben.

Im Überexpressionsstamm *MoEF1::PTP2* war eine deutlich erhöhte Transkriptmenge von *MoPTP2* im Vergleich zu *MoWT* festzustellen (Anhang Abb. 22). Für den lof-Stamm $\Delta Moptp2$ konnte eine homologe Rekombination für das Inaktivierungskonstrukt am Locus von *MoPTP2* und somit eine genetische Inaktivierung des putativen Phosphatasegens *MoPTP2* festgestellt werden (Anhang Abb. 23).

Im Folgenden sind die Ergebnisse zu Untersuchungen hinsichtlich einer putativ modulierten Regulation des HOG-Signalwegs in den beiden Mutantenstämmen und eines daraus resultierenden veränderten Phänotyps beschrieben. Als Referenzstämme dienten stets zum einen der osmoresistente und Fludioxonil-sensitive Wildtypstamm *MoWT* und zum anderen der osmosensitive und Fludioxonil-resistente Stamm $\Delta Mohog1$, welche von Dr. Stefan Jacob (IBWF gGmbH, Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt wurden (Jacob *et al.*, 2015).

3.1.1 Überexpression des Phosphatasegens *MoPTP2* führt zu Fludioxonil-Resistenz

Um die Hypothese zu überprüfen, dass *MoPtp2p* die MAPK *MoHog1p* dephosphoryliert und somit die Signalweiterleitung im HOG-Signalweg terminiert, wurde die Sensitivität von *MoWT*, $\Delta Moptp2$, *MoEF1::PTP2* und $\Delta Mohog1$ gegenüber dem Fungizid Fludioxonil untersucht. Dafür wurden die Stämme auf Minimal-Medium (MM) sowie im Vergleich dazu auf MM mit Fludioxonil kultiviert und die Wachstumsgeschwindigkeit bestimmt (Abb. 4).

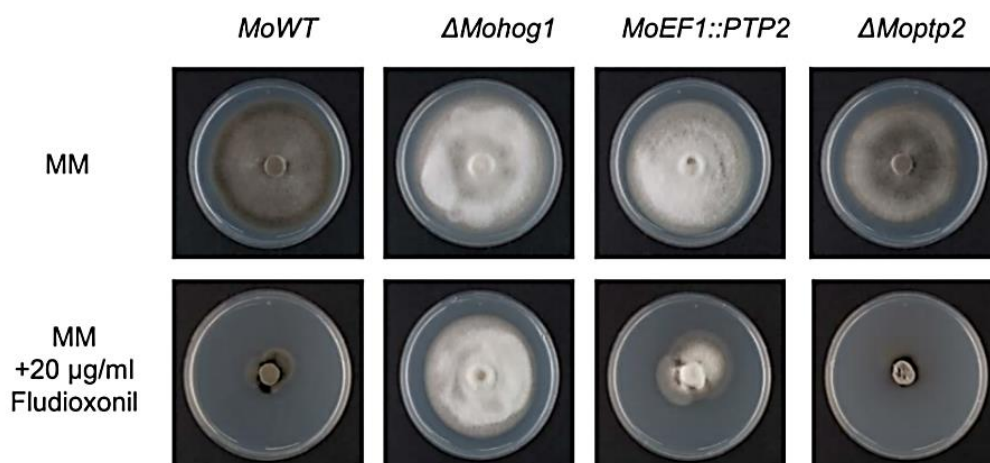


Abb. 4: Vegetatives Wachstum von *MoWT*, der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und der lof-Mutanten $\Delta Mohog1$ und $\Delta Moptp2$ unter Fludioxonil-Stress. Die Pilzstämmen wurden auf MM und auf MM inklusive 20 µg/ml Fludioxonil für 14 Tage bei 26 °C kultiviert.

Auf Medium ohne Fludioxonil sind die Wachstumsgeschwindigkeiten der getesteten Stämme untereinander ähnlich. Auf Fludioxonil-haltigem Medium ist bei *MoEF1::PTP2* ein größerer Koloniedurchmesser zu beobachten im Vergleich zu *MoWT*, bei Δ *Moptp2* hingegen ist der Koloniedurchmesser geringer als bei *MoWT*. Das Wachstum von Δ *Mohog1* ist durch Fludioxonil kaum beeinflusst.

Ergänzende Experimente in Submerskulturen bestätigten diese Beobachtungen. Nach Kultivierung in MM und nach Kultivierung in MM mit Fludioxonil wurde das Myzeltrockengewicht von *MoWT* sowie der Mutantenstämme *MoEF1::PTP2*, Δ *Mohog1* und Δ *Moptp2* bestimmt (Abb. 5).

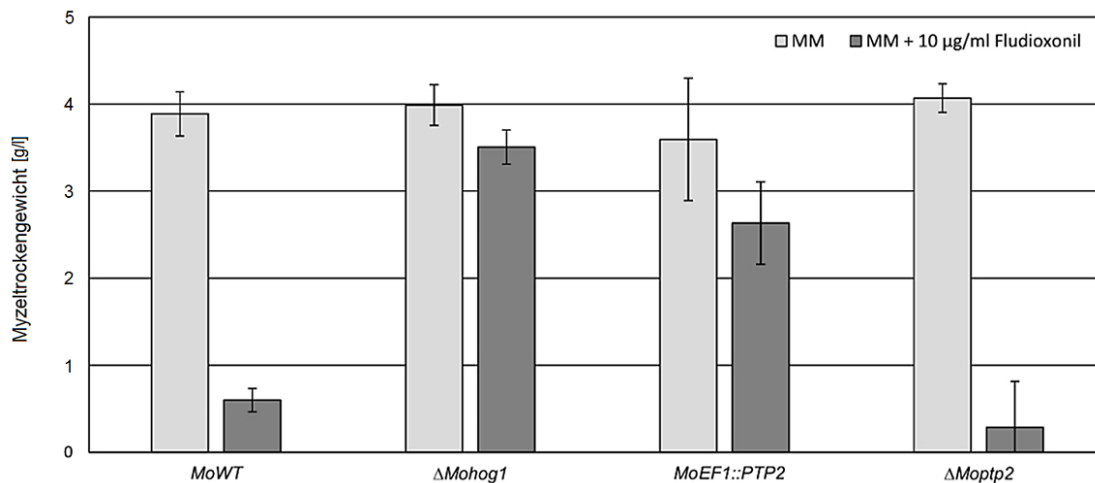


Abb. 5: Myzel-Trockengewichte von *MoWT*, der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und den lof-Mutanten Δ *Mohog1* und Δ *Moptp2* nach Kultivierung in MM bzw. nach Kultivierung in MM mit Fludioxonil. Die Pilzkulturen wurden in flüssigem MM für 8 Tage mit 100 Upm bei 26 °C (hellgrau) bzw. in flüssigem MM inklusive 10 µg/ml Fludioxonil für 10 Tage mit 100 Upm bei 26 °C (dunkelgrau) inkubiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils drei biologischen Replikaten an.

Das Myzeltrockengewicht aller untersuchten Stämme war in den Kontrollen ohne Fludioxonil nahezu identisch. Nach Kultivierung in MM mit Fludioxonil wurden für *MoWT* und Δ *Moptp2* geringere Myzeltrockengewichte pro Liter Kultur gemessen, für Δ *Mohog1* und *MoEF1::PTP2* hingegen deutlich größere.

Der Effekt der Überexpression von *MoPTP2* auf die fungizide Wirkung von Fludioxonil konnte durch Keimungshemmungstests weiter analysiert werden. Dabei wurden die Konidienkeimungsraten von *MoWT*, Δ *Mohog1*, *MoEF1::PTP2* und Δ *Moptp2* während der Inkubation unter Fludioxonil-Stress bestimmt (Abb. 6).

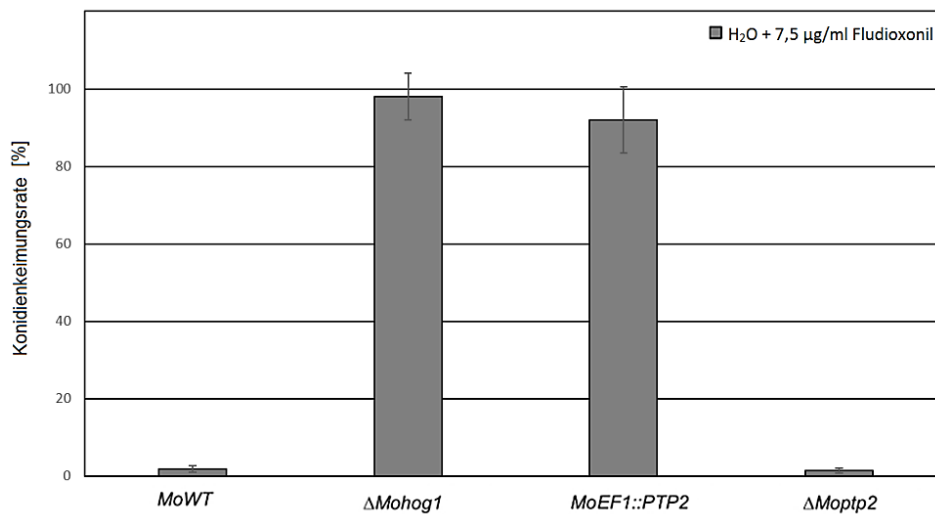


Abb. 6: Konidien-Keimungshemmungstest von *MoWT*, der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und den lof-Mutanten Δ *Mohog1* und Δ *Moptp2* unter Fludioxonil-Stress. Konidien wurden von 11 Tage alten Pilzkolonien gewonnen und in H₂O inklusive 7,5 µg/ml Fludioxonil für 16 h bei 26 °C inkubiert. Die Keimschlauchentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Als gekeimte Konidien wurden jene mit einer Keimschlauchlänge größer oder gleich der Länge der Konidie bewertet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils 100 gezählten Konidien an.

Bei den Stämmen *MoWT* und Δ *Moptp2* waren die Keimungsraten bei Fludioxonil-Stress deutlich reduziert im Vergleich zu den Keimungsraten von *MoEF1::PTP2* und des Referenzstamms Δ *Mohog1*. Bei Keimung in H₂O ohne Fludioxonil konnten keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der Keimungsraten der untersuchten Stämme festgestellt werden, nahezu alle Konidien keimten aus (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Überexpression von *MoPTP2* führt zur verstärkten Dephosphorylierung der MAPK MoHog1p

Die Ergebnisse der Wachstumstests zur Fludioxonil-Resistenz deuten darauf hin, dass eine Überexpression des Phosphatase-Gens *MoPTP2* zu einer verstärkten Dephosphorylierung der MAPK MoHog1p führen könnte, wodurch die Fludioxonil-bedingte Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs kompensiert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Phosphorylierung von MoHog1p in den verschiedenen Stämmen mittels Western Blot Analyse mit dem monoklonalen Phospho-p38 MAPK Antikörper (Thr180/Tyr182) (D3F9) XP™ (Cell Signaling Technology, Beverly, Massachusetts, USA) überprüft (Abb. 7).

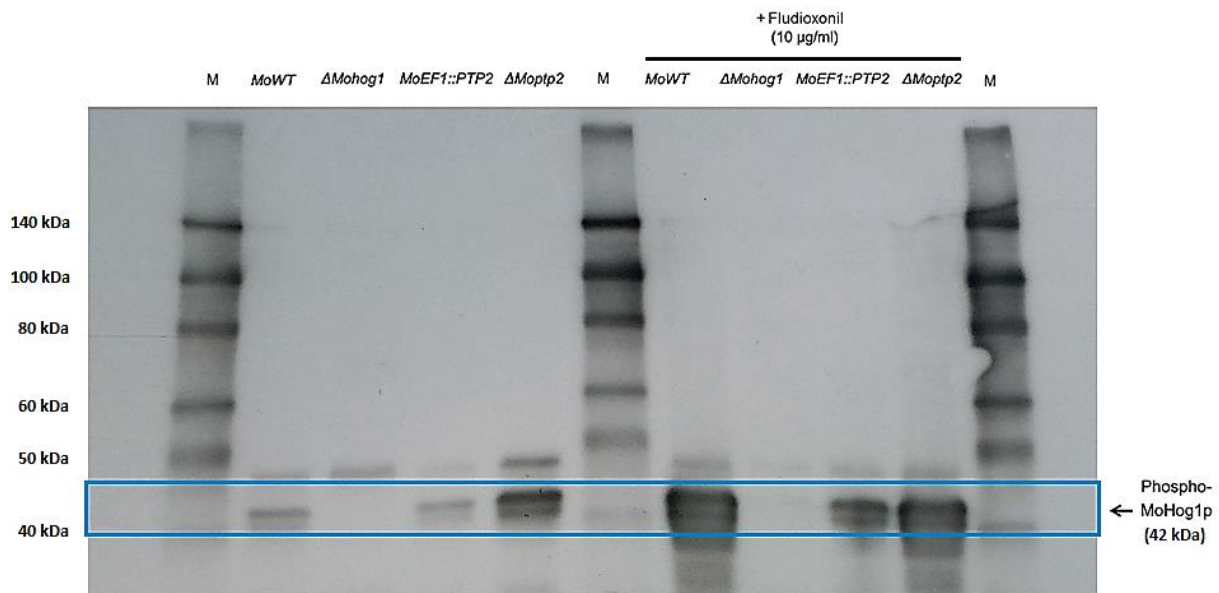


Abb. 7: Phosphorylierung der MAPK MoHog1p in *MoWT*, in der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und in der lof-Mutante Δ *Moptp2* vor und nach Fludioxonil-Behandlung. Die Western-Blot-Analyse wurde mit einem Anti-Phospho-Hog1-MAPK-Antikörper durchgeführt. Es wurden jeweils gleiche Proteinextraktmengen der untersuchten Stämme eingesetzt. Die Inkubation der Stämme erfolgte in CM. Für die Stämme *MoWT* und *MoEF1::PTP2* ist auch unter nicht-induzierten Bedingungen ein schwaches Phosphorylierungssignal von MoHog1p zu erkennen, für Δ *Moptp2* ein deutliches Phosphorylierungssignal. Im Stamm Δ *Mohog1* ist kein Phosphorylierungssignal von MoHog1p zu erkennen. Zur Induktion wurden jeweils 10 µg/ml Fludioxonil appliziert. Die Intensität der Phosphorylierungssignale bei *MoWT* und bei Δ *Moptp2* ist nach 5-minütiger Fludioxonil-Behandlung stark erhöht. Im Besonderen ist zu beachten, dass die Intensitätserhöhung des Phosphorylierungssignal in *MoEF1::PTP2* nach Fludioxonil-Behandlung geringer ist als in *MoWT* nach Fludioxonil-Behandlung. M = biotinylierter Proteinmarker.

Ohne Fludioxonil-Induktion der beiden Stämme *MoWT* und *MoEF1::PTP2* konnten jeweils schwache Phosphorylierungssignale von MoHog1p beobachtet werden. Dabei war das Signal bei *MoWT* tendenziell stärker als bei *MoEF1::PTP2*. Bei fünfminütiger Fludioxonil-Induktion dieser beiden Stämme war in der Probe von *MoWT* ein deutlich stärkeres Phosphorylierungssignal zu erkennen, für *MoEF1::PTP2* hingegen ein nur geringfügig stärkeres Signal. Für Δ *Moptp2* konnte auch ohne Fludioxonil-Behandlung ein starkes Phosphorylierungssignal beobachtet werden. Der Nachweis, dass jeweils gleiche Proteinextraktmengen eingesetzt wurden, ist im Anhang zu finden (Abb. 24). In Δ *Mohog1* als Negativ-Kontrolle wurden keine MoHog1p-Phosphorylierungssignale beobachtet.

3.1.3 MoPtp2p beeinflusst die Osmoregulation, Zellwandintegrität,

Konidiogenese, Konidienkeimung und Virulenz von *Magnaporthe oryzae*

Zur Untersuchung des Einflusses von *MoPTP2* auf die Osmoregulation wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Stämme *MoEF1::PTP2* und $\Delta Moptp2$ verglichen mit der Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Referenzstämmen *MoWT* und $\Delta Mohog1$ auf Kompletmedium (CM) bzw. CM mit KCl bzw. Sorbitol als hyperosmotische Stressoren (Abb. 8).

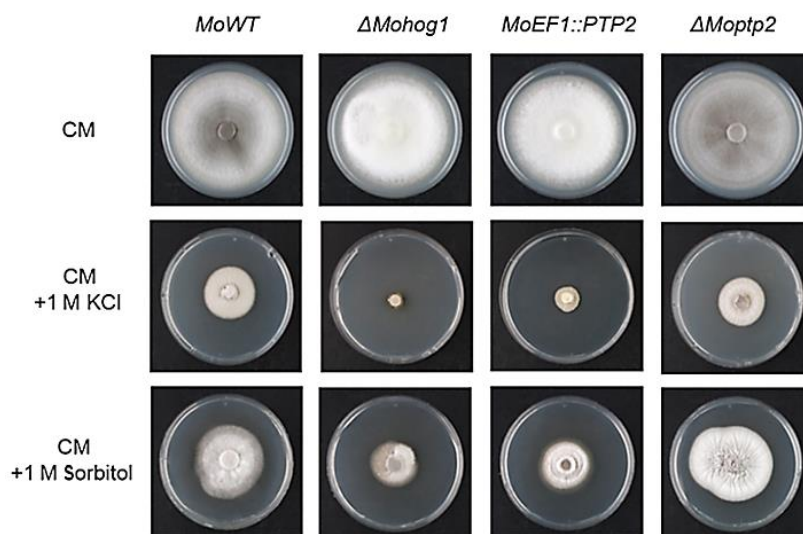


Abb. 8: Vegetatives Wachstum von *MoWT*, der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und der beiden lof-Mutanten $\Delta Mohog1$ und $\Delta Moptp2$ bei osmotischem Stress. Die Stämme wurden auf CM bzw. auf CM inklusive 1 M KCl oder 1 M Sorbitol für 10 Tage bei 26 °C inkubiert.

Auf Medium ohne hyperosmotischen Stress sind die Wachstumsgeschwindigkeiten der kultivierten Stämme untereinander gleich. Bei hyperosmotischem Stress hingegen ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und des osmosensitiven Referenzstamms $\Delta Mohog1$ signifikant reduziert im Vergleich zu *MoWT*. Dies konnte in Flüssigkultur bestätigt werden (Anhang Abb. 25).

Auf Medium mit Calcofluor White (CFW), einem Chitin-interagierenden Fluoreszenzfarbstoff (Wood, 1980), ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* deutlich höher und die Wachstumsgeschwindigkeit der lof-Mutante $\Delta Moptp2$ geringer als die der beiden Referenzstämmen *MoWT* und $\Delta Mohog1$ (Tab. 2). Auf Medium mit Congo Red, einem β 1,3-Glucan-interagierenden Farbstoff waren keine Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten der untersuchten Stämme festzustellen (Daten nicht gezeigt).

Zur weiteren Untersuchung der Zellwandstabilität wurde die Rate der enzymatischen Protoplastierung von vegetativem Myzel durch zellwandabbauende Enzyme aus *Trichoderma harzianum* pro Einheit Myzeltrockengewicht der untersuchten Stämme miteinander verglichen (Tab. 2). Bei der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* wurden signifikant weniger, bei der lof-Mutante *ΔMoptp2* signifikant mehr Protoplasten beobachtet als bei den beiden Referenzstämmen *MoWT* und *ΔMohog1*.

Zur Untersuchung der Konidienbildungsrate wurde die Konidienanzahl pro Flächeneinheit nach 11 Tagen Wachstum von vegetativem Myzel der untersuchten Stämme auf CM untereinander verglichen (Tab. 2). Die Konidienbildungsrate in *ΔMohog1* war ca. 7-fach geringer als in *MoWT*. Bei der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* wurden deutlich weniger Konidien beobachtet als bei *ΔMohog1*, bei der lof-Mutante *ΔMoptp2* deutlich mehr als bei *MoWT*.

Bei der Konidienkeimung der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* konnten Unterschiede zur Konidienkeimung von *MoWT*, *ΔMohog1* und *ΔMoptp2* beobachtet werden. Konidien von *MoEF1::PTP2* bildeten sehr lange, teils verzweigte Keimschläuche und zu ca. 30 % je drei Keimschläuche pro Konidium mit bis zu 3 Appressorien pro Konidium aus (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung der Pathogenität wurden Reispflanzen der Sorte CO-39 mit Konidien der vier untersuchten Stämme inokuliert und nach 5 Tagen die Anzahl an Läsionen auf Reisblättern untereinander verglichen (Tab. 2). Bei der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und dem osmosensitiven Referenzstamm *ΔMohog1* wurden signifikant weniger Läsionen beobachtet als bei *MoWT* und *ΔMoptp2*.

Tab. 2: Phänotypen von *MoEF1::PTP2* und *ΔMoptp2* im Vergleich zu den beiden Referenzstämmen *MoWT* und *ΔMohog1*. Untersucht wurde die vegetative Wachstumsgeschwindigkeit (v.W.) [Fläche] auf MM mit CFW, die Protoplastierungsrate durch zellwandabbauende Enzyme aus *Trichoderma harzianum*, die Anzahl gebildeter Konidien pro Flächeneinheit nach 11 Tagen Kultivierung auf CM, sowie die Virulenz auf *Oryza sativa* CO-39. Angegeben sind Werte relativ zu *MoWT* [100 %] sowie die jeweiligen Standardabweichungen. Die Experimente zur Protoplastierungsrate und der Konidiogeneserate wurden insgesamt dreimal durchgeführt mit jeweils drei biologischen Replikaten. Die Experimente zur Wachstumsgeschwindigkeit und zur Pathogenität einmal mit jeweils drei biologischen Replikaten.

	<i>MoWT</i>	<i>ΔMohog1</i>	<i>MoEF1::PTP2</i>	<i>ΔMoptp2</i>
v.W. MM + 400 µg/ml CFW	100 ±6,1	60,8 ±5,3	201,5 ±70,2	21,3±2,8
Protoplasten	100 ±16,9	116,7 ±12,4	26,6 ±12,1	325,4 ±19,3
Konidienbildungsrate	100 ±28,3	15,4 ±4,8	6,1 ±2,0	593,0 ±160,5
Virulenz auf <i>Oryza sativa</i>	100 ±23,2	55,9 ±8,4	52,1 ±8,0	106,4 ±20,5

Zusammenfassend kann festgestellt werden: Für die Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* wurde eine signifikante Verringerung der Suszeptibilität gegenüber Fludioxonil im Vergleich zu *MoWT* beobachtet, während die Inaktivierung des Gens *MoPTP2* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Fungizid führt. Umgekehrt führt Überexpression des Gens *MoPTP2* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Stress. Diese Ergebnisse implizieren, dass MoPtp2p an der Dephosphorylierung von MoHog1p beteiligt ist und somit eine wichtige Komponente in der Regulation des HOG-Signalwegs.

3.2 Visualisierung der Aktivierung des HOG-Signalwegs

3.2.1 Fusion der MAPK MoHog1p mit dem Fluoreszenzprotein GFP

Die MAPK Hog1p ist sowohl in Hefen wie z.B. *S. cerevisiae* oder *Candida albicans* und deren Homologe auch in filamentösen Pilzen wie z.B. *Botrytis cinerea* unter isoosmotischen Bedingungen im Zytosol lokalisiert. Nach dualer Phosphorylierung durch die im HOG-Signalweg upstream gelegene MAPKK, z.B. bei hyperosmotischem Stress, transloziert Hog1p in den Zellkern, um die physiologische Antwortreaktion der Zelle zu initiieren (Ferrigno *et al.*, 1998; Heller *et al.*, 2012; Cheetham *et al.*, 2007). In *M. oryzae* war eine Zellkerntranslokation von MoHog1p bisher nicht beschrieben. Die zelluläre Lokalisation von MAPK kann z.B. durch Fusion mit fluoreszierenden Proteinen ermittelt werden (Ferrigno *et al.*, 1998).

Um Unterschiede von osmotischem Stress und Fludioxonil-Stress bezüglich der Lokalisation der MAPK MoHog1p in *M. oryzae* zu untersuchen, wurde MoHog1p C-terminal mit dem Fluoreszenzprotein eGFP (im Folgenden 'GFP') fusioniert (2.2.7). Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte so die zelluläre Lokalisationsänderung des Fusionsproteins MoHog1p-GFP *in vivo* in Echtzeit untersucht werden. In der generierten Mutante *MoHOG1::GFP* konnte am Genlocus von *MoHOG1* eine homologe Rekombination und somit ein Austausch des nativen Gens *MoHOG1* mit dem Fusionskonstrukt *MoHOG1-GFP* in das Genom von *M. oryzae* nachgewiesen werden (Anhang Abb. 26).

Die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutante *MoHOG1::GFP* auf hyperosmotischen Medien war identisch zur Wachstumsgeschwindigkeit von *MoWT* (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein MoHog1p-GFP funktionell exprimiert und translatiert wird. Ohne funktionelles MoHog1p ist *M. oryzae* nur eingeschränkt in der Lage auf hyperosmotischen Medien zu wachsen (3.1.3 Abb. 8: Δ *Mohog1*).

Der Mutantenstamm *MoHOG1::GFP* konnte verwendet werden, um *in vivo* die Aktivierung des HOG-Signalwegs durch Induktion mittels diverser Stimuli in Echtzeit zu visualisieren.

3.2.2 Die MAPK MoHog1p transloziert bei osmotischem Schock in den Zellkern

Im Stamm *MoHOG1::GFP* konnte die dynamische Zellkerntranslokation von MoHog1p als Reaktion auf osmotischen Stress beobachtet werden. Dafür wurden Konidien mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (2.3.6).

In unbehandelten Konidien von *MoHOG1::GFP* war ein gleichmäßig starkes GFP-Signal in allen Bereichen der Zellen zu erkennen. Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Hoechst 33258 können spezifisch Nukleinsäuren angefärbt werden (Latt *et al.*, 1975). Nach Applikation von 5 µg/ml Hoechst 33258 und Behandlung der Konidien von *MoHOG1::GFP* mit 0,25 M KCl oder 0,5 M Sorbitol korrelierte die Lokalisation des GFP-Fluoreszenzsignals mit der Lokalisation des Hoechst-Fluoreszenzsignals (Abb. 9).

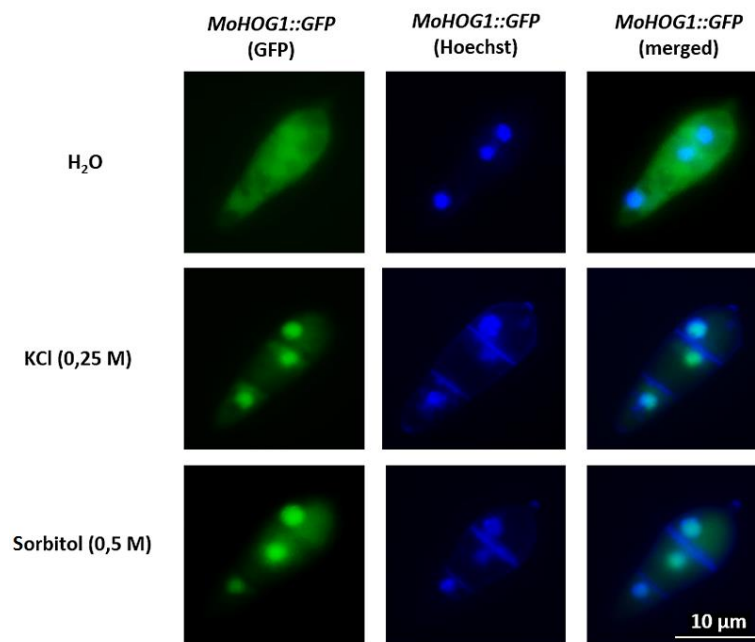


Abb. 9: Zellkerntranslokation von MoHog1p als Reaktion auf hyperosmotischen Schock. Im Stamm *MoHOG1::GFP*, welcher das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimiert, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p bestimmt. Konidien wurden mit H₂O bzw. mit 0,25 M KCl oder 0,5 M Sorbitol behandelt und nach 1 min fotografiert. Für die Färbung der Zellkerne wurden 5 µg/ml Hoechst 33258 verwendet. Von links nach rechts: „GFP“-Filterset, „DAPI“-Filterset, *merged* = „GFP“ + „DAPI“.

In Konidien und im Myzel von *MoHOG1::GFP* konnte erfolgreich eine dynamische Lokalisationsänderung von MoHog1p nach hyperosmotischem Schock beobachtet werden. 60 min nach Applikation von hyperosmotischem Salzstress konnte sowohl in Konidien als auch im Myzel keine Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Zellkernen beobachtet werden, das Fluoreszenzsignal war wieder gleichmäßig im Zytosol verteilt, die nukleäre Translokation von MoHog1p ist reversibel (Abb. 10).

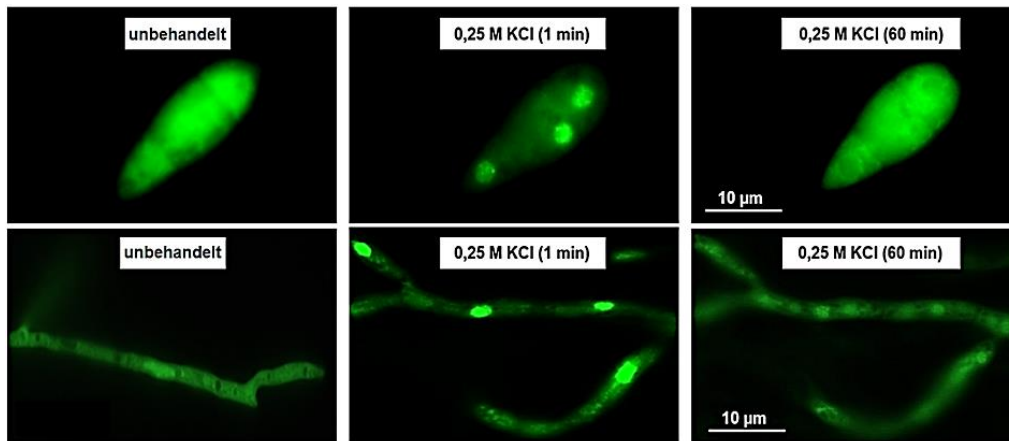


Abb. 10: Reversible Zellkerntranslokation von MoHog1p nach hyperosmotischem Schock. Im Stamm *MoHOG1::GFP*, welcher das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimiert, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p bestimmt. Konidien und Myzel wurden vor, 1 min nach und 60 min nach Induktion mit 0,25 M KCl fotografiert. Eine deutliche nukleäre Akkumulation des GFP-Signals ist 1 min nach KCl-Stimulus zu erkennen, während das GFP-Signal in unbehandelten Zellen sowie 60 min nach KCl-Stimulus gleichmäßig in der Zelle verteilt ist.

Aus Gründen einer schnelleren Präparation und robusteren Durchführbarkeit der Experimente mit Konidien im Vergleich zu Myzel zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von MoHog1p, wurden die im Folgenden beschriebenen Lokalisationsstudien von MoHog1p bei Applikation verschiedenster Stimuli ausschließlich an Konidien durchgeführt.

Folgende Stoffe wurden in zuvor mittels Wachstumsversuchen ausgetesteten (Jacob *et al.*, 2015), subletalen Konzentrationen appliziert, um die Kerntranslokation von MoHog1p zu beobachten: KCl (0,2 M), NaCl (0,2 M), NaNO₃ (0,2 M), Sorbitol (0,4 M). Unmittelbar nach Behandlung von Konidien des Stammes *MoHOG1::GFP* mit den hier genannten Stressoren war eine reversible Akkumulation des GFP-Signals in den Zellkernen zu erkennen (Anhang Tab. 4). Bei Applikation von geringeren Konzentrationen der entsprechenden Substanzen waren keine Akkumulationen in den Zellkernen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Die MAPK MoHog1p transloziert bei Fludioxonil-Stress in den Zellkern

Es ist bekannt, dass Fludioxonil den HOG-Signalweg von *M. oryzae* hyperaktiviert, was ebenso wie osmotischer Stress zur Phosphorylierung von MoHog1p führt (Jacob *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob der Einsatz dieses Fungizids auch zu einer Zellkernakkumulation von MoHog1p führt, wurden Konidien des Stammes *MoHOG1::GFP* mit Fludioxonil behandelt. Applikation von Fludioxonil führte unmittelbar zu Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen (Abb. 11).

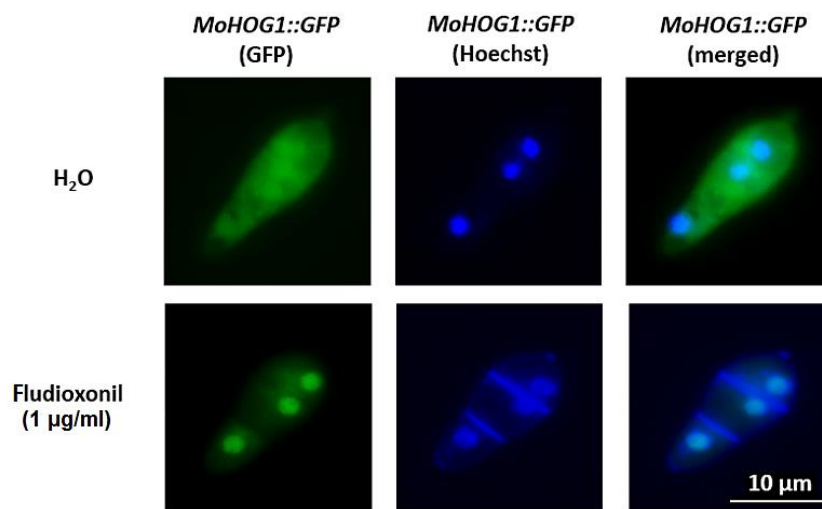


Abb. 11: Zellkerntanslokation von MoHog1p bei Fludioxonil-Stress. Im Stamm *MoHOG1::GFP*, welcher das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimiert, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p bestimmt. Konidien wurden mit H₂O bzw. mit 1 µg/ml Fludioxonil behandelt und nach 1 min fotografiert. Für die Färbung der Zellkerne wurden 5 µg/ml Hoechst 33258 verwendet. Von links nach rechts: „GFP“-Filterset, „DAPI“-Filterset, *merged* = „GFP“ + „DAPI“.

Die Mindestkonzentration an Fludioxonil, die zur Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen führte, betrug 2,5 ng/ml. Um auszuschließen, dass eine Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Zellkernen generell durch Stress auch unabhängig vom HOG-Signalweg erfolgt, wurde das Antibiotikum Geneticin appliziert, welches die Proteintranslation inhibiert (Bar-Nun *et al.*, 1983). Sowohl unmittelbar als auch bis 1 h nach Applikation von 200 µg/ml Geneticin war keine Akkumulation des Fluoreszenzsignals zu beobachten (Abb. 12). Es war zu erkennen, dass die generelle Fluoreszenzsignalstärke zu späteren Zeitpunkten schwächer war als unmittelbar nach Applikation. Es konnten 24 h nach Behandlung mit Geneticin keine Keimschläuche beobachtet werden, somit ist davon auszugehen, dass die Applikation des Antibiotikums den Zelltod der Konidien bewirkte.

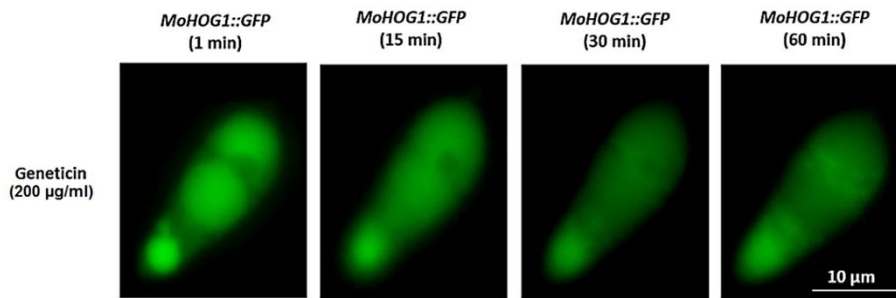


Abb. 12: Keine Zellkerntranslokation von MoHog1p bei Geneticin-Stress. Im Stamm *MoHOG1::GFP*, welcher das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimiert, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p bestimmt. Konidien wurden mit 200 µg/ml Geneticin behandelt und nach 1 min, 15 min, 30 min und 60 min fotografiert.

Als weitere Negativkontrolle wurde die Mutante *MoEF1::GFP*, welche das Fluoreszenzprotein GFP ohne Fusion mit MoHog1p (Anhang Abb. 27) im Zytosol exprimiert, für die Untersuchungen verwendet (von Dr. Stefan Jacob, IBWF gGmbH, Kaiserslautern, zur Verfügung gestellt). Konidien von *MoEF1::GFP* wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Anhang Abb. 28).

Sowohl vor als auch nach Induktion mit 0,5 M KCl, 1 M Sorbitol oder 20 µg/ml Fludioxonil waren im Stamm *MoEF1::GFP* keine Akkumulationen des Fluoreszenzsignals in subzellulären Bereichen zu erkennen. Somit sind alle in dieser Arbeit beobachteten Effekte zur Zellkerntranslokation von MoHog1p-GFP auf die Aktivität der MAPK MoHog1p im Fusionsprotein zurückzuführen.

Es konnte gezeigt werden, dass MoHog1p sowohl unmittelbar nach hyperosmotischem Schock als auch unmittelbar nach Applikation des Fungizids Fludioxonil in den Zellkern transloziert.

In *S. cerevisiae* erfolgt eine Phosphorylierung und Translokation von Hog1p in den Zellkern bei hyperosmotischem Stress (Ferrigno *et al.*, 1998). In der Hefe *S. pombe* hingegen, in deren Genom zusätzliche Gene sensorischer HKs enthalten sind im Vergleich zum Genom von *S. cerevisiae*, erfolgt eine Aktivierung des Hog1p-Homologs Sty1 zusätzlich bei Hitzestress, oxidativem Stress und bei Ethanolstress (Buck *et al.*, 2001; Reiser *et al.*, 1999). Da *M. oryzae* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ebenso mehrere sensorische HKs verfügt, wurde die zelluläre Lokalisation von MoHog1p in Reaktion auf verschiedene Stimuli hin untersucht.

3.2.4 Nukleäre Translokation der MAPK MoHog1p bei verschiedenen Arten von Stress

Es wurde beschrieben, dass neben extrazellulären osmotischen Veränderungen auch andere Stimuli in der Lage sind den HOG-Signalweg in *M. oryzae* zu aktivieren. So wurde gezeigt, dass NaNO_2 zur Phosphorylierung von MoHog1p führt, und dass Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg auf Medien mit den Hypoxie-imitierenden Agenzien NaNO_2 und CoCl_2 in ihrem Wachstum gehemmt sind im Vergleich zu *MoWT* (Jacob *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob diese Stressoren auch zu einer Zellkernakkumulation von MoHog1p führen, wurden Konidien von *MoHOG1::GFP* mit osmotisch nicht relevanten Konzentrationen NaNO_2 bzw. CoCl_2 behandelt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Nach Behandlung von Konidien des Stammes *MoHOG1::GFP* mit 0,05 M NaNO_2 bzw. 1 mM CoCl_2 waren reversible Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen zu erkennen. Im Vergleich zur Dynamik der Zellkerntranslokation von MoHog1p ausgelöst durch osmotischen Stress bzw. Fludioxonil-Stress (3.2.2 und 3.2.3), waren hierbei Unterschiede festzustellen: Nicht sofort, sondern erst 4–5 min nach Behandlung der Konidien mit CoCl_2 bzw. NaNO_2 waren Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen zu erkennen (Anhang Tab. 4); hingegen erfolgte die Akkumulation nach Behandlung mit osmotischem Stress bzw. Fludioxonil-Stress unmittelbar.

Weitere Stimuli, die zu einer Akkumulation des GFP-Signals in den Zellkernen führten, waren Lösungsmittel, erhöhte Temperatur, verringerter pH-Wert und hochfrequente elektromagnetische Strahlung. Wenn die Menge an Ethanol oder Dimethylsulfoxid 0,5 % bzw. die Menge an Acetonitril 0,1 % des Volumens der Konidiensuspension überstieg, waren Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen zu beobachten. Nach Erwärmung einer Konidiensuspension auf 40 °C waren Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen zu erkennen. Eine Absenkung des pH-Werts mittels HCl auf pH 2 führte zu Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen. Nach 2 min Bestrahlung von Konidien des Stammes *MoHOG1::GFP* unter Verwendung der Filter-Sets „GFP“, „CFP“ und „DAPI“ und der höchsten Einstellung der Fluoreszenzlampe (2.3.6) waren Akkumulationen des GFP-Signals in den Zellkernen zu beobachten. Im Gegensatz dazu war bei fünfminütiger Bestrahlung der Konidiensuspension unter Verwendung der Filter-Sets „RFP/YFP“ (2.3.6) keine Akkumulation des GFP-Signals zu beobachten (Anhang Tab. 4).

Während der Konidienkeimung konnte nach ca. 3–5 h auch ohne exogenen Stimulus eine Akkumulation des GFP-Signals in den Zellkernen beobachtet werden (Anhang Abb. 29), hingegen nicht in Appressorien (Daten nicht gezeigt).

Neben osmotischem Stress und Fungizidstress führen also endogene Stimuli und diverse exogene Stressoren unabhängig von osmotischer Relevanz zur nukleären Translokation von MoHog1p.

Um stressbedingte Phosphorylierungen von Hog1p bzw. MoHog1p detektieren zu können, ist die Funktionalität der in der Signalkette upstream gelgenden Komponenten des HOG-Signalwegs essentiell (Brewster *et al.*, 1993; Hohmann, 2002; Jacob *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob eine stressbedingte Kerntranslokation von MoHog1p in Mutantenstämmen mit inaktiviertem HOG-Signalweg erfolgen kann, wurde MoHog1p-GFP in den lof-Stämmen $\Delta Mopbs2$ (MGG_10268), $\Delta Mossk2$ (MGG_00183), $\Delta Mossk1$ (MGG_02897) und $\Delta Moypd1$ (MGG_07173) exprimiert. Die Ausgangsstämme für die Transformationen wurden von Dr. Stefan Jacob (IBWF gGmbH, Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt (Jacob *et al.*, 2015).

3.2.5 In Mutantenstämmen mit inaktiviertem HOG-Signalweg transloziert die MAPK MoHog1p nicht in den Zellkern

Mutantenstämmen mit inaktiviertem HOG-Signalweg werden durch die Stressoren KCl, NaCl, Sorbitol, NaNO₃, NaNO₂ und CoCl₂ in ihrem Wachstum gehemmt im Vergleich zu *MoWT*, weil eine durch MoHog1p vermittelte physiologische zelluläre Antwortreaktion nicht erfolgen kann (Jacob *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2015). Umgekehrt sind Mutantenstämmen mit inaktiviertem HOG-Signalweg resistent gegenüber Fludioxonil, weil keine durch MoHog1p vermittelte unphysiologische Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs erfolgt (Jacob *et al.*, 2015).

Das Expressionskonstrukt *MoHOG1::GFP* wurde in die Stämme $\Delta Mopbs2$, $\Delta Mossk2$, $\Delta Mossk1$ und $\Delta Moypd1$ transformiert (2.2.7) und so die Mutanten $\Delta Mopbs2/MoHOG1::GFP$, $\Delta Mossk2/MoHOG1::GFP$, $\Delta Mossk1/MoHOG1::GFP$ und $\Delta Moypd1/MoHOG1::GFP$ generiert. Das Wachstum der jeweiligen Mutante sowohl auf Kompletmedium als auch auf KCl-, Sorbitol- oder Fludioxonil-haltigen Medien war identisch zum Wachstum des entsprechenden lof-Stammes (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe des Primerpaares *MoHOG1-for(b)/eGFP-rev* konnte eine Integration des Fusionskonstrukts *MoHOG1-GFP* in das jeweilige Genom der Mutantenstämmen mittels PCR nachgewiesen werden (Anhang Abb. 27).

Das Fusionsprotein MoHog1p-GFP wurde in den Stämmen *MoHOG1::GFP*, $\Delta Mopbs2/MoHOG1::GFP$, $\Delta Mossk2/MoHOG1::GFP$, $\Delta Mossk1/MoHOG1::GFP$, $\Delta Moypd1/MoHOG1::GFP$ exprimiert. In Konidien der Stämme $\Delta Mopbs2/MoHOG1::GFP$, $\Delta Mossk2/MoHOG1::GFP$, und $\Delta Mossk1/MoHOG1::GFP$ war jeweils ein im Zytosol gleichmäßig verteiltes GFP-Signal zu erkennen. Es konnte nach Behandlung mit den

Stressoren KCl, NaCl, Sorbitol, Fludioxonil, NaNO₃, NaNO₂, CoCl₂, Hitze, Lösungsmittel oder hochfrequenter Strahlung keine Akkumulation des Fluoreszenzsignals beobachtet werden (Anhang Tab. 4). In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten zum Stamm $\Delta Moypd1$ (Jacob *et al.*, 2015) war beim Stamm $\Delta Moypd1/MoHOG1::GFP$ keine Sporulation festzustellen; es konnten keine Konidien beobachtet werden. Deswegen wurde Myzel dieser Mutante untersucht. Nach Induktion mit KCl, Sorbitol oder Fludioxonil waren keine Akkumulationen des Fluoreszenzsignals zu erkennen (Anhang Tab. 4).

Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass für eine nukleäre Translokation von MoHog1p ein intakter HOG-Signalweg notwendig ist.

Mutanten mit inaktiviertem HK-Gen *MoHIK1* und Mutanten mit inaktiviertem HK-Gen *MoSLN1* sind Stressor-spezifisch in ihrem Wachstum gehemmt im Vergleich untereinander und im Vergleich zu *MoWT*: $\Delta Mohik1$ kann auf Medium mit osmotischem Salzstress besser wachsen als $\Delta Mosln1$, im Gegensatz dazu kann $\Delta Mosln1$ auf Medium mit osmotischem Zuckerstress besser wachsen als $\Delta Mohik1$. Die Mutante $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ ist sowohl bei Salzstress als auch bei Zuckerstress in ihrem Wachstum gehemmt (Jacob *et al.*, 2014). Dies führte zur Hypothese, dass MoHik1p und MoSln1p als spezifische Sensoren für osmotischen Zucker- bzw. Salzstress fungieren könnten und somit bei osmotischem Zuckerstress oder osmotischem Salzstress eine jeweils spezifische entsprechende Regulation über den HOG-Signalweg und somit physiologische zelluläre Antwortreaktion auslösen (Jacob *et al.*, 2014). Weiterhin wurde beschrieben, dass $\Delta Mohik1$ im Gegensatz zu $\Delta Mosln1$ auf Medium mit Fludioxonil wachsen kann. Im Folgenden wurde der Einfluss der sensorischen HKs MoHik1p und MoSln1p auf die nukleäre Translokation von MoHog1p ausgelöst durch verschiedene Stimuli untersucht.

3.2.6 Die Mechanismen der HOG-Signalweg-abhängigen Perzeption von osmotischem Stress und Fludioxonil-Stress sind unterschiedlich

Um herauszufinden, ob sich, in Analogie zu Beobachtungen aus Wachstumsversuchen (Jacob *et al.*, 2014), osmotischer Salzstress, osmotischer Zuckerstress und Fludioxonil-Stress unterschiedlich auf die Lokalisation von MoHog1p in Mutantenstämmen mit inaktivierten HK-Genen auswirkt, wurde das Expressionskonstrukt *MoHOG1::GFP* in die Stämme $\Delta Mohik1$ (MGG_11174), $\Delta Mosln1$ (MGG_07312) und $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ transformiert (2.2.7) und so die Mutanten $\Delta Mohik1/MoHOG1::GFP$, $\Delta Mosln1/MoHOG1::GFP$ und $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1/MoHOG1::GFP$ generiert. Das Wachstum der jeweiligen Mutante

sowohl auf Komplettnutrientenmedium als auch auf KCl-, Sorbitol- oder Fludioxonil-haltigen Medien war identisch zum Wachstum des entsprechenden lof-Stammes (Daten nicht gezeigt). Die Integration des Fusionskonstrukts *MoHOG1-GFP* in das jeweilige Genom der Mutantenstämme konnte nachgewiesen werden (Anhang Abb. 27). Das Fusionsprotein MoHog1p-GFP wurde in allen drei Stämmen exprimiert, in unbehandelten Konidien dieser Stämme war jeweils ein im Zytosol gleichmäßig verteiltes GFP-Signal zu erkennen. Nach Behandlung mit den Stressoren KCl, NaCl, Sorbitol, Fludioxonil, NaNO₃, CoCl₂, Hitze, Lösungsmittel oder hochfrequenter Strahlung konnten in Konidien der beiden Stämme *ΔMohik1/MoHOG1::GFP* und *ΔMohik1/ΔMosln1/MoHOG1::GFP* Akkumulationen des Fluoreszenzsignals in den Zellkernen beobachtet werden, analog zu *MoHOG1::GFP* (Anhang Tab. 4). Bei diesen Stressapplikationen konnten bei diesen beiden Stämmen also keine Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Verteilung des GFP-Signals im Vergleich zum Stamm *MoHOG1::GFP* beobachtet werden.

Dahingegen wurde in *ΔMohik1/MoHOG1::GFP* und *ΔMohik1/ΔMosln1/MoHOG1::GFP* im Gegensatz zu *MoHOG1::GFP* bei Applikation von Fludioxonil keine Akkumulation des Fluoreszenzsignals beobachtet. In Konidien der Mutante *ΔMosln1/MoHOG1::GFP* hingegen war sowohl bei osmotischem Salzstress, bei osmotischem Zuckerstress, als auch bei Fludioxonil-Stress eine Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Zellkernen zu erkennen. Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Verteilung des GFP-Signals im Vergleich zum Stamm *MoHOG1::GFP* beobachtet werden (Abb. 13).

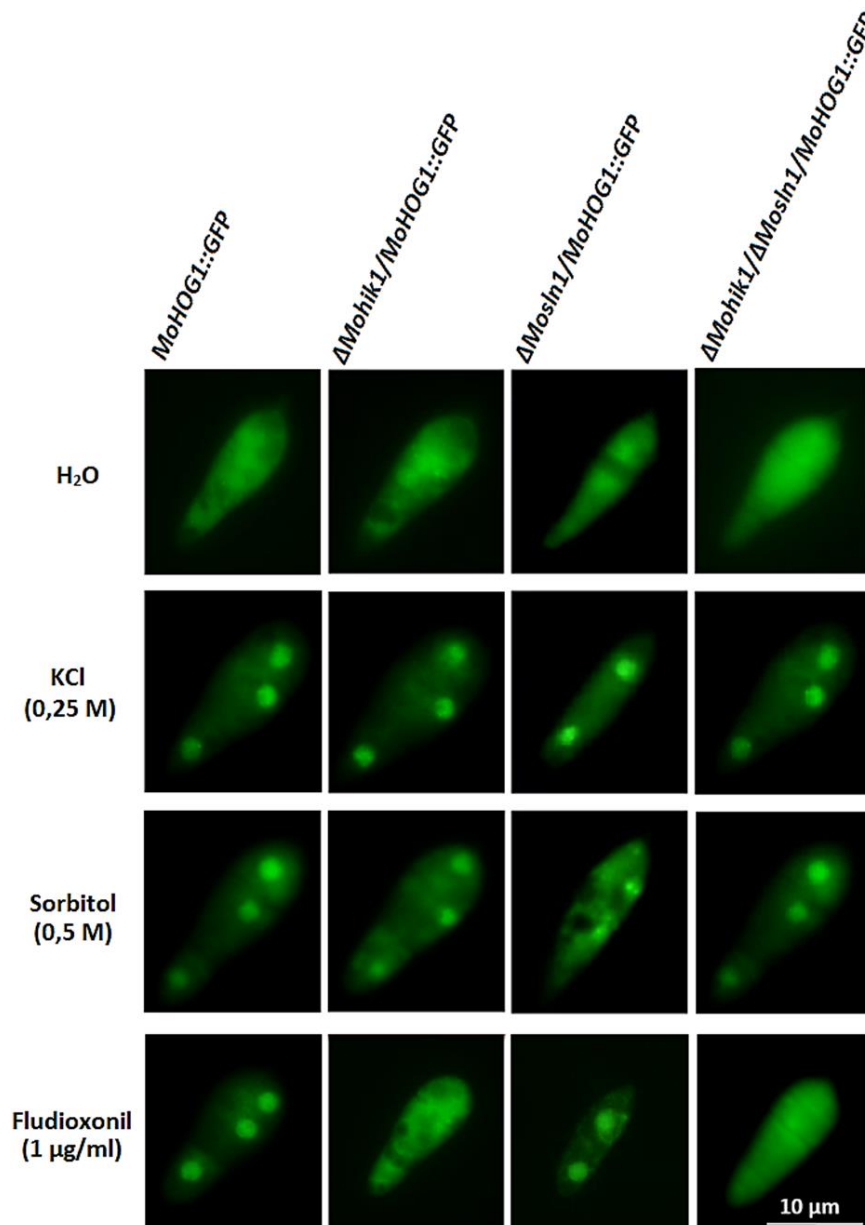


Abb. 13: Lokalisation von MoHog1p nach Induktion mit hyperosmotischem Salzstress, hyperosmotischen Zuckerstress und Fludioxonil-Stress. In Konidien der Stämme *MoHOG1::GFP*, Δ *Mosln1/MoHOG1::GFP*, Δ *Mohik1/MoHOG1::GFP* und Δ *Mohik1/ΔMosln1/MoHOG1::GFP*, welche das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimieren, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p nach Induktion mit 0,25 M KCl, mit 0,5 M Sorbitol oder mit 1 µg/ml Fludioxonil nach 1 min bestimmt.

Somit waren – die nukleäre Translokation von MoHog1p betreffend – keine Unterschiede zwischen Salzschock und Zuckerschock in Abhängigkeit der Anwesenheit der Sensor-HKs MoHik1p und/oder MoSln1p festzustellen. Im Gegensatz dazu ist für eine Fludioxonil-bedingte nukleäre Translokation von MoHog1p die Anwesenheit von MoHik1p essentiell.

In $\Delta\text{Mohik1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ und $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ konnte bei Induktion mit NaNO_2 oder CoCl_2 eine im Gegensatz zu $\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ noch spätere Akkumulation des Fluoreszenzsignals in den Zellkernen beobachtet werden (ca. 6–7 min nach Induktion). Diese verspätete Akkumulation war auch nur dann festzustellen, wenn 0,1 M NaNO_2 verwendet wurden, im Gegensatz zu 0,05 M NaNO_2 bei $\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ (Anhang Tab. 4).

Im Gegensatz zu Konidien von *MoWT* und allen untersuchten Mutantenstämme waren Konidien von $\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ immer schmaler, oft kleiner, und zu ca. 10 % einzellig (Daten nicht gezeigt), ca. 70 % zweizellig (Abb. 13) und ca. 20 % dreizellig (Daten nicht gezeigt). Im Ausgangsstamm ΔMosln1 waren Konidien schmaler und tendenziell länger als die von *MoWT*, manchmal zweizellig, niemals einzellig, meist dreizellig.

Konidien von $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ waren morphologisch unauffällig und immer dreizellig. Es konnten jedoch Konidien mit insgesamt 4 oder mehr Zellkernen beobachtet werden (Anhang Abb. 30). Die unterschiedliche Anzahl an Zellkernen pro Zelle in unterschiedlichen Konidien hatte keinen Einfluss auf die Dynamik der Zellkerntranslokation von MoHog1p bei allen getesteten Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

Nach Aktivierung des HOG-Signalwegs beginnt eine dem Stimulus entsprechende zelluläre Antwortreaktion. Die MAPK MoHog1p transloziert nach stressbedingter Aktivierung in den Zellkern (3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Neben einer transkriptionellen Anpassung nach osmotischem Schock (Jacob *et al.*, 2017a) wurde auch eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration von niedermolekularen Primärmetaboliten in *M. oryzae* beschrieben, die als Osmolyte in der Zelle angereichert werden um extrazellulärem erhöhtem osmotischem Druck entgegenzuwirken (Dixon *et al.*, 1999). Die Untersuchung der zellulären Reaktion auf osmotischen Stress sowie auf Fungizid-Stress auf der Ebene von intrazellulären Osmolyten ist von enormer Bedeutung für die Erweiterung des Verständnisses der physiologischen Mechanismen der Osmoregulation und des *mechanism of action* und *mode of action* von HOG-Signalweg-modulierenden Fungiziden wie Fludioxonil.

3.3 Die metabolische Stressantwort in *Magnaporthe oryzae*

Mikroorganismen reagieren auf ein extrazelluläres hyperosmotisches Potential wie z.B. Salz- oder Trockenstress mit der Produktion und intrazellulären Akkumulation verschiedener niedermolekularer Substanzen, welche in der Zelle als Osmolyte dem osmotischen Druck entgegenwirken. Somit wird ein Wasserausstrom aus der Zelle in die Umgebung verhindert.

Dafür werden von verschiedenen Organismen unterschiedliche niedermolekulare Substanzklassen produziert. In *S. cerevisiae* ist Glycerol der Hauptbestandteil der kompatiblen Solute, die als Reaktion auf hyperosmotischen Stress produziert werden, in *M. oryzae* Arabitol (Brown, 1978; Dixon *et al.*, 1999).

3.3.1 HOG-Signalweg-abhängige und Osmostress-bedingte Akkumulation von Osmolyten in *Magnaporthe oryzae*

Von Dixon *et al.* (1999) wurde bereits beschrieben, dass in *M. oryzae* die 4 Carbohydrate Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose den weitaus größten Mengenanteil der intrazellulären kompatiblen Solute einnehmen: Als Reaktion auf hyperosmotischen Salzstress ändert sich sowohl die intrazelluläre Glycerol- als auch die Arabitolkonzentration. Die intrazelluläre Konzentration an Arabitol ist 24 h nach Induktion einer Flüssigkultur von *M. oryzae* mit NaCl stark erhöht, die Glycerol-Konzentration mäßig erhöht. Die intrazellulären Konzentrationen von Mannitol und Trehalose bleiben annähernd unverändert. Im Gegensatz dazu ändern sich die Konzentrationen dieser vier Carbohydrate in der Mutante $\Delta Mohog1$ 24 h nach äquivalentem Salzschock nicht signifikant (Dixon *et al.*, 1999). Die Produktion von kompatiblen Soluten während der osmotischen Stressantwort wird also über den HOG-Signalweg reguliert, weshalb $\Delta Mohog1$ mit inaktiviertem HOG-Signalweg nicht in der Lage ist Osmolyte zu produzieren und somit adäquat auf einen osmotischen Schock zu reagieren.

Das Agrarfungizid Fludioxonil hyperaktiviert den HOG-Signalweg in Abhängigkeit der Anwesenheit von Gruppe III HKs und greift somit in die Osmoregulation von Pilzen ein. Die Auswirkung von Fludioxonil auf die Konzentration intrazellulärer Osmolyte in *M. oryzae* wurde bisher nicht untersucht. Da eine Aktivierung des HOG-Signalwegs durch hyperosmotischen Stress in *M. oryzae* zur Erhöhung der intrazellulären Arabitolkonzentration und Glycerolkonzentration führt, liegt die Vermutung nahe, dass die Applikation von Fludioxonil analog zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentrationen dieser beiden Osmolyte führt. Dies sollte folgend adressiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Methode etabliert werden, um aus *M. oryzae* Primärmetabolite zu extrahieren und diese mittels HPAEC-PAD (2.3.7) zu quantifizieren. Dabei konnten Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose als die vier Carbohydrate mit den höchsten intrazellulären Konzentrationen in *M. oryzae* ermittelt werden, was die veröffentlichten Daten von Dixon *et al.* (1999) bestätigt (3.3.2, Abb. 14).

Im Folgenden beschrieben wurde der Einfluss unterschiedlicher externer Stimuli auf die intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose sowohl nach 5 h als auch nach 24 h untersucht.

3.3.2 Osmotischer Stress und Fludioxonil-Stress führen zur intrazellulären

Akkumulation von Arabitol in *Magnaporthe oryzae*

Zur Überprüfung möglicher Veränderungen der intrazellulären Konzentration von Primärmetaboliten bei Wachstum unter hyperosmotischem Stress wurde *MoWT* in CMG-Flüssigmedium (Komplettmedium mit 2 % Glukose, 2.3.7.1) kultiviert und mit KCl induziert. 24 h nach Induktion mit KCl wurde eine im Vergleich zu vor der Induktion erhöhte Menge an Arabitol gemessen (Abb. 14). Die publizierten Daten von Dixon *et al* (1999), einer durch hyperosmotischen Stress induzierten Arabitol-Akkumulation in *M. oryzae*, konnten somit bestätigt werden.

Um herauszufinden ob Fludioxonilapplikation durch die Wirkstoff-bedingte Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs zu einer Erhöhung der intrazellulären Osmolytkonzentration in *M. oryzae* führt, wurde *MoWT* mit 10 µg/ml Fludioxonil induziert und die intrazellulären Konzentrationen der vier Carbohydrate Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose nach Probenaufarbeitung quantifiziert. 24 h nach Fludioxonilapplikation wurde eine deutlich erhöhte Menge an Arabitol und eine leicht erhöhte Menge an Glycerol gemessen im Vergleich zu vor der Induktion. Die intrazelluläre Konzentration an Arabitol 24 h nach Fludioxonilapplikation war geringer im Vergleich zu 24 h nach Induktion mit KCl. Bei der Behandlung von *MoWT* mit H₂O als Negativ-Kontrolle konnten keine Veränderungen der intrazellulären Konzentrationen an Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose festgestellt werden (Abb. 14).

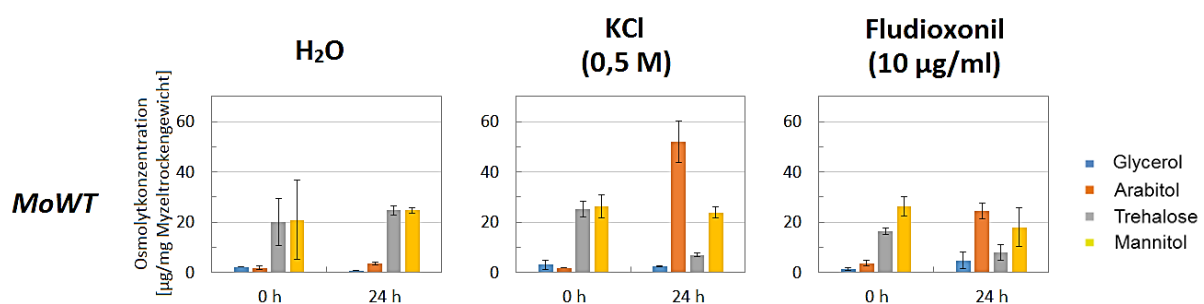


Abb. 14: Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in *MoWT* als Reaktion auf hyperosmotischen Schock oder Fludioxonil-Stress sowie auf H₂O als Kontrolle. Angegeben sind die gemessenen Carbohydratmengen bezogen auf Myzeltrockengewicht jeweils 0 h (= vor Applikation) und 24 h nach Stressapplikation. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

Als Kontrolle wurde die lof-Mutante $\Delta Mohog1$ analog zu *MoWT* kultiviert, mit H₂O, KCl oder Fludioxonil behandelt, und die intrazellulären Carbohydramengen bestimmt (Abb. 15).

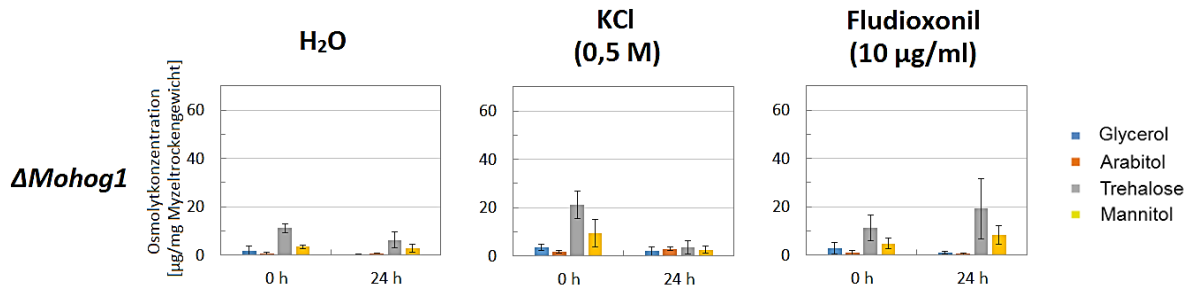


Abb. 15: Intrazelluläre Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in $\Delta Mohog1$ nach hyperosmotischem Schock oder Fludioxonil-Applikation sowie nach Applikation von H₂O als Kontrolle. Angegeben sind die gemessenen Carbohydramengen bezogen auf Myzeltrockengewicht jeweils 0 h (= vor Applikation) und 24 h nach Stressapplikation. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

Bei unbehandelter Kultur wurden in $\Delta Mohog1$ in Übereinstimmung mit veröffentlichten Daten (Dixon *et al.*, 1999) geringere Mengen von Mannitol im Vergleich zu *MoWT* gemessen. Nach Behandlung mit 0,5 M KCl als osmotischem Stressor konnten in Übereinstimmung mit der Literatur (Dixon *et al.*, 1999) keine Erhöhungen der intrazellulären Carbohydratkonzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kultur festgestellt werden (Abb. 15). Auch nach Applikation des Fungizids Fludioxonil und nach Behandlung mit H₂O waren keine signifikanten Konzentrationsänderungen festzustellen.

Für eine Aktivierung der MAPK MoHog1p sowie für ein Wachstum auf osmotischem Stressmedium ist die Funktionalität des HOG-Signalwegs essentiell (Jacob *et al.*, 2015). Mutanten mit inaktiviertem Signalweg sind nicht in der Lage auf osmotischem Stressmedium zu wachsen. Die Auswirkungen von hyperosmotischem Schock auf die Konzentration intrazellulärer Carbohydrate wurden in den lof-Mutanten $\Delta Moypd1$, $\Delta Mossk1$, $\Delta Mossk2$ und $\Delta Mopbs2$ untersucht. Die Mutantenstämme wurden von Dr. Stefan Jacob (IBWF gGmbH, Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt (Jacob *et al.*, 2015). In diesen Mutantenstämmen konnten nach Behandlung mit 0,5 M KCl analog zu $\Delta Mohog1$ (Abb. 15) keine Erhöhungen der intrazellulären Carbohydratkonzentrationen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.3 Intrazelluläre Akkumulation von Glycerol und Mannitol in *Magnaporthe oryzae* als schnelle und transiente Reaktion auf hyperosmotischen Schock

Bei Kultivierung von *MoWT* mit KCl konnten nach 5 h erhöhte Mengen an Glycerol, Mannitol und Arabitol gemessen werden, die Trehalosemenge blieb unverändert. 24 h nach Induktion mit hyperosmotischem Stress war die Menge an Arabitol noch stärker erhöht als nach 5 h, die Mengen an Glycerol und Mannitol hingegen waren nach 24 h wieder auf die Ausgangswerte vor der Stressinduktion gesunken, die Trehalosemenge war nach 24 h geringer als vor Induktion (Abb. 16).

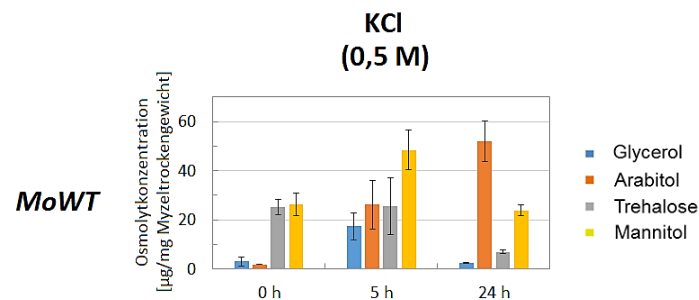


Abb. 16: Dynamische Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in *MoWT* als Reaktion auf hyperosmotischen Schock. Angegeben sind die gemessenen Carbohydramengen bezogen auf Myzeltrockengewicht jeweils 0 h (= vor Applikation), 5 h nach und 24 h nach KCl-Applikation. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

5 h nach Induktion von *MoWT* mit Fludioxonil konnten Veränderungen der intrazellulären Carbohydramengen nachgewiesen werden, die äquivalent waren zu den Änderungen 5 h nach Induktion mit 0,5 M KCl: Nach Fludioxonil-Applikation waren die gemessenen Mengen an Glycerol, Mannitol und Arabitol im Vergleich zum Zeitpunkt vor Fludioxonil-Applikation und analog zur Induktion mit KCl signifikant erhöht (Anhang Abb. 32).

3.3.4 Die intrazelluläre Akkumulation von Glycerol, Mannitol und Arabitol in *Magnaporthe oryzae* erfolgt nicht generell durch Zellstress

Der Nachweis, dass eine Akkumulation von Glycerol, Mannitol und Arabitol nicht generell durch Zellstress erfolgt, sondern tatsächlich HOG-Signalweg-assoziiert ist, wurde durch Behandlung von *MoWT* mit dem Antibiotikum Geneticin erbracht. Nachdem schon nachgewiesen wurde, dass nach Behandlung von Konidien des Stammes *MoHOG1::GFP* mit Geneticin keine Translokation von MoHog1p in den Zellkern erfolgt (3.2.3), wurde nach Applikation von Geneticin keine signifikante Veränderung der intrazellulären Carbohydramengen festgestellt (Anhang Abb. 31).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass in *M. oryzae* sowohl osmotischer Salzstress als auch Fludioxonil-Stress HOG-Signalweg-abhängig zur intrazellulären Akkumulation von Osmolyten führt, hauptsächlich und langfristig zur Akkumulation von Arabitol.

Um zu untersuchen, ob andere den HOG-Signalweg modulierenden Stimuli (3.2.2, 3.2.3, 3.2.4; Jacob *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2015) die intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose beeinflussen, wurde *MoWT* in CMG-Flüssigmedium kultiviert und die Konzentrationen dieser vier Carbohydrate vor und nach Stressapplikation bestimmt.

3.3.5 Nur osmotische Stimuli als Aktivatoren des HOG-Signalwegs führen zur intrazellulären Anreicherung von Osmolyten in *Magnaporthe oryzae*

Es ist bekannt, dass NaNO_2 -Stress zur Phosphorylierung von MoHog1p führt (Jacob *et al.*, 2014). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass MoHog1p in Konidien des Stammes *MoHOG::GFP* nach Behandlung mit NaNO_2 oder mit CoCl_2 sowie bei Hitzestress in den Zellkern transloziert (3.2.4). Es wurde untersucht, ob diese Stimuli auch zu einer Änderung von intrazellulären Osmolyten führen.

Sowohl nach Behandlung von *MoWT* mit NaNO_2 (0,2 M), als auch nach Behandlung mit CoCl_2 (2 mM), sowie bei Kultivierung unter Hitzestress (40 °C) konnten nach 5 h und nach 24 h keine signifikanten Änderungen der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Osmotischer Zuckerstress mit 1 M Sorbitol hingegen führte in *MoWT* zu analogen Veränderungen der intrazellulären Osmolytkonzentrationen wie bei osmotischem Salzstress mit 0,5 M KCl (3.3.6, Abb. 17).

Um zu untersuchen, ob osmotischer Salzschock bzw. osmotischer Zuckerschock Sensor-HK-spezifisch zu unterschiedlichen zellulären Antwortreaktionen auf Ebene der intrazellulären Osmolytproduktion führt, wurden die entsprechenden lof-Mutanten analog zu *MoWT* kultiviert, mit KCl bzw. Sorbitol behandelt und die Mengen an intrazellulären Carbohydraten bestimmt.

3.3.6 Die Osmolytproduktion als Reaktion auf Salzchock oder Zuckerschock ist nicht MoSln1p- oder MoHik1p-abhängig

Mutanten mit inaktiviertem HK-Gen *MoSLN1* und Mutanten mit inaktiviertem HK-Gen *MoHIK1* sind differenziell in ihrem Wachstum auf Stressmedien gehemmt: $\Delta Mohik1$ kann auf Medium mit osmotischem Salzstress besser wachsen als $\Delta Mosln1$, im Gegensatz dazu kann $\Delta Mosln1$ auf Medium mit osmotischem Zuckerstress besser wachsen als $\Delta Mohik1$. Die Mutante $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ ist sowohl bei Salzstress als auch bei Zuckerstress, ebenso wie die Mutante $\Delta Mohog1$ in ihrem Wachstum gehemmt (Jacob *et al.*, 2014).

Dies führte zur Hypothese, dass MoHik1p und MoSln1p als spezifische Sensoren für osmotischen Zucker- bzw. Salzstress fungieren. Bei Fehlen der MAPK MoHog1p oder einer der beiden HK-Sensoren MoHik1p bzw. MoSln1p würde somit bei entsprechendem Stressor im Medium eine Signalübertragung und somit eine physiologische zelluläre Antwortreaktion nicht möglich sein, was in der Hemmung des Wachstums resultieren würde (Jacob *et al.*, 2014).

Es wurde untersucht, ob – analog zu Beobachtungen von Wachstumsversuchen auf Festmedien mit dauerhaftem Salz- bzw. Zuckerstress – die Abwesenheit von einzelnen HKs im Phosphorelaysystem auch eine unterschiedliche Auswirkung auf die HOG-Signalweg-abhängige Produktion von Osmolyten bei osmotischem Salzchock im Gegensatz zu osmotischem Zuckerschock hat. Dafür wurden die Stämme *MoWT*, $\Delta Mohik1$, $\Delta Mosln1$, $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ und $\Delta Mohog1$ in CMG-Flüssigmedium kultiviert und die Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose vor und nach Induktion mit 0,5 M KCl bzw. 1 M Sorbitol bestimmt (Abb. 17).

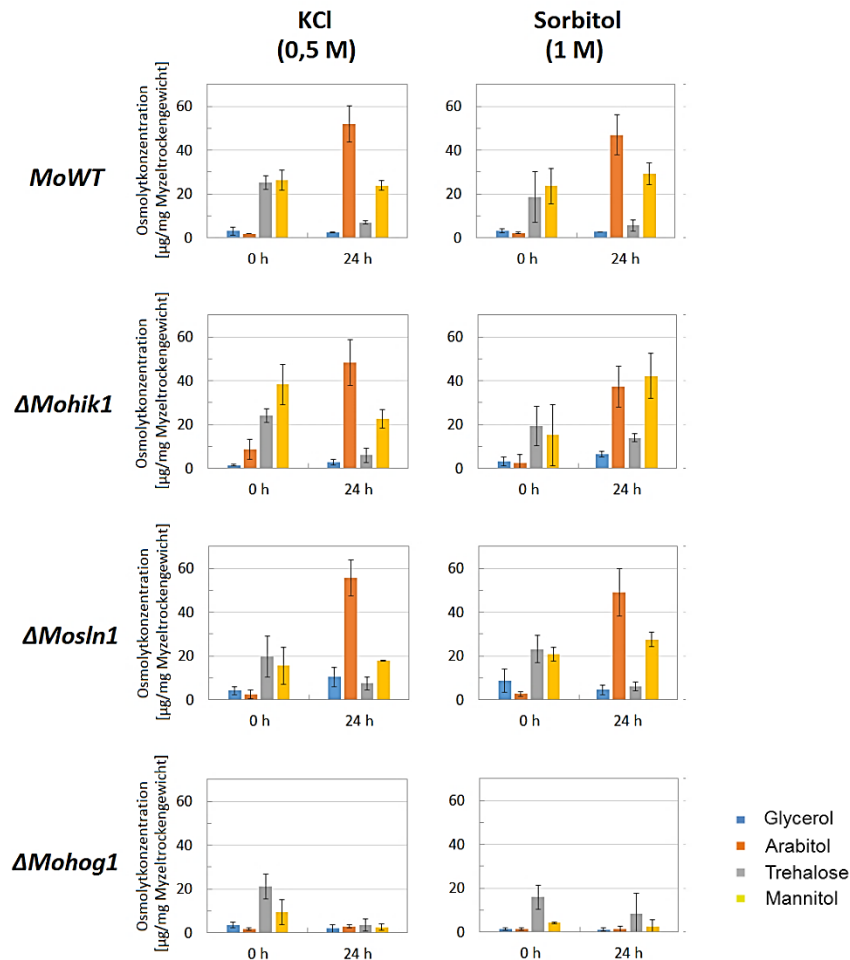


Abb. 17: Vergleich der Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in *MoWT*, Δ *Mohik1*, Δ *Mosln1* und Δ *Mohog1* als Reaktion auf hyperosmotischen Salzschock (0,5 M KCl) bzw. hyperosmotischen Zuckerschock (1 M Sorbitol). Angegeben sind die gemessenen Carbohydratmengen bezogen auf Myzelrockgewicht jeweils 0 h (= vor Applikation) und 24 h nach Stressapplikation. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

Die Veränderungen der Carbohydratkonzentrationen 24 h sowohl nach osmotischem Salzschock als auch nach osmotischem Zuckerschock waren in *MoWT*, Δ *Mohik1* und Δ *Mosln1* ähnlich: Bei diesen Stämmen war die gemessene Arabitol-Menge 24 h nach Stressinduktion signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu konnten in Δ *Mohog1* keine deutlichen Veränderungen der intrazellulären Carbohydratkonzentrationen nach KCl- bzw. Sorbitol-Zugabe festgestellt werden (Abb. 17).

Die relativen intrazellulären Verhältnisse der vier Carbohydrate Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in unbehandelten Kulturen unterschieden sich in den untersuchten Stämmen Δ *Mohik1*, Δ *Mosln1*, Δ *Mohik1/\Delta**Mosln1* nicht signifikant. Tendenziell war in unbehandelter Kultur von Δ *Mosln1* und 5 h sowohl nach Salzschock als auch Zuckerschock das Verhältnis von Glycerol-Menge zu Arabitol-Menge größer im Vergleich zu den anderen Stämmen, in

$\Delta Mohik1$ tendenziell kleiner im Vergleich zu den anderen Stämmen. Bei unbehandelten Kulturen und bei Behandlung mit H_2O (Anhang Abb. 32) war das Verhältnis von Trehalose-Menge zu Mannitol-Menge in $\Delta MosIn1$ tendenziell größer und in $\Delta Mohik1$ tendenziell kleiner.

Die Veränderung der Carbohydratkonzentrationen im Stamm $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$, in dem beide HKs inaktiviert sind, war sowohl 5 h nach osmotischem Salzschock als auch nach osmotischem Zuckerschock ähnlich im Vergleich zu den Stämmen *MoWT*, $\Delta Mohik1$ und $\Delta MosIn1$. Nach 24 h jedoch waren die Mengen an Arabitol im Stamm $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$ geringer als in den Stämmen *MoWT*, $\Delta Mohik1$ und $\Delta MosIn1$ 24 h nach Induktion mit KCl oder Sorbitol (Anhang Abb. 32).

5 h nach osmotischem Salzschock war die Mannitol-Menge in $\Delta MosIn1$ und in $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$ geringer als in *MoWT* und $\Delta Mohik1$ (Anhang Abb. 32).

Nach Behandlung aller Stämme mit H_2O als Negativkontrolle konnten keine Veränderungen der Carbohydratmengen gemessen werden (Anhang Abb. 32).

Bei den lof-Mutanten $\Delta Mohik1$ und $\Delta MosIn1$ konnte nach Applikation von KCl bzw. Sorbitol kein Unterschied in der intrazellulären Akkumulation von Arabitol festgestellt werden. Diese Beobachtungen korrelieren mit Ergebnissen zum Phosphorylierungsgrad von MoHog1p (Jacob *et al.*, 2014) und auch mit den Beobachtungen der zellulären Lokalisation von MoHog1p in diesen beiden Mutanten (3.2.6), jeweils nach Applikation von hyperosmotischem Salz- oder Zuckerstress: Es konnten bei diesen Untersuchungen keine Unterschiede zwischen $\Delta Mohik1$, $\Delta MosIn1$ und *MoWT* festgestellt werden. In allen Stämmen konnte nach Stressapplikationen eine vergleichbare Stärke des Phosphorylierungssignals von MoHog1p sowie auch eine Translokation von MoHog1p in den Zellkern nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zur Osmolyt-Akkumulation, zum Phosphorylierungsgrad und zur Zellkerntranslokation von MoHog1p stehen jedoch im Kontrast zu Beobachtungen von Wachstumsversuchen von *MoWT*, $\Delta Mohik1$, $\Delta MosIn1$ und $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$ auf Festmedien mit Salzstress bzw. Zuckerstress (Jacob *et al.*, 2014).

Für eine Translokation von MoHog1p in den Zellkern, ausgelöst durch hyperosmotischen Stress, ist die Anwesenheit von MoHik1p nicht notwendig, bei Fludioxonil-Stress hingegen essentiell (3.2.6). Um zu untersuchen, ob mögliche Unterschiede der Perzeption von hyperosmotischem Stress und Fludioxonil-Stress auch für die intrazelluläre Akkumulation von Osmolyten relevant sind, wurden $\Delta Mohik1$, $\Delta MosIn1$ und $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$ in CMG-Flüssigmedium mit Fludioxonil kultiviert und die intrazellulären Carbohydratkonzentrationen bestimmt.

3.3.7 Die Mechanismen der Initiation der Osmolytproduktion als Reaktion auf osmotischen Schock oder auf Fludioxonil-Stress sind unterschiedlich

Es wurde bereits beschrieben, dass sich die Menge an phosphoryliertem MoHog1p sowohl nach Applikation von Fludioxonil als auch nach osmotischem Schock in *MoWT* und in der Sensor-HK-lof-Mutante $\Delta MosIn1$ stark erhöht (Jacob *et al.*, 2015). In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass in Analogie MoHog1p in diesen beiden Stämmen sowohl bei Fludioxonil-Stress als auch bei hyperosmotischem Stress im Zellkern lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu kommt es in den Sensor-HK-lof-Mutanten $\Delta Mohik1$ und $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$ nach Fludioxonil-Applikation weder zu einer Verstärkung des Phosphorylierungssignals von MoHog1p noch zu einer Veränderung der zellulären Lokalisation von MoHog1p (Jacob *et al.*, 2015; 3.2.6). Diese beiden Stämme sind im Gegensatz zu *MoWT* und $\Delta MosIn1$ in der Lage auf Fludioxonil-haltigem Medium zu wachsen (Jacob *et al.*, 2015). Um herauszufinden, ob sich Fludioxonil-Stress im Vergleich zu hyperosmotischem Stress Sensor-spezifisch und HOG-Signalweg-abhängig auf die intrazellulären Carbohydratkonzentrationen auswirkt, wurden *MoWT*, $\Delta MosIn1$, $\Delta Mohik1$, $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1$ und $\Delta Mohog1$ wie oben beschrieben kultiviert und mit Fludioxonil bzw. KCl induziert. Die Mengen an Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose wurden sowohl vor als auch 5 h und 24 h nach den Stress-Behandlungen bestimmt (Abb. 18).

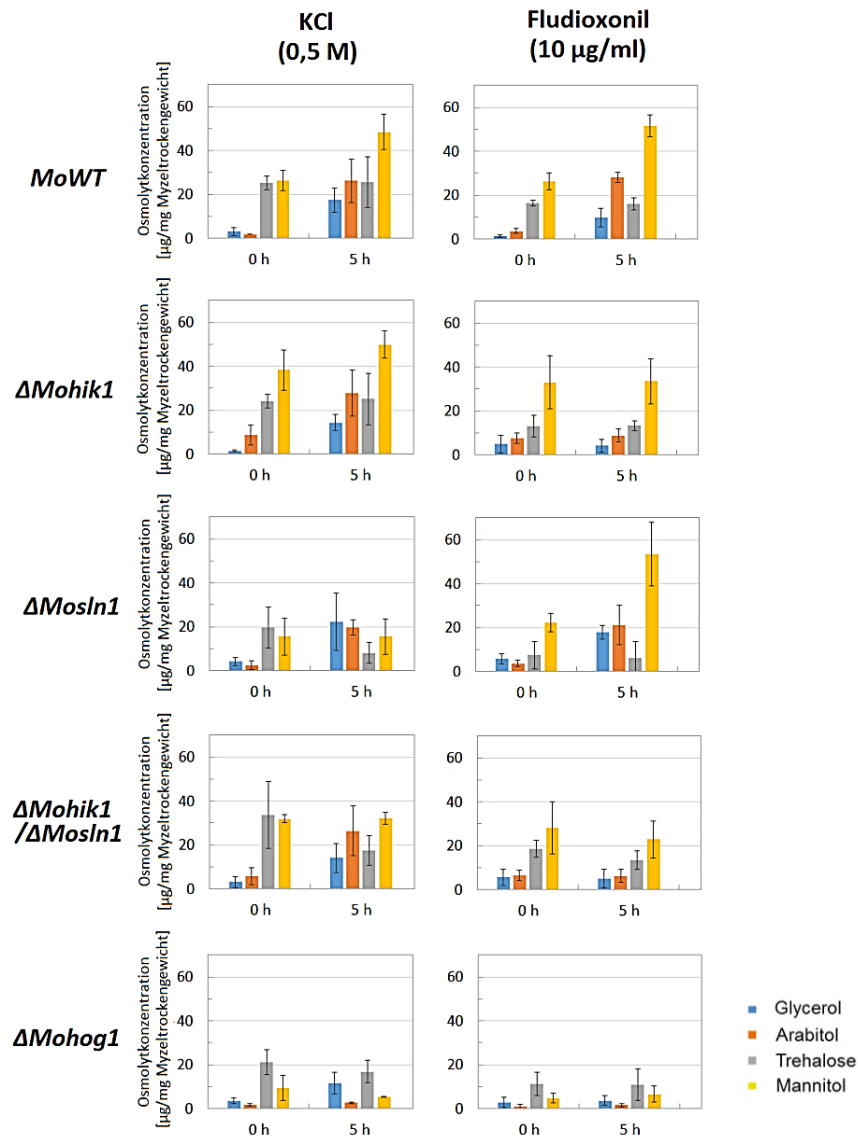


Abb. 18: Vergleich der Veränderung der intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in *MoWT*, *ΔMohik1*, *ΔMosln1*, *ΔMohik1/ΔMosln1* und *ΔMohog1* als Reaktion auf hyperosmotischen Schock bzw. Fludioxonil-Stress. Angegeben sind die gemessenen Carbohydratmengen bezogen auf Myzeltrockengewicht jeweils 0 h (= vor Applikation) und 5 h nach Stressapplikation. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

Bei allen Stämmen außer *ΔMohog1* waren nach Behandlung mit KCl deutliche Veränderungen der intrazellulären Carbohydratkonzentrationen festzustellen. Die gemessenen Mengen an Glycerol und Arabitol waren 5 h nach Behandlung erhöht. Die Änderung der intrazellulären Carbohydratkonzentrationen der Mutante *ΔMosln1* war nach Fludioxonil-Induktion äquivalent zur Änderung in *MoWT* nach Fludioxonil-Induktion, und ähnlich zur Änderung nach Induktion mit KCl. Im Gegensatz dazu blieben in den Stämmen *ΔMohik1*, *ΔMohik1/ΔMosln1* und *ΔMohog1* die intrazellulären Carbohydratkonzentrationen nach Fludioxonil-Applikation unverändert (Abb. 18).

Nach hyperosmotischem Salzschock war für $\Delta Mos1n1$ keine Erhöhung der Menge an Mannitol zu messen, im Gegensatz zur Induktion mit Fludioxonil (Abb. 18) oder nach hyperosmotischem Zuckerschock (Anhang Abb. 32) und im Gegensatz zu *MoWT*, $\Delta Mohik1$, und $\Delta Mohik1/\Delta Mos1n1$.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich nachgewiesen werden, dass die Mechanismen der Initiation der Osmolytproduktion als unmittelbare Reaktion entweder auf osmotischen Stress oder Fludioxonil-Stress unterschiedlich sind: Für eine intrazelluläre Anreicherung von Arabitol als Reaktion auf hyperosmotischen Schock ist die Anwesenheit der beiden sensorischen HKs MoHik1p und MoSln1p nicht notwendig. Im Gegensatz dazu ist MoHik1p für eine Anreicherung von Osmolyten als Reaktion auf Fludioxonil-Stress essentiell. Diese Ergebnisse unterstützen die fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen (3.2.6) zur dynamischen zellulären Lokalisationsänderung von MoHog1p als Indikator für eine Aktivierung des HOG-Signalwegs als Reaktion auf akuten hyperosmotischen Stress und Fludioxonil-Stress.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden molekulare Regulationsmechanismen des „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalwegs in *Magnaporthe oryzae* (*M. oryzae*) untersucht. Mit besonderem Fokus zum einen auf die Wirkungsweise des Fungizids Fludioxonil und zum anderen auf putative Funktionen sensorischer Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen (HKs), die in diesem Signalweg beteiligt sind. Grundlegende Fragen zum Signaltransduktionssystem konnten adressiert werden. Die Aufklärung des fungiziden Wirkmechanismus von Fludioxonil ist von höchstem Interesse für die anwendungsorientierte Forschung, und die wissenschaftliche Gemeinschaft im Bereich der Grundlagenforschung ist sehr stark an den molekularen Mechanismen der Signaltransduktion im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs interessiert.

4.1 Der Wirkmechanismus von Fludioxonil

Zur Erweiterung des Verständnisses der Wirkungsweise von Fludioxonil wurden Untersuchungen durchgeführt, um folgende noch ungeklärte Fragen zu beantworten, die auch in der derzeitigen Literatur zu finden sind (Kilani und Fillinger, 2016):

Wird Fludioxonil-Resistenz ausschließlich durch Mutationen in solchen Genen vermittelt, welche Gruppe III HKs bzw. Komponenten des HOG-Signalwegs kodieren, oder gibt es noch weitere Resistenzmechanismen?

Sind bei der Signaltransduktion im HOG-Signalweg, welche zum einen durch Fludioxonil-Stress und zum anderen durch hyperosmotischen Stress initiiert wird, dieselben Komponenten beteiligt?

Für die Beantwortung der ersten Frage – ob es noch weitere, bisher unbekannte Resistenzmechanismen gegenüber Fludioxonil gibt – wurde im Fludioxonil-suszeptiblen, phytopathogenen filamentösen Ascomycet *M. oryzae* mittels reverser Genetik gezielt die Gensequenz von *MoPTP2* manipuliert, um herauszufinden, ob deren Genprodukt, die putative Phosphatase MoPtp2p, in der Regulation des HOG-Signalwegs beteiligt sein könnte.

4.1.1 Überexpression der MoHog1p-dephosphorylierenden Phosphatase

MoPtp2p vermittelt Fludioxonil-Resistenz

Phosphorylierungssignale sind in vielen zellulären Prozessen von enormer Bedeutung. Deshalb gehören Kinasen und Phosphatasen zu einer Gruppe intensiv untersuchter Enzyme (Ghosh *et al.*, 2014). Die reversible Proteinphosphorylierung auf Serin-, Threonin-, Tyrosin- oder Histidinresten spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation physiologischer zellulärer Mechanismen (Ravikumar *et al.*, 2014). In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) wird die Proteinphosphorylierung auf 30 % des Proteoms geschätzt und steuert viele grundlegende zelluläre Prozesse (Ptacek *et al.*, 2005; Ficarro *et al.*, 2002). In filamentösen Pilzen beeinflussen Proteinphosphorylierungen z.B. die Biosynthese von Sekundärmetaboliten (Rauscher *et al.*, 2016; Choi und Shim, 2008), die Regulation von Signalwegen für die Hyphenentwicklung (Kosmidou *et al.*, 2001) oder circadiane Rhythmen (Yatzkan *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2015).

Im phytopathogenen Pilz *M. oryzae* regulieren Proteinphosphorylierungen die infektionsbedingte Morphogenese über verschiedene Signalwege, z.B. über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) MoKss1p (früher Pmk1) oder die cAMP-abhängige Proteinkinase MoCpkA (Franck *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2018; Thines *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007). Um die Reversibilität von Proteinphosphorylierungen zu gewährleisten, werden Proteinphosphatasen benötigt. Obwohl Phosphatasen eine wichtige Rolle in der Pilzphysiologie zu haben scheinen, existieren bisher nur wenige Studien zu diesem Aspekt. Die Funktionen negativer Regulatoren, die Signalkomponenten in MAPK-Signalwegen posttranslational inaktivieren, sind weitaus weniger gut charakterisiert als die Funktionen positiver Regulatoren (Lee *et al.*, 2014). Im ersten Teil dieser Arbeit sollten Phosphatasen untersucht werden, die als Regulatoren an der fungiziden Wirkung des den HOG-Signalweg hyperaktivierenden Phenylpyrrols Fludioxonil beteiligt sein könnten. Dafür wurden Gene in *M. oryzae* identifiziert, deren Homologe im Genom von *S. cerevisiae* Phosphatasen kodieren, die als Interaktionspartner von Hog1p beschrieben sind.

In *S. cerevisiae* sind bisher 6 Phosphatase-kodierende Gene beschrieben, deren Genprodukte an der Regulation des HOG-Signalwegs beteiligt sind (Anhang Tab. 3). Die Phosphatase Ptc1p dephosphoryliert den phosphorylierten Threonin-Rest der Aminosäureposition 174, und die Phosphatasen Ptp2p und Ptp3p dephosphorylieren den phosphorylierten Tyrosin-Rest 176 der MAPK Hog1p. Dadurch wird die Aktivität der MAPK verändert und somit eine über den HOG-Signalweg gesteuerte zelluläre Antwortreaktion reguliert (Maeda *et al.*, 1993; Warmka *et al.*, 2001). Eine Inaktivierung des Gens *SLN1* resultiert in *S. cerevisiae* in Letalität – bedingt durch eine Hyperaktivierung der MAPK-

Kaskade im HOG-Signalweg und eine damit verbundene unphysiologische zelluläre Antwortreaktion. Durch Überexpression der Phosphatase Ptp2p wird die MAPK Hog1p verstärkt dephosphoryliert, wodurch eine genetische Inaktivierung von *SLN1* möglich wird (Wurgler-Murphy et al., 1997).

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* ist eine genetische Inaktivierung von *MoSLN1* in *M. oryzae* möglich, weil ein Ausbleiben der Funktion der HK MoSln1p, nämlich die kontinuierliche Phosphatgruppenübertragung auf MoYpd1p, vermutlich durch MoHik1p sowie möglicherweise durch weitere HKs kompensiert werden kann (Jacob et al., 2014). Im Genom von *M. oryzae* sind insgesamt 10 verschiedene HKs annotiert. Im Gegensatz dazu ist im Genom der Hefe *S. cerevisiae* *SLN1* als einziges HK-Gen vorhanden. Auch durch Doppel-Inaktivierung der die Sensor-HKs *MoSLN1* und *MoHIK1* kodierenden Gene wird der HOG-Signalweg in *M. oryzae* nicht hyperaktiviert. Die entsprechende „loss of function“-Mutante (lof-Mutante) $\Delta MoHik1/\Delta MoSln1$ ist vital (Jacob et al., 2014). Jedoch ist es möglich, im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, den HOG-Signalweg in *MoWT* durch Fludioxonil-Applikation zu hyperaktivieren. Es stellte sich die Frage, ob analog zu Beobachtungen bei *S. cerevisiae*, einer Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs durch Überexpression von MoHog1-dephosphorylierenden Phosphatasen entgegengesteuert werden kann. Eine entsprechende Phosphatase-Überexpressions-Mutante sollte also durch eine höhere Dephosphorylierungsrate von phosphoryliertem MoHog1p im Vergleich zu *MoWT* weniger suszeptibel gegenüber Fludioxonil sein. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden dafür vier Phosphatase-kodierende Gene in *M. oryzae* mittels BLASTp identifiziert (Anhang Tab. 3), deren Homologe in *S. cerevisiae* die MAPK Hog1p dephosphorylieren, und schließlich das die Phosphatase MoPtp2p kodierende Gen *MoPTP2* für Untersuchungen in *M. oryzae* ausgewählt.

Es konnte erstmals erfolgreich gezeigt werden, dass eine Dephosphorylierung der stressbedingt phosphorylierten MAPK MoHog1p durch MoPtp2p von essentieller Bedeutung ist hinsichtlich der Fludioxonil-Suszeptibilität. Dabei wurde festgestellt, dass eine verstärkte Dephosphorylierung von MoHog1p durch Überexpression der Phosphatase MoPtp2p ähnliche phänotypische Auswirkungen hat wie die genetische Inaktivierung von *MoHOG1*. Sowohl Abwesenheit von MoHog1p als auch die Überexpression von MoPtp2p führen zu erhöhter Fludioxonil-Resistenz zum einen und zum anderen zu erhöhter Osmosensitivität im entsprechenden Mutantenstamm (Abb. 4, Abb. 5, Abb. 8). In Übereinstimmung damit führt die Inaktivierung des die Phosphatase MoPtp2p kodierenden Gens *MoPTP2* gegensätzlich zu einem Fludioxonil-hypersensitiven Phänotyp im Vergleich zu *MoWT* (Abb. 4, Abb. 5). Analoge Beobachtungen sind im Hefepilz *Cryptococcus neoformans* beschrieben: Inaktivierung des Gens, welche die zu Ptp2p homologe Phosphatase kodiert, resultierte in erhöhter Fludioxonil-Suszeptibilität (Lee et al., 2014); jedoch wurde bisher noch nie mit

einem Überexpressionsstamm gearbeitet. Mittels Western-Blot-Experimenten mit spezifischem Phospho-Hog1p-Antikörper konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *MoPTP2* sowohl zu leicht verringerter basaler Phosphorylierung des MoHog1p-Pools im Vergleich zu *MoWT* führt, als auch zu einer deutlich reduzierten Zunahme von phosphoryliertem MoHog1p nach Applikation des den HOG-Signalweg hyperaktivierenden Fungizids Fludioxonil im Vergleich zu *MoWT* (Abb. 7). Im Gegensatz dazu war in der lof-Mutante $\Delta Moptp2$ mit inaktiverter Phosphatase eine erhöhte basale Menge an phosphoryliertem MoHog1p im Vergleich zu *MoWT* zu detektieren, in Übereinstimmung mit Beobachtungen zu $\Delta ptp2$ in *S. cerevisiae* (Jacoby *et al.*, 1997). Dies ist durch eine reduzierte Dephosphorylierungsrate aufgrund der Abwesenheit der Phosphatase MoPtp2p zu erklären.

Zusammengefasst stellt die MoPtp2p-vermittelte Dephosphorylierung von MoHog1p einen molekularen Mechanismus zur Termination der Signalübertragung im HOG-Signalweg dar, sowohl nach Aktivierung durch osmotischen Stress, als auch bei Hyperaktivierung durch das Fungizid Fludioxonil.

Durch die Regulation des Phosphoryierungsgrads von MoHog1p ist die Phosphatase MoPtp2p also unmittelbar an der Steuerung der zellulären Antwortreaktion nach HOG-Signalweg-Aktivierung beteiligt. Das bisherige Modell des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* kann somit um die Phosphatase MoPtp2p erweitert werden (Abb. 19).

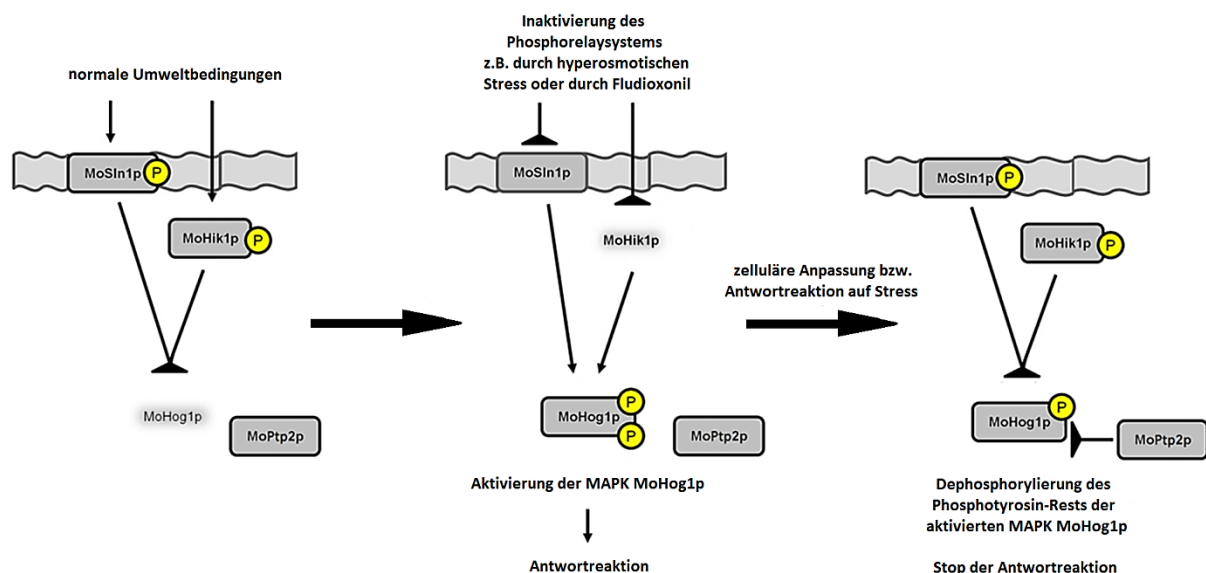


Abb. 19: Ein Modell, welches die Dephosphorylierung und somit Inaktivierung der aktivierten MAPK MoHog1p in *Magnaporthe oryzae* beschreibt. Nach dualer Phosphorylierung der MAPK MoHog1p am Threonin- und Tyrosin-Rest des TxY-Motifs als Folge von hyperosmotischem Stress oder Fludioxonil-Stress erfolgt eine MoHog1p-vermittelte zelluläre Antwortreaktion bis der Phosphotyrosin-Rest schließlich durch MoPtp2p dephosphoryliert wird und die zelluläre Antwortreaktion stoppt (modifiziert nach Jacob *et al.*, 2014).

Neben der nachgewiesenen HOG-Signalweg-modulierenden Funktion von MoPtp2p wurden in den untersuchten Mutanten *MoEFA::PTP2* und Δ *Moptp2* weitere phänotypische Unterschiede sowohl zu *MoWT* als auch zu Δ *Mohog1* festgestellt, was darauf hindeutet, dass MoPtp2 nicht ausschließlich an der Dephosphorylierung von MoHog1p und somit nicht nur an der Regulation des HOG-Signalwegs beteiligt ist: Es wurde beobachtet, dass die Überexpression von *MoPTP2* zu einer starken Verringerung der Konidienbildungsrate auf Komplettnutrientenmedium im Vergleich zu *MoWT* und Δ *Mohog1* führt. Des Weiteren besitzt die Überexpressionsmutante *MoEFA::PTP2* eine Resistenz gegenüber dem Chitin-interagierenden Farbstoff Calcofluor White und eine deutlich verringerte Anzahl an Protoplasten im Vergleich zu *MoWT* nach Inkubation von Myzel mit lytischen Enzymen (Tab. 2). Dies sind Hinweise auf eine veränderte Zellwandintegrität. Im Gegensatz dazu sind sowohl Konidienbildungsrate, Sensitivität gegenüber Calcofluor White und die Anzahl an Protoplasten nach Inkubation mit lytischen Enzymen in der lof-Mutante Δ *Moptp2* stark erhöht im Vergleich zu *MoWT* (Tab. 2). Darüber hinaus ist die Virulenz der Mutante *MoEFA::PTP2* auf Reispflanzen reduziert, die von Δ *Moptp2* hingegen unverändert im Vergleich zu *MoWT*.

Die MAPK MoSlT2p (früher Mps1) ist sowohl für die Konidiogenese, die Zellwandintegrität, als auch für die Pathogenität von *M. oryzae* wichtig. Inaktivierung des Gens *MoSLT2* resultiert in Zellwandveränderungen, annähernder Aufhebung der Konidienbildungsrate, sowie in Apathogenität der entsprechenden lof-Mutante (Xu *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* ist eine Regulation der homologen MAPK SlT2p durch die entsprechend homologe Phosphatase Ptp2p bereits nachgewiesen (Mattison *et al.*, 1999). Somit könnte auch in *M. oryzae* die Phosphatase MoPtp2p zusätzlich zur Dephosphorylierung von MoHog1p in der Dephosphorylierung von MoSlT2p beteiligt sein und somit könnten die phänotypischen Auswirkungen einer Überexpression von *MoPTP2*, welche vergleichbar sind mit der genetischen Inaktivierung von *MoSLT2* (Xu *et al.*, 1998), in der Manipulation der Regulation von MoSlT2p im Stamm *MoEFA::PTP2* begründet sein.

Die Phosphatase Ptp2p ist in Hefe stets im Zellkern lokalisiert (Mattison und Ota, 2000). Für ein besseres Verständnis der dynamischen Regulation von phosphoryliertem MoHog1p durch MoPtp2p sollten noch ergänzend Lokalisationsstudien zu MoPtp2p während der Aktivierung und Inaktivierung des HOG-Signalwegs durchgeführt werden, z.B. durch Fusion von MoPtp2p mit dem Fluoreszenzprotein RFP (Red Fluorescent Protein) und Expression des Konstrukts in *MoHOG1::GFP*. Für die Überprüfung einer direkten Interaktion von MoPtp2p mit MoHog1p sollten unbedingt z.B. Bimolekulare-Fluoreszenzkomplementations-Studien durchgeführt werden.

Mittels genetischer Manipulation von *M. oryzae* konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals ein Fludioxonil-resistenter Mutantenstamm durch Überexpression eines Proteinphosphatase-kodierenden Gens in einem phytopathogenem Pilz generiert werden. Bisher waren nur Resistenzen gegenüber Fludioxonil in Mutantenstämmen phytopthogener Pilze bekannt, in denen Gruppe III HK-kodierende Gene und HOG-Signalweg-Komponenten kodierende Gene inaktiviert oder sogenannte „multi drug resistance“-Effluxtransporter überexprimiert sind (Li *et al.*, 2014; Hahn, 2014).

Eine Resistenzbildung gegenüber Fludioxonil in Feldisolaten phytopathogener Pilze durch Aktivitätssteigerung von Hog1p-dephosphorylierenden Phosphatasen ist jedoch nicht zu erwarten, weil eine derartige Manipulation der Regulation des HOG-Signalwegs einhergeht mit erhöhter Sensitivität gegenüber osmotischem Stress, verringerter Konidienbildungsrate und reduzierter Virulenz in *M. oryzae*, also insgesamt einer verringerten Fitness, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Dies unterstreicht das Potential von HOG-Signalweg-hyperaktivierenden Fungiziden wie z.B. Fludioxonil hinsichtlich einer geringen Wahrscheinlichkeit von Resistenzbildungen.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die Bedeutung einer strikt kontrollierten Regulation des Phosphorylierungsgrads der MAPK MoHog1p hinsichtlich der physiologischen Antwortreaktion auf osmotischen Stress und einer unphysiologischen Hyperreaktion auf Fludioxonil-Stress erfolgreich dargestellt werden. Als Fazit liefert jener Teil der Arbeit erstmals detaillierte Ergebnisse zu den molekularen Mechanismen einer Proteinphosphatase-vermittelten Fungizidresistenz in einem filamentösen phytopathogenen Pilz gegenüber dem landwirtschaftlich sehr erfolgreich eingesetzten Fungizid Fludioxonil. Diese Ergebnisse können helfen, die molekularen Grundlagen des *mode of action* von HOG-Signalweg hyperaktivierenden Fungiziden zu verstehen und die Forschung auf dem Gebiet der allgemeinen Phytopathologie sowie des Resistenzmanagements zur Entwicklung neuer Strategien für den Pflanzenschutz voranzubringen.

Der Phosphorylierungsgrad der MAPK des HOG-Signalwegs ist also entscheidend am *mode of action* von Fludioxonil beteiligt, und damit einhergehend auch Hog1p-interagierende Phosphatasen als negative Regulatoren von Hog1-MAPKs. Es gibt demnach neben HK-abhängigen- noch weitere molekulare Mechanismen, die an der Suszeptibilität von phytopathogenen Pilzen gegenüber Fludioxonil beteiligt sind.

Weiterhin galt es im Rahmen dieser Arbeit zu klären, ob für eine Aktivierung des HOG-Signalwegs durch Fludioxonil dieselben Komponenten der Signaltransduktion benutzt werden wie bei einer Aktivierung des Signalwegs durch hyperosmotischen Stress.

Bei der experimentellen Bearbeitung zur Beantwortung dieser Frage konnten zugleich auch Erkenntnisse über putative molekulare Mechanismen von HKs erlangt werden. Die Hypothese einer spezifischen Perzeption von osmotischem Salzstress bzw. osmotischem Zuckerstress durch unterschiedliche HKs im Phosphorelaysystem von *M. oryzae* wurde ebenfalls überprüft.

4.1.2 Die Perzeptionen von Fludioxonil-Stress und hyperosmotischen Schocks sind unterschiedlich, die initialen zellulären Antwortreaktionen sind ähnlich

MAPKs können nach Aktivierung ihre zelluläre Lokalisation ändern (Hamel *et al.*, 2012). Die Translokation der MAPK vom Typ Hog1 vom Zytosol in den Zellkern ist eine unmittelbare Reaktion auf eine Aktivierung des HOG-Signalwegs.

Im nächsten Teil dieser Arbeit wurde die Beteiligung von HKs bei der Regulation des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* mittels *live-cell-imaging*-Fluoreszenzmikroskopie und Metabolom-Analysen untersucht. So konnten zum einen Hinweise auf mögliche molekulare Funktionen von HKs als potentielle Stressor-spezifische Sensoren im HOG-Signalweg gefunden werden, und zum anderen der *mode of action* und *mechanism of action* von Fludioxonil weiter aufgeklärt werden.

In dieser Arbeit wurde eine umfassende Charakterisierung der Aktivierung des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* anhand der subzellulären Lokalisation der MAPK MoHog1p durchgeführt. Dafür wurde MoHog1p mit dem Fluoreszenzprotein GFP fusioniert und sowohl in *MoWT* als auch in verschiedenen Mutantenstämmen mit inaktivierten Komponenten des HOG-Signalwegs exprimiert, gefolgt von Applikationen diverser Stimuli und fluoreszenzmikroskopischer Bestimmung der zellulären Lokalisation des Fusionsproteins MoHog1p-GFP (Anhang Tab. 4). Dabei konnten Hinweise auf molekulare Funktionen der dem HOG-Signalweg zugehörigen Sensor-HKs und deren Beteiligung in der Suszeptibilität gegenüber Fludioxonil erhalten werden.

Für unzählige Organismen ist eine durch extrazellulären hyperosmotischen Stress bedingte Erhöhung der intrazellulären Konzentration an primärmetabolischen niedermolekularen Substanzen beschrieben, um durch Erhöhung der intrazellulären Osmolarität dem extrazellulären hyperosmotischen Potential entgegenzuwirken und somit ein Wasser-

ausstrom aus der Zelle zu verhindern (Brown, 1978). In *M. oryzae* wird als Folge von hyperosmotischem Stress intrazellulär hauptsächlich Arabitol akkumuliert (Dixon *et al.*, 1999). Metabolomische Untersuchungen in *M. oryzae* bei Induktion mit HOG-Signalweg-modulierenden Fungiziden sind bisher nicht beschrieben. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal vergleichende Osmolyt-Analysen durchgeführt nach Induktion mit Fludioxonil bzw. hyperosmotischem Salzstress oder hyperosmotischem Zuckerstress.

Fludioxonil ist ein Wirkstoff aus der Fungizid-Klasse der Phenylpyrrole und wird seit über 20 Jahren erfolgreich als Fungizid eingesetzt (Börner, 2009; Kilani und Fillinger, 2016). Mit Hilfe von fluoreszenzmikroskopischen und metabolomischen Methoden wurden Fludioxonil-behandelte Konidien und Myzel verschiedener Mutantenstämme von *M. oryzae* untersucht. Durch Analyse der erhaltenen Daten können Rückschlüsse auf den *mode of action* und *mechanism of action* von Fludioxonil gezogen werden.

In Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die MAPK MoHog1p sowohl bei Fludioxonil-Stress als auch nach hyperosmotischem Schock in den Zellkern transloziert (Abb. 9, Abb. 11). Des Weiteren konnte erstmals festgestellt werden, dass neben hyperosmotischem Schock auch Fludioxonil-Stress eine intrazelluläre Akkumulation von Arabitol in *M. oryzae* bewirkt (Abb. 14).

Dies verdeutlicht, dass der *mode of action* von Fludioxonil mit der Initiierung der zellulären Antwortreaktion auf hyperosmotischen Stress zusammenhängt, obwohl kein hyperosmotischer Stress für die Zelle vorliegt. Durch Anreicherung intrazellulärer Osmolyte ohne extrazellulären hyperosmotischen Druck strömt Wasser in die Zelle; für das Aufblähen Fludioxonil-behandelter Zellen (Zhao *et al.*, 2007; Lew, 2010) könnte somit eine intrazelluläre Akkumulation von Arabitol in *M. oryzae* (Abb. 14) mitverantwortlich sein. Ob die intrazelluläre Akkumulation von Arabitol bei Fludioxonil-Stress unmittelbar an der fungiziden Wirkung beteiligt ist oder hingegen nur ein sekundärer Effekt, könnte durch Manipulation von Genen, die in der Arabitol-Biosynthese beteiligt sind, oder durch Expression von spezifischen Arabitol-Exportern in *M. oryzae*, gefolgt von Fludioxonil-Applikation überprüft werden. Interessanterweise ist in den Pilzen *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans* und *Botrytis cinerea*, die im Gegensatz zu *M. oryzae* bei hyperosmotischem Stress nicht Arabitol, sondern Glycerol intrazellulär akkumulieren, eine Fludioxonil-bedingte Hyperakkumulation von Glycerol nicht essentiell für die antibiotische Wirkung des Fungizids (Ochiai *et al.*, 2002; Upadhy *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Um mögliche Unterschiede in der Perzeption von Fludioxonil und hyperosmotischem Stress festzustellen, wurde die Zellkerntranslokation von MoHog1p und die Veränderung der intrazellulären Osmolytkonzentrationen nach Stressinduktion in lof-Mutanten des HOG-Signalwegs untersucht. Fludioxonil-Applikation führt in *MoWT* und im Stamm ΔMosIn1 sowohl zur Translokation von MoHog1p in den Zellkern, als auch zur intrazellulären Akkumulation von Arabitol (Abb. 13, Abb. 18). Im Stamm ΔMohik1 hingegen ist nach Fludioxonil-Applikation, weder eine Zellkerntranslokation von MoHog1p, noch eine Veränderung der intrazellulären Osmolytkonzentrationen festzustellen (Abb. 13, Abb. 18).

Diese Ergebnisse korrelieren sowohl mit Ergebnissen von bereits beschriebenen Phospho-Hog1p-Western-Blot Analysen in *M. oryzae* als auch mit Beobachtungen aus Wachstumstests der entsprechenden lof-Mutanten auf Fludioxonil-haltigen Medien: Bei Kultivierung von ΔMohik1 mit Fludioxonil kann keine Phosphorylierung von MoHog1p detektiert werden im Gegensatz zu *MoWT* und ΔMosIn1 ; ΔMohik1 kann auf Fludioxonil-haltigem Medium wachsen im Gegensatz zu *MoWT* und ΔMosIn1 (Jacob *et al.*, 2015).

In ΔMoypd1 und in lof-Mutanten mit inaktivierten Komponenten des HOG-Signalwegs downstream von MoYpd1p kann bei Fludioxonil-Stress keine Phosphorylierung von MoHog1p detektiert, die Mutanten können auf Fludioxonil-haltigen Medien wachsen (Jacob *et al.*, 2015). Diese Ergebnisse korrelieren mit den Beobachtungen in dieser Arbeit, dass bei jenen Mutanten bei Fludioxonil-Stress weder eine Zellkerntranslokation von MoHog1p, noch eine Veränderung der intrazellulären Osmolytkonzentrationen festzustellen ist.

Sowohl in *MoWT* als auch in den HK-lof-Mutanten ΔMohik1 und ΔMosIn1 konnte nach hyperosmotischem Schock sowohl eine Zellkerntranslokation von MoHog1p, als auch eine intrazelluläre Akkumulation von Arabitol festgestellt werden (Abb. 13, Abb. 17). Bei der Perzeption von hyperosmotischem Stress scheint die Abwesenheit der sensorischen HKs MoHik1p oder MoSln1p also durch die jeweils andere bzw. durch weitere im Phosphorelaysystem beteiligte HKs kompensiert werden zu können.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur zellulären Lokalisation von MoHog1p und intrazellulären Osmolytkonzentrationen stützen also das bisherige, anhand von Wachstumsexperimenten aufgestellte Modell des HOG-Signalwegs in *M. oryzae* (Jacob *et al.*, 2015) (Abb. 20).

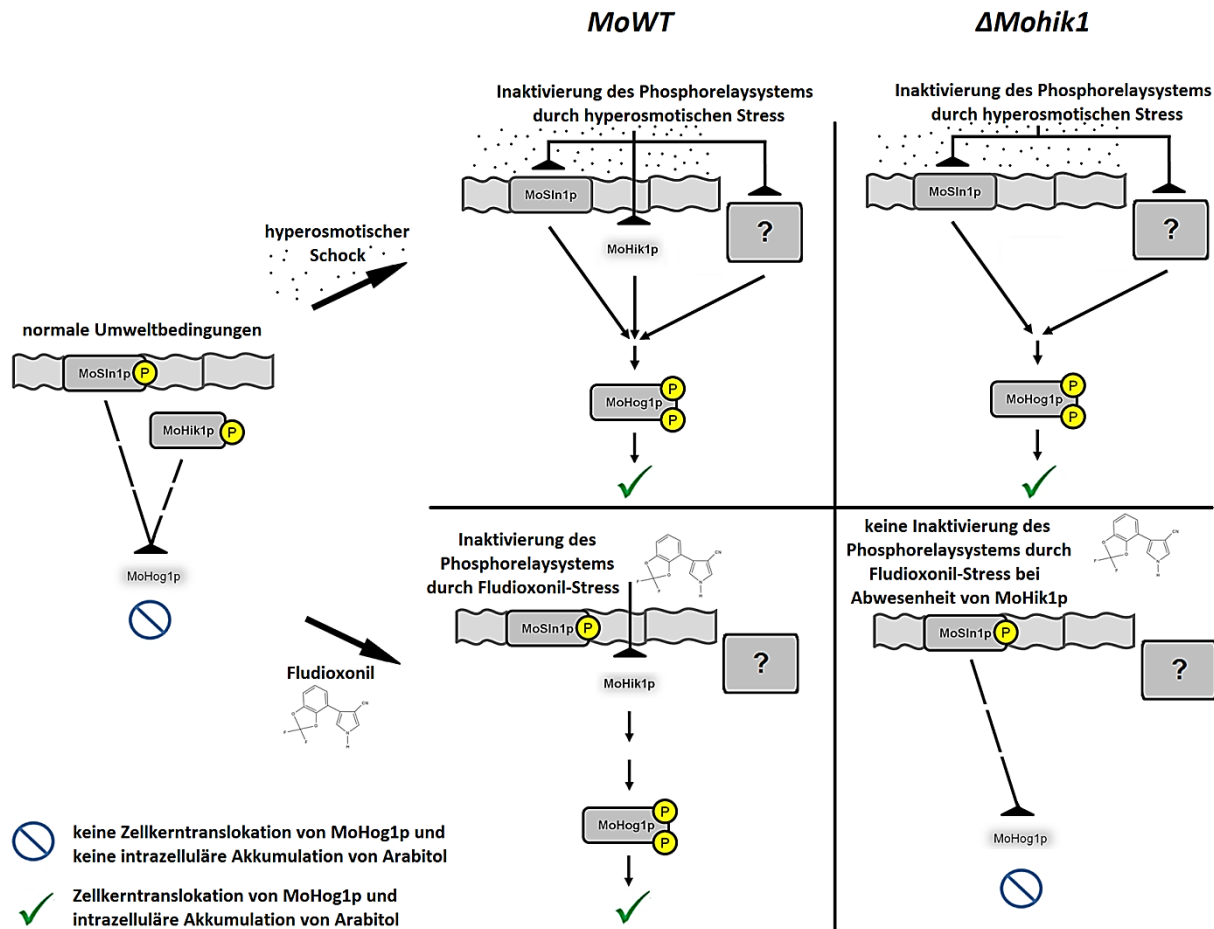


Abb. 20: Ein Modell, welches Unterschiede in der HOG-Signalweg-abhängigen Perzeption von Fludioxonil-Stress und hyperosmotischem Stress in *MoWT* (links) und *ΔMohik1* (rechts) beschreibt. Für eine Phosphorylierung und Zellkerntranslokation der MAPK MoHog1p, sowie die intrazelluläre Akkumulation von Arabitrol, ausgelöst durch Fludioxonil, ist die Anwesenheit der HK MoHik1p essentiell (unten). Nicht jedoch für eine Phosphorylierung und Zellkerntranslokation der MAPK MoHog1p, sowie die intrazelluläre Akkumulation von Arabitrol, ausgelöst durch hyperosmotischen Schock (oben). Graue mit „?“ beschriftete Felder symbolisieren weitere, im Phosphorelaysystem beteiligte HKs oder Mechanismen upstream von MoYpd1p, die bei Perzeption von hyperosmotischem Stress zu einer Aktivierung der MAPK Kaskade führen. In jedem Fall ist die Funktionalität von MoYpd1p und der downstream gelegenen Komponenten der Signalkaskade essentiell für eine Signalweiterleitung (modifiziert nach Jacob *et al.*, 2015).

Die Perzeption von bzw. die Signaltransduktion bei Fludioxonil-Stress und akutem hyperosmotischem Stress in *M. oryzae* ist also unterschiedlich. Für eine Phosphorylierung und Zellkerntranslokation der MAPK MoHog1p, sowie die intrazelluläre Akkumulation von Arabitrol, ausgelöst durch Fludioxonil, ist MoHik1p essentiell. Nicht jedoch für eine Phosphorylierung und Zellkerntranslokation der MAPK MoHog1p, sowie die intrazelluläre Akkumulation von Arabitrol, ausgelöst durch hyperosmotischen Schock.

Durch Modulation der HK MoHik1p bei Fludioxonil-Stress im Wildtypstamm kann der Phosphatgruppentransfer im Phosphorelaysystem durch MoSln1p und durch mögliche weitere Komponenten offensichtlich nicht aufrechterhalten werden, wodurch die MAPK-Kaskade aktiviert wird. Da jedoch eine genetische Inaktivierung von *MoHIK1* in *M. oryzae* möglich ist, ohne dass die MAPK-Kaskade hyperaktiviert wird, scheint Fludioxonil also nicht nur die Kinaseaktivität von MoHik1p zu inhibieren, sondern zusätzliche Effekte im Phosphorelaysystem zu haben. Lawry *et al.* (2017) konnten zeigen, dass Fludioxonil-Stress die Kinaseaktivität der MoHik1p-homologen HK Drk1 in *Blastomyces dermatitidis* *in vivo* zu einer Phosphataseaktivität ändert und somit das nachgeschaltete Phosphotransferprotein Ypd1 dephosphoryliert wird, wodurch sich die Stärke des Phosphorylierungsmusters im Phosphorelaysystem verringert. Dadurch kann erklärt werden wieso Fludioxonil-Stress MoHik1p-abhängig zur Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs führt, hingegen nicht eine genetische Inaktivierung von *MoHIK1*.

Durch in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen zur zellulären Lokalisation von MoHog1p und zu intrazellulären Osmolytkonzentrationen in lof-Mutanten mit inaktivierten HKs bei unterschiedlichen physiologischen Stimuli, konnten Rückschlüsse auf putativ spezifische sensorische Funktionen von HKs gezogen werden, was folgend diskutiert wird.

4.2 Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen als spezifische

Sensoren in *Magnaporthe oryzae*

Die molekularen Funktionen und zellulären Aufgaben von pilzlichen HKs sind nicht gut untersucht, obwohl diese Sensorproteinfamilie in pathogenen Pilzen sehr weit verbreitet ist und auch erfolgreich als Fungizid-Target adressiert wird (Tanaka und Izumitsu, 2010; Kilani und Fillinger, 2016). In *M. oryzae* wurden bisher hauptsächlich Geninaktivierungen von HK-kodierenden Genen durchgeführt, gefolgt von makroskopischer Phänotypisierung der entsprechenden lof-Mutanten, um auf putative Funktionen von HKs und eine Beteiligung im HOG-Signalweg von *M. oryzae* zu schließen (Jacob *et al.*, 2014). Des Weiteren wurden in *M. oryzae* immunologische Studien unter Verwendung eines Phospo-Hog1p-Antikörpers durchgeführt, welcher mit der phosphorylierten MAPK MoHog1p interagiert (Jacob *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden weitere Strategien etabliert, um potentielle spezifische sensorische Funktionen von HKs zu untersuchen. Dafür wurde die Zellkerntranslokation der MAPK MoHog1p sowie die HOG-Signalweg-abhängige intrazelluläre Akkumulation von Osmolyten in verschiedenen HK-lof-Mutanten vor und nach Induktion mit verschiedenen Stimuli untersucht.

4.2.1 Hyperosmotischer Schock, Salzonenstress und Zuckerstress

Die Mutantenstämme $\Delta Mohik1$ und $\Delta Mosln1$ sind im Vergleich untereinander Stressor-spezifisch in ihrem Wachstum gehemmt: $\Delta Mohik1$ kann auf Medium mit osmotischem Salzstress besser wachsen als $\Delta Mosln1$, im Gegensatz dazu kann $\Delta Mosln1$ auf Medium mit osmotischem Zuckerstress besser wachsen als $\Delta Mohik1$. Die Mutante $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ ist sowohl bei Salzstress als auch bei Zuckerstress – ebenso wie die Mutante $\Delta Mohog1$ – in ihrem Wachstum stark gehemmt (Jacob *et al.*, 2015). Dies führte zur Hypothese, dass MoHik1p und MoSln1p als spezifische Sensoren für osmotischen Zucker- bzw. Salzstress fungieren und dass somit in $\Delta Mohik1$ bei osmotischem Zuckerstress kein HOG-Signalweg-abhängiges Signal bzw. in $\Delta Mosln1$ bei osmotischem Salzstress kein HOG-Signalweg-abhängiges Signal generiert und übertragen wird, und folglich eine adäquate zelluläre Antwortreaktion ausbleibt. Es sollte also in den lof-Mutanten bei Behandlung mit dem entsprechenden Stressor auch keine Translokation von MoHog1p in den Zellkern erfolgen und auch keine HOG-Signalweg-abhängige Osmolytproduktion.

Die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse zur Zellkerntranslokation von MoHog1p und der intrazellulären Akkumulation von Arabitol nach hyperosmotischem Salz- und Zuckerschock korrelieren mit bereits beschriebenen Phospho-Hog1p-Western-Blot Analysen in *M. oryzae*, stehen jedoch in Kontrast zu Beobachtungen aus Wachstumstests der entsprechenden lof-Mutanten auf Salzstress- bzw. Zuckerstress-Medien: Bei Induktion von $\Delta Mohik1$, $\Delta Mosln1$ oder $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ mit Salz- oder Zuckerschock konnte bei jeder Kombination eine Phosphorylierung von MoHog1p (Jacob *et al.*, 2014), eine Translokation von MoHog1p in den Zellkern (Abb. 13) und eine intrazelluläre Akkumulation von Arabitol beobachtet werden (Abb. 18) – analog zum Referenzstamm *MoWT* und im Gegensatz zu den lof-Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg ($\Delta Moypd1$, $\Delta Mossk1$, $\Delta Mossk2$, $\Delta Mopbs2$ und $\Delta Mohog1$). Dennoch kann $\Delta Mohik1$ nicht auf Zuckerstress-Medium wachsen, $\Delta Mosln1$ nicht auf Salzstress-Medium, und $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ sowie auch die lof-Mutanten mit inaktiviertem HOG-Signalweg weder auf Zuckerstress- noch auf Salzstress-Medium im Gegensatz zu *MoWT* (Jacob *et al.*, 2014).

Die differenziellen Wachstumsgeschwindigkeiten von $\Delta Mohik1$ und $\Delta Mosln1$ auf Zuckerstress- und auf Salzstress-Medium können also nicht mit einer beeinträchtigten, unmittelbaren Salzstress-spezifischen bzw. Zuckerstress-spezifischen Signalweiterleitung (Zellkerntranslokation von MoHog1p) oder zellulären Antwortreaktion (Osmolyt-Akkumulation) korreliert oder erklärt werden – im Gegensatz zu lof-Mutanten, bei denen der HOG-Signalweg downstream der HKs MoSln1p und MoHik1p inaktiviert ist (3.2.5, 3.3.2). MoSln1p und MoHik1p scheinen keine spezifische Sensorfunktion zu haben für akuten hyperosmotischen Salz- oder Zuckerstress bzw. für die Substanzen KCl oder Sorbitol.

Sowohl die Untersuchungen zur Phosphorylierung (Jacob *et al.*, 2014) und zur Zellkerntranslokation von MoHog1p, als auch die Quantifizierung intrazellulärer Osmolyte haben gemeinsam, dass relativ frühe Zeitpunkte nach Stressinduktion analysiert werden – im Gegensatz zu Beobachtungen der Wachstumsgeschwindigkeit auf Stressmedien über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Des Weiteren ist zu beachten, dass in Wachstumstests auf Stressmedien nie ein unmittelbarer und akuter Schock vorhanden war, sondern ein langfristiger Stress vorhanden ist. Eine differenziertere Betrachtung der Begriffe „osmotischer Schock“ und „osmotischer Stress“ ist für die Interpretation von Ergebnissen aus unterschiedlichen Versuchsaufbauten entscheidend (Shavrukov, 2013; Hohmann, 2002).

Einen „osmotischen Charakter“ hat ein hyperosmotischer Stimulus hauptsächlich zu Beginn einer Stresssituation (Shavrukov, 2013): Unter hyperosmotischen Bedingungen strömt Wasser aus der Zelle – das Zellvolumen verringert sich. Eine Zunahme des Zellvolumens bis hin zur Ausgangsgröße erfolgt je nach Molarität eines subletalen Stimulus bereits nach ca. einer Stunde (Babazadeh *et al.*, 2013), (Anhang Abb. 28). In dieser Zeit akkumulieren hauptsächlich die molekularen Einheiten des Stressors wie z.B. Salzionen, auch als *perturbing solutes* bezeichnet, intrazellulär, um dem akuten osmotischen Potential entgegenzuwirken und den Rückstrom von Wasser in die Zelle zu gewährleisten. Diese *perturbing solutes* werden mit der Zeit im Laufe der zellulären Anpassung aus der Zelle exportiert und durch kompatible Solute wie z.B. Arabitol ersetzt, wodurch der Metabolismus weniger gestört wird als z.B. durch KCl. Auf kurze Sicht scheint also die Quantität von osmotischem Stress eher entscheidend als die Qualität, also die molekularen Einheiten, des Stressors. Auf lange Sicht jedoch ist dann vielmehr dessen Qualität entscheidend für eine entsprechende Perzeption und zelluläre Antwortreaktion (Shavrukov, 2013).

Offenbar haben die Proteine MoHik1p und MoSln1p neben ihrer Funktion in der unmittelbaren Signalweiterleitung im HOG-Signalweg bei akutem osmotischem Schock noch andere Funktionen, die bei dauerhaftem Wachstum auf Medium erhöhter Osmolarität erst zu einem sehr viel späteren Zeitpunkt als unmittelbar nach Stress-Perzeption relevant werden (Abb. 21 b, vertikale gepunktete Linien). Solche Funktionen wären nicht durch Analysen der Lokalisation von MoHog1p oder von subzellulären Osmolyten unmittelbar nach hyperosmotischem Schock zu erfassen.

Es könnte auch sein, dass ein hyperosmotischer Schock zu einer wesentlich stärkeren Aktivierung des HOG-Signalwegs führt, im Vergleich zu langfristigem zellulärem Salzionen- oder Zuckerstress, und dass somit putative Sensor-Spezifitäten von MoHik1p und MoSln1p während des Mechanismus der Perzeption eines hyperosmotischen Schocks überlagert werden. Allerdings wurden für die Untersuchungen zur Stimulus-abhängigen Translokation von MoHog1p in den Zellkern jeweils kleinstmögliche Konzentrationen des Stressors

verwendet, die bereits zu einer Zellkerntranslokation von MoHog1p führten. Unterhalb dieser Konzentrationen erfolgt also keine HOG-Signalweg-Aktivierung. Eine potentielle Überlagerung der Signalspezifität erscheint aufgrund der verwendeten geringen Stressintensität also eher unwahrscheinlich.

Hinweise auf eine direkte Beteiligung von MoSln1p und MoHik1p in der HOG-Signalweg-abhängigen Perzeption von hyperosmotischem Schock geben die folgenden Beobachtungen: Bei gleichzeitiger Abwesenheit der beiden HKs MoSln1p und MoHik1p war eine verringerte intrazelluläre Akkumulation von Arabitol ausgelöst durch hyperosmotischen Schock (sowohl Zuckerschock als auch Salzschock) festzustellen im Vergleich zu *MoWT*, dennoch war die intrazelluläre Arabitol-Konzentration größer als bei $\Delta Mohog1$ (Anhang Abb. 32). Bei Abwesenheit von MoSln1p oder bei Abwesenheit von MoHik1p waren keine signifikanten Unterschiede in der Osmolytakкумуляtion im Vergleich zu *MoWT* festzustellen. In $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ scheint die Intensität der zellulären Antwortreaktion im Vergleich zu *MoWT* also verringert zu sein.

Diese Beobachtungen sind außerdem ein Hinweis darauf, dass die beiden HKs MoSln1p und MoHik1p additive Funktionen in der Antwortreaktion bei hyperosmotischem Schock haben könnten (Abb. 21 a, gepunktete Linie zwischen MoSln1p und MoHik1p) bzw. dass bei Abwesenheit einer der beiden HKs die Funktion durch die andere HK teilweise übernommen werden kann. Des Weiteren lässt die im Vergleich zu $\Delta Mohog1$ erhöhte Arabitol-Konzentration in $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ die Hypothese zu, dass noch weitere Komponenten im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs existieren müssen (Abb. 21, graue mit „?“ markierte Felder), die zumindest Teilweise die Funktion von MoHik1p und MoSln1p bei der Perzeption von hyperosmotischem Schock übernehmen können, wie z.B. die HKs MoHik2p-MoHik9p. Durch einzelne genetische Inaktivierung dieser HKs (MoHik2p-MoHik9p) in $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ könnte durch Vergleich der intrazellulären Arabitol-Konzentration nach hyperosmotischen Schocks in den entsprechenden Mutanten auf den Anteil der Beteiligung der entsprechenden HK im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs geschlossen werden.

Die Divergenz der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten von $\Delta Mohik1$, $\Delta Mosln1$ und $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ auf Medien mit Salz- oder Zuckerstress und den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zu den zellulären Reaktionen bei kurzfristigen Zeitpunkten nach Stressapplikation (Lokalisation von MoHog1p und intrazelluläre Osmolyt-Akkumulation) ist also möglicherweise zurückzuführen auf indirekte bzw. sekundäre Effekte oder Zustände, die spezifisch durch Ionenstress oder durch Zuckerstress ausgelöst werden (Abb. 21).

Weitere in dieser Arbeit erlangte Hinweise für diese Hypothese werden in den folgenden drei Kapiteln diskutiert (4.2.3, 4.2.4). Zusätzliche Hinweise auf unterschiedliche Funktionen von MoSln1p und MoHik1p bei langfristigen zellulären Regulationsmechanismen, im Gegensatz zu Funktionen bei der akuten HOG-Signalweg-Aktivierung bei hyperosmotischem Schock, werden danach diskutiert (4.2.5, 4.2.6).

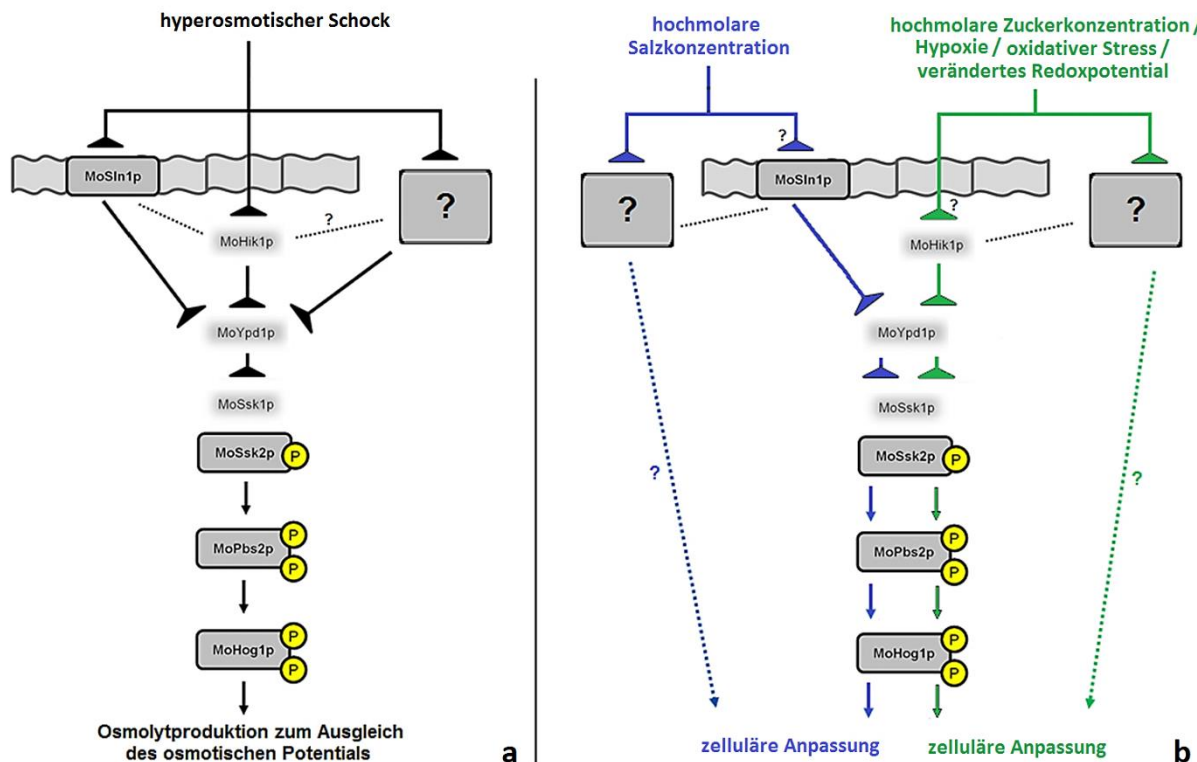


Abb. 21: Zwei Modelle, die die Perzeption und Signaltransduktion bei hyperosmotischem Schock im Gegensatz zu langfristigem hochmolarem Salzstress bzw. Zuckerstress, Hypoxie, oxidativem Stress oder verändertem zellulärem Redoxpotential in *Magnaporthe oryzae* beschreiben. Für eine adäquate Osmolyt-Akkumulation bei hyperosmotischem Schock (a) sind die beiden HKs MoSln1p und MoHik1p einzeln verzichtbar, bei gleichzeitiger Abwesenheit beider HKs ist die Osmolyt-Akkumulation verringert im Vergleich zu *MoWT* jedoch stärker als bei $\Delta MoHog1$. Für eine zelluläre Anpassung bei langfristigem, hochmolarem Salzstress hingegen ist die HK MoSln1p essentiell (b, links). Für eine zelluläre Anpassung bei langfristigem, hochmolarem Zuckerstress, oxidativem Stress und Störungen des Redoxpotentials ist die HK MoHik1p essentiell (b, rechts). Graue, mit „?“ markierte Felder symbolisieren bisher unbekannte Mechanismen oder Zustände, welche assoziiert sind mit langfristigem Salzstress bzw. Zuckerstress/Hypoxie/oxidativem Stress/verändertem Redoxpotential (4.2.2, 4.2.3, 4.2.4), und dann sekundär von den HKs MoSln1p bzw. MoHik1p detektiert werden. Gepunktete Linien deuten eine putative indirekte oder direkte Interaktion und/oder komplementäre Funktion an. MoYpd1p ist die zentrale Verbindungsstelle zwischen Perzeption verschiedenster Stimuli und Signalübertragung im HOG-Signalweg (modifiziert nach Jacob *et al.*, 2015).

Die Hypothese einer spezifischen Detektion von Salzstress bzw. Zuckerstress durch die HKs MoSln1p bzw. MoHik1p kann also detaillierter formuliert werden: MoSln1p bzw. MoHik1p detektieren wahrscheinlich nicht direkt spezifisch hyperosmotischen Salz- oder Zuckerstress (bzw. Salzionen und Zuckermoleküle), sondern vermutlich sekundär zelluläre Mechanismen oder Zustände (Abb. 21 b: Graue, mit „?“ markierte Felder), welche zum einen spezifisch mit zellulärem Salzstress oder spezifisch mit zellulärem Zuckerstress assoziiert sind oder dadurch ausgelöst werden – wie z.B. Ionenstress bei Wachstum auf KCl-haltigen Medien gegenüber einer veränderten Homöostase durch metabolische Anpassung bei Wachstum auf sorbitolhaltigen Medien. So wurde z.B. auch spekuliert, dass Sln1p in *S. cerevisiae* nicht spezifisch externe Osmolyte detektiert, sondern vermutlich generell osmotische Zustände (Tao *et al.*, 1999).

4.2.2 Intrazelluläre Glycerol- und Mannitol-Akkumulation in *Magnaporthe*

oryzae als initiale und transiente Reaktion auf hyperosmotischen Schock

In der Literatur sind Daten über Veränderungen der intrazellulären Osmolyt-Konzentrationen in *M. oryzae* nach hyperosmotischen Schocks vorhanden: In Abhängigkeit eines funktionalen HOG-Signalwegs ist die intrazelluläre Konzentration an Arabitol 24 h nach hyperosmotischem Salzschock deutlich erhöht (Dixon *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Durch Untersuchung des zusätzlichen, relativ frühen Zeitpunkts, 5 h nach Stressinduktion, sowie durch Untersuchung mehrerer Mutanten-Stämme und unterschiedlicher Stimuli konnten zusätzliche Daten generiert werden.

Es wurde festgestellt, dass die intrazellulären Glycerol- und Mannitol-Konzentrationen in *MoWT* jeweils 5 h nach hyperosmotischem Salzschock, hyperosmotischem Zuckerschock, oder Applikation von Fludioxonil erhöht sind, 24 h nach den Stressbehandlungen jedoch wieder auf die Ausgangswerte gesunken sind (Anhang Abb. 32). Eine derartige initiale Akkumulation von Glycerol und Mannitol in *M. oryzae* als Reaktion einer Aktivierung des HOG-Signalwegs wurde bisher nicht beschrieben.

Eine unmittelbare intrazelluläre Akkumulation von Glycerol als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock ist in *S. cerevisiae* bekannt: Im ungestressten Zustand wird Glycerol aus der Zelle transportiert. Bei Aktivierung der MAPK Hog1p durch hyperosmotischen Stress wird der Glycerol-Exporter Fps1p geschlossen, die Expression des Glycerol-Importers Stl1p und der Enzyme Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase Gpd1p/Gpd2p und Glycerol-3-Phosphat-Phosphatase Gpp1p/Gpp2p erhöht, welche in der Produktion von Glycerol ausgehend von Dihydroxyacetonphosphat beteiligt sind, sowie die

Aktivität des Enzyms Phosphofruktokinase-2 erhöht, wodurch letztendlich eine hohe Rate der Glycerolproduktion erreicht wird. Diese Mechanismen führen zu einem raschen Anstieg der intrazellulären Glycerolkonzentration (Rep *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 1999; Ferreira *et al.*, 2005; Dihazi *et al.*, 2004; Thorsen *et al.*, 2006). Glycerol ist dabei zum einen wichtig als Osmolyt, um einen Wasserausstrom aus der Zelle zu verhindern, zum anderen ist die Produktion von Glycerol wichtig für die Balance des zellulären Redox-Potentials (Hohmann, 2009).

In *M. oryzae* könnten analoge Mechanismen für die gemessene initiale Akkumulation von Glycerol verantwortlich sein. Zu einer intrazellulären Akkumulation von Mannitol bedingt durch hyperosmotischen Schock sind keine zugrunde liegenden physiologischen und metabolischen Prozesse bekannt.

Mannitol wird in *Aspergillus niger* über zwei enzymatische Schritte erzeugt, einer Reduktion und einer Dephosphorylierung von Fruktose-6-Phosphat durch die Mannitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase (Dijksterhuis und Vries, 2006). Im Weizenpathogen *Stagonospora nodorum* werden zwei Wege der Mannitolsynthese beschrieben: Einer wie oben beschrieben und ein weiterer über Fruktose durch die enzymatische Aktivität der Mannitol-Dehydrogenase. Die Mannitol-Dehydrogenase verwendet NADH als Cofaktor, die Mannitol-1-Phosphat-5-Dehydrogenase verwendet NADPH. Zusammen bilden sie einen mutmaßlichen Mannitolzyklus, der eine schnelle Produktion bzw. einen schnellen Abbau von Mannitol gewährleisten kann, während die Produktion von NADPH auf Kosten von NADH bzw. umgekehrt ermöglicht wird (Solomon *et al.*, 2006). Zusätzlich zur ihrer Verwendung als kompatible Solute können Polyole also helfen das zelluläre Redoxpotenzial zu stabilisieren (Diano *et al.*, 2006).

Die intrazelluläre Konzentration von Glycerol und Mannitol in *M. oryzae* sinkt nach dem initialen Anstieg nach hyperosmotischem Schock im Laufe von 24 h wieder auf die Ausgangskonzentration (Anhang Abb. 32). Dahingegen steigt die intrazelluläre Konzentration an Arabitol, welches in *M. oryzae* im Gegensatz zu Glycerol in *S. cerevisiae* als Hauptosmolyt fungiert, im Laufe von 24 h weiter an (Dixon *et al.*, 1999). Entweder haben die beiden Osmolyte Glycerol und Mannitol in *M. oryzae* nur vorübergehende spezifische Funktionen in der Zelle, wie z.B. in der Balance des Redoxpotentials analog zu den Mechanismen in *S. cerevisiae*, *Aspergillus niger* oder *Stagonospora nodorum*, oder sie sind metabolische Intermediate während der Arabitolproduktion, oder aber sie sind Artefakte ohne evolutionär entwickelte zelluläre Funktion, bedingt durch stringente Induktionsbedingungen in den durchgeführten Experimenten, welche in solch akuter und starker Form in der Natur unwahrscheinlich sind. Die Bestimmung intrazellulärer Osmolyte nach osmotischem Schock in lof-Mutanten mit inaktivierten Genen der Glycerol-, Arabitol- bzw. Mannitol-Synthese sowie der zellulären Redox-Regulation könnten Aufschlüsse geben über die Funktion dieser

Primärmetabolite während der Osmoadaptation. Da die Balance des zellulären Redox-potentials wichtig zu sein scheint während der Anpassung auf hyperosmotische Bedingungen – und Glycerol z.B. in *S. cerevisiae* aus Gründen der Redox-Balance bei ungestressten Bedingungen aus der Zelle exportiert wird (Shen *et al.*, 1999) – sollten bei zukünftigen Osmolyt-Analysen mit *M. oryzae* auch Osmolyte im Medium quantifiziert werden.

4.2.3 MoSln1p-abhängige initiale Mannitol-Akkumulation bei Salzschock –

MoSln1p als spezifischer Sensor für Salzionen-abhängigen Stress?

Eine initiale intrazelluläre Mannitol-Akkumulation 5 h nach hyperosmotischem Salzschock, nicht aber nach hyperosmotischem Zuckerschok, scheint in den Mutantenstämmen $\Delta Mosln1$ und $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ mit inaktiviertem HK-Gen *MoSLN1* gestört zu sein im Vergleich zu den Stämmen *MoWT* und $\Delta Mohik1$ mit funktionaler HK MoSln1p (Anhang Abb. 32). Dies deutet auf eine bisher unbekannte Funktion von MoSln1p bei einer Salzschock-spezifischen intrazellulären Mannitol-Akkumulation hin.

Um diese putative Abhängigkeit der intrazellulären Mannitol-Akkumulation von MoSln1p bei Salzschock zu bestätigen, sollten die entsprechenden Analysen wiederholt werden mit mehr zu untersuchenden Zeitpunkten, als im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Es besteht die Möglichkeit eines Problems der zeitlichen Auflösung des Verlaufs der intrazellulären Konzentration bei lediglich 2 untersuchten Zeitpunkten nach Stressapplikation: Aufgrund der großen Anzahl an Proben (5 Stämme x 4 Induktionsbedingungen x 3 Zeitpunkte x 3 biologische Replikate) wurde im Rahmen dieser Arbeit in den untersuchten Stämmen *MoWT*, $\Delta Mohik1$, $\Delta Mosln1$, $\Delta Mohik1/\Delta Mosln1$ und $\Delta Mohog1$ lediglich ein Zeitpunkt vor und zwei Zeitpunkte nach Stressapplikation (5 h und 24 h) für die Quantifizierung von Osmolyten gewählt. Es ist durchaus möglich, dass die sich im Vergleich zu den anderen untersuchten Stämmen unterscheidende intrazelluläre Akkumulation von Mannitol in $\Delta Mosln1$ zeitdynamische Gründe hat, deren Ursprung nicht HOG-Signalweg assoziiert ist, sondern auf einen generell verlangsamten Metabolismus zurückzuführen ist: Die generelle Wachstumsgeschwindigkeit von $\Delta Mosln1$ auch auf Kompletmedium ohne Stressbedingungen ist im Vergleich zu allen anderen untersuchten Stämmen reduziert (Jacob *et al.*, 2015).

Des Weiteren sind die intrazellulären Glycerol- und Mannitolkonzentrationen in $\Delta Mosln1$ 24 h nach Fludioxonilapplikation nicht wieder auf die Ausgangswerte gesunken, so wie es in *MoWT* 24 h nach Fludioxonilapplikation der Fall ist (Anhang Abb. 32), was auch auf einen generell verlangsamten Metabolismus in $\Delta Mosln1$ hindeuten könnte, und somit zu einer im

Vergleich zu *MoWT* verspäteten initialen Erhöhung aber auch entsprechend verspäteten finalen Verringerung der intrazellulären Glycerol- und Mannitolkonzentrationen.

Jedoch würde ein generell verlangsamter Stoffwechsel in $\Delta Mos1n1$ nicht die erkennbare initiale Mannitol-Akkumulation in $\Delta Mos1n1$ nach Induktion mit hyperosmotischem Zuckerstress analog zu *MoWT* erklären. Es sollten unbedingt weitere Analysen mit mehreren Zeitpunkten nach Stressinduktion durchgeführt werden.

Eine Bestätigung der hier dargestellten Ergebnisse bzw. ein Ausbleiben einer Mannitol-Akkumulation während der gesamten Zeitspanne der zellulären Antwortreaktion bei Salzstress in $\Delta Mos1n1$ wäre ein Hinweis auf eine spezifische Perzeption von (Salz-) Ionenstress – nicht jedoch von Zuckerstress – durch MoSln1p, gefolgt von einer HOG-Signalweg-abhängigen initialen intrazellulären Akkumulation von Mannitol. In diesem Fall sollten weitere Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen von KCl bzw. mit anderen Salzen und Zuckern als osmotische Stressoren durchgeführt werden, um durch Bestimmung der Mannitol-Konzentration nach Stressapplikation eine potentielle Salz-Spezifität von MoSln1p zu verifizieren und weiter einzugrenzen.

Nicht nur bei hyperosmotischem Zuckerstress im Gegensatz zu hyperosmotischem Salzstress, sondern auch bei Fludioxonil-Stress ist eine initiale (5 h) und transiente Mannitol-Akkumulation in $\Delta Mos1n1$ festzustellen (Anhang Abb. 32). Die Vergleiche der Osmolytprofile von $\Delta Mos1n1$ bei Kultivierung mit Salz-, Zucker- oder Fludioxonil-Stress deuten also darauf hin, dass Fludioxonil eher Zuckerstress simuliert als Salzstress, und dass durch osmotischen Stress mit ionischem Charakter MoSln1p-abhängig eine unterschiedliche Signalübertragung und/oder zelluläre Antwortreaktion erfolgt im Vergleich zu nicht-ionischem osmotischem Stress.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde KCl als ionischer Osmostressor verwendet, weil bekannt ist, dass durch NaCl zusätzlich zelluläre Antwortreaktionen in Form von Detoxifizierungsreaktionen ausgelöst werden können, da K^+ -Ionen in Biomolekülen durch Na^+ -Ionen verdrängt werden (Hohmann, 2002; Serrano, 1996; Shen *et al.*, 1999). Aufgrund dieses zellphysiologischen Unterschieds dieser beider Salze wäre eine Bestimmung der intrazellulären Konzentrationen von Mannitol, aber auch weiterer Osmolyte, nach Induktion mit NaCl besonders interessant.

Es ist bekannt, dass kompatible Solute wie Mannitol diverse Membranstrukturen und Enzyme stabilisieren können, die besonders sensitiv gegenüber Dehydrierung oder ionischem Stress sind (Melgar *et al.*, 2009; Gupta und Huang, 2014; Bohnert *et al.*, 1995). Des Weiteren ist bekannt, dass ionischer Stress zelluläre Membranen und Membranstrukturen stärker schädigt als nichtionischer Stress der gleichen Osmolarität

(Ghugue *et al.*, 2010). Da in $\Delta MosIn1$ nach hyperosmotischem Salzschock eine initiale Mannitol-Akkumulation ausbleibt im Gegensatz zu hyperosmotischem Zuckerschock, könnte dies daraufhinweisen, dass durch Fehlen der membranständigen Sensor-Kinase MoSln1p in $\Delta MosIn1$ keine Perzeption einer potentiellen Membranschädigung durch Ionenstress erfolgen kann, und somit auch keine Signalweiterleitung und schließlich keine Mannitolakkumulation zur Membranstabilisierung stattfindet. Eine solche Signalweiterleitung könnte unabhängig vom HOG-Signalweg sein (4.2.1 Abb. 21 b links, vertikale gepunktete Linie), da die HOG-Signalweg-abhängige Akkumulation von Arabitol in $\Delta MosIn1$ nicht beeinträchtigt ist. Möglicherweise werden also bei Abwesenheit von MoSln1p und damit einhergehend einer verringerten Akkumulation von Mannitol bei osmotischem Salzstress in $\Delta MosIn1$ verschiedenste Membranstrukturen oder Enzyme nicht ausreichend von Mannitol geschützt. Dadurch könnte auch die Wachstumsgeschwindigkeit von $\Delta MosIn1$ im Vergleich zu *MoWT* bei Salzstress verringert sein, trotz einer zu *MoWT* analogen Akkumulation von Arabitol und somit osmotischen Stabilisierung des Zytoplasmas.

Neben seiner Eigenschaften als Protektor diverser zellulärer Strukturen vor ionischem Stress sowie als kompatibles Solut zur Stabilisierung des osmotischen Potentials (Slama *et al.*, 2015) wurde Mannitol des Weiteren auch mit Funktionen in der Unterstützung der Kontrolle des zellulären Redox-Zustand in Verbindung gebracht (Shen *et al.*, 1999). Zum einen kann Mannitol das Antioxidans Glutathion durch Abschirmung vor Inaktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies schützen (Shen *et al.*, 1997). Zum anderen kann überschüssiges Reduktionspotential der Zelle während der osmotischen Stressantwort, während der das generelle Wachstum gehemmt ist, durch Verbrauch von NADPH für die Produktion von Mannitol im sogenannten Mannitolzyklus verringert werden (Valderrama *et al.*, 2006; Hult *et al.*, 1980). Untersuchungen der Membranintegrität sowie des zellulären Redox-Potentials in den hier untersuchten Stämmen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation diverser Stress-Stimuli wären somit äußerst interessant und könnten Hinweise auf die differenzielle Wachstumsgeschwindigkeit von $\Delta MosIn1$ und $\Delta Mohik1$ bei Salz- bzw. Zuckerstress unabhängig vom Parameter des osmotischen Drucks liefern – wohlgemerkt in beiden Stämmen ist die intrazelluläre Arabitol-Akkumulation als zelluläre Antwortreaktion auf osmotischen Stress identisch (Anhang Abb. 32). Ergänzt werden könnten solche Untersuchungen durch Mannitol-Supplementation während der Kultivierung von $\Delta MosIn1$ mit hyperosmotischem Salzstress.

4.2.4 MoHik1p als spezifischer Sensor des zellulären Redoxstatus, reaktiver Sauerstoffspezies und/oder Hypoxie-assoziiierter Zustände?

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sowohl osmotischer Zuckerschock als auch osmotischer Salzschock zu äquivalenten initialen zellulären Reaktionen in $\Delta Mohik1$ führen: Bei beiden Stimuli transloziert MoHog1p in den Zellkern, und bei beiden Stimuli steigen die intrazellulären Osmolyt-Konzentrationen an, jeweils analog zu *MoWT*. Wie erörtert stehen diese Beobachtungen der Hypothese einer spezifischen, direkten Perzeption von hyperosmotischem Zuckerstress durch die HK MoHik1p entgegen. Jedoch könnte MoHik1p sekundär Veränderungen der intrazellulären Homöostase – ausgelöst durch osmotischen Zuckerstress, jedoch nicht durch osmotischen Salzstress – detektieren und somit langfristig an einer Zuckerstress-spezifischen zellulären Antwortreaktion beteiligt sein.

Reduzierte Wachstumsgeschwindigkeiten von $\Delta Mohik1$ und $\Delta Mohog1$ im Gegensatz zu *MoWT* auf Medium mit subletalen Konzentrationen an NaNO_2 und CoCl_2 deuten auf eine Beteiligung der HK MoHik1p und des HOG-Signalweg bei der zellulären Anpassung bei NaNO_2 -Stress und CoCl_2 -Stress hin (Jacob *et al.*, 2015). Eine Behandlung von *MoHOG1::GFP* mit NaNO_2 oder CoCl_2 führt zu einer, im Vergleich zu hyperosmotischem Stress, verzögerten nukleären Akkumulation von MoHog1p (3.2.4). Dies ist ein Hinweis auf eine indirekte Detektion von NaNO_2 bzw. CoCl_2 , oder auf eine Veränderung der zellulären Homöostase durch NaNO_2 bzw. CoCl_2 gefolgt von einer, im Vergleich zu osmotischem Stress, verspäteten Detektion und Aktivierung des HOG-Signalwegs.

In der Mutante $\Delta Mohik1/MoHOG1::GFP$ konnte eine durch NaNO_2 oder CoCl_2 induzierte, im Vergleich zu *MoHOG1::GFP* noch spätere Translokation von MoHog1p in den Zellkern beobachtet werden; und auch nur, wenn die doppelte Konzentration an NaNO_2 bzw. CoCl_2 verwendet wurde im Vergleich zur Induktion bei *MoHOG1::GFP* (3.2.6). Dies könnte ein Hinweis sein auf eine HOG-Signalweg-abhängige Beteiligung von MoHik1p bei der Perzeption von NaNO_2 - bzw. CoCl_2 -Stress. Dennoch sollten diese Ergebnisse durch Untersuchung mehrerer unabhängig generierter $\Delta Mohik1/MoHOG1::GFP$ -Mutanten reproduziert werden, um einen potentiellen Einfluss der zellulären Proteinmenge von MoHog1p auszuschließen. Es könnte auch sein, dass die verspätete Translokation von MoHog1p in den Zellkern bei $\Delta Mohik1/MoHOG1::GFP$ im Vergleich zu *MoHOG1::GFP* auf eine veränderte Zellwand- bzw. Zellmembranpermeabilität für NaNO_2 bzw. CoCl_2 bei inaktiviertem HK Gen *MoHIK1* im Vergleich zu *MoWT* (siehe auch 4.2.5), und somit einem verspäteten intrazellulären Konzentrationsanstieg von NaNO_2 bzw. CoCl_2 nach Applikation zurückzuführen ist, und nicht auf eine veränderte bzw. gestörte Stimulus-Perzeption durch das Fehlen der HK MoHik1p. Desweiteren ist zu beachten, dass die native Sequenz von

MoHOG1 im Genom von Δ *Mohik1/MoHOG1::GFP* noch vorhanden sein könnte – dass also das Konstrukt *MoHOG1::GFP* ektopisch im Genom integriert wurde und keine homologe Rekombination am Locus *MoHOG1* stattfand – und dass nach Aktivierung des HOG-Signalwegs das native Protein MoHog1p, dessen Lokalisation nicht fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden kann, gegenüber dem Fusionsprotein MoHog1p-GFP präferiert in den Zellkern transportiert wird. Für eine fundierte Aussage über die Beteiligung von MoHik1p bei NaNO_2 - bzw. CoCl_2 -Stress sollten diese Möglichkeiten in zukünftigen Experimenten unbedingt ausgeschlossen werden.

In hohen aber subletalen intrazellulären Konzentrationen an Cobalt werden hypoxieähnliche physiologische Zustände bzw. Reaktionen ausgelöst, weil sauerstoffabhängige Enzyme inhibiert werden, Eisen- oder Schwefelzentren in Enzymkomplexen oxidiert werden (Befani *et al.*, 2013). Die Genexpression in *Cryptococcus neoformans* bei Hypoxie gleicht der unter Cobalt-Stress (Lee *et al.*, 2007).

Nitrit kann innerhalb der Zelle zu Stickstoffmonoxid und reaktiven Stickstoffspezies reduziert werden (Rong *et al.*, 2013). Reaktive Stickstoffspezies beeinflussen mehrere Zielstrukturen in lebenden Zellen, was zu physiologischen Reaktionen ähnlich von Hypoxie führt. Dabei werden Eisen- und Schwefelzentren sauerstoffabhängiger Enzyme sowie DNA, Sulfhydrylgruppen oder Lipide beeinflusst (De Groote und Fang, 1995). Außerdem können reaktive Stickstoffspezies Enzyme der Atmungskette hemmen (Joseph-Horne *et al.*, 2001). Die Applikation von NaNO_2 kann einen ähnlichen Effekt auslösen wie das Absinken des zellulären Sauerstoffgehaltes.

Es wurde gezeigt, dass Sauerstoffverfügbarkeit in *S. cerevisiae* zumindest teilweise über Sterol-Level detektiert wird (Hon *et al.*, 2003; Davies und Rine, 2006). Obwohl Details des Signalmechanismus noch nicht geklärt sind, zeigen Studien mit *Aspergillus fumigatus*, dass das SREBP (Sterol Response Element Binding Protein) SrbA ein Schlüsselregulator für die zelluläre Anpassung an hypoxische Bedingungen ist (Willger *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2014). Stämme ohne SrbA haben ein beeinträchtigtes Wachstum unter hypoxischen Bedingungen. SrbA-Proteine sind in filamentösen Pilzen weit verbreitet (Bien und Espenshade, 2010). So wird SrbA für das Wachstum unter hypoxischen Bedingungen in *Aspergillus oryzae* benötigt (Hagiwara *et al.*, 2016). Im humanpathogenen Pilz *Cryptococcus neoformans* sind sowohl das dem SrbA aus *Aspergillus fumigatus* homologe SREBP Sre1, als auch das dem MoHik1p aus *M. oryzae* homologe Protein Tco1 wichtig für eine Adaptation an hypoxische Bedingungen. In menschlichen Leberkrebszellen der Zelllinie Hep G2 sind SREBP-vermittelte Signalprozesse mit sensorischen Tyrosinkinasen und MAPK-Kaskaden assoziiert (Kotzka *et al.*, 2000). Möglicherweise werden in *M. oryzae* Hypoxie-bedingte Veränderungen der zellulären Sterol-Level auch über SREB-Proteine

detektiert, und SREBP-vermittelte Signalprozesse sind möglicherweise mit sensorischen HKs, wie z.B. MoHik1p, und der HOG-MAPK-Kaskade assoziiert. Über Homologievergleiche könnten SREBP-homologe Proteine in *M. oryzae* identifiziert werden und eine putative Beteiligung in der Hypoxie-bedingten Aktivierung des HOG-Signalwegs über MoHik1p untersucht werden. Zunächst sollten jedoch die zellulären Sterol-Level vor und nach NaNO_2 - bzw. CoCl_2 -Applikation von *MoWT* und ΔMohik1 gemessen werden, um erste Hinweise auf einen Zusammenhang von Sterol-Konzentrationen und Hypoxie und eine putative MoHik1p-abhängige Reaktion in *M. oryzae* zu erhalten. Des Weiteren könnten Wirkstoffe, die die Ergosterolbiosynthese hemmen, wie z.B. Fluconazol (Richardson *et al.*, 1990), als wertvolle Modulatoren in solche Untersuchungen einbezogen werden.

Stickstoffmonoxid, welches bei NaNO_2 -Stress in der Zelle gebildet werden kann, wird als S-Nitrosoglutathion gespeichert und transportiert und es wird vermutet dass S-Nitrosoglutathion als Stickstoffmonoxid-Pool in Zellen verwendet wird (Stamler, 1994). Die zu MoHik1p homologe Gruppe III HK Drk1 aus dem humanpathogenen Pilz *Blastomyces dermatitidis* ändert ihre Kinaseaktivität zu einer Phosphataseaktivität *in vivo* in Reaktion auf Induktion mit S-Nitrosoglutathion oder Glutathion, zwei in der Regulation des zellulären Redoxpotentials bzw. bei oxidativem Stress beteiligte Moleküle (Lawry, 2017). Dadurch wird die Stärke des Phosphorylierungsmusters im Phosphorelaysystem verringert und die MAPK-Kaskade aktiviert. Glutathion ist das wichtigste natürliche Antioxidans; intrazelluläre Konzentrationen stehen in Verbindung mit Hypoxie und reaktiver Sauerstoffspezies bzw. reaktiver Stickstoffspezies (Forman *et al.*, 2009; Mansfield *et al.*, 2004; Brown *et al.*, 2007; Lluís *et al.*, 2005). Die Erkenntnisse des Zusammenhangs von enzymatischer Aktivität von Drk1p und Redoxpotential könnten auf eine analoge Funktion des Homologs MoHik1p hindeuten und somit die beobachtete Beteiligung von MoHik1p in der Signalweiterleitung in *M. oryzae* bei NaNO_2 -induziertem, putativ verändertem zellulärem Redoxpotential erklären (4.2.1 Abb. 21 b rechts). Im Bakterium *Burkholderia pseudomallei* ist eine Perzeption des Redoxpotentials durch die Histidinkinase VirA anhand des Glutathion-Levels bereits bekannt (Wong *et al.*, 2015).

Um die Spezifität von MoHik1p bezogen auf induzierende Stimuli aber auch auf putative Proteininteraktionen weiter aufzuklären, sollten unbedingt ergänzende Analysen durchgeführt werden. Zur Aufklärung eines MoHik1p-spezifischen Stimulus könnten so Konidien von *MoHOG1::GFP* und $\Delta\text{Mohik1/MoHOG1::GFP}$ mit zelleigenen, aber auch mit synthetischen Stoffen behandelt werden, die in der Hypoxie- bzw. Redox-Regulation beteiligt sind oder diese Stören, wie z.B. Glutathion, Glutathion-Disulfid, S-Nitrosoglutathion, Allicin und Gentsinsäure (Rabinkov *et al.*, 2000; Borlinghaus *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2007a). Je größer der Konzentrationsunterschied der entsprechenden Substanz, der zur Zellkern-

translokation von MoHog1p in *MoHOG1::GFP* führt, jedoch nicht oder aber verspätet in $\Delta\text{Mohik1}/\text{MoHOG1::GFP}$, desto wahrscheinlicher ist eine direkte Beteiligung von MoHik1p im Perzeptionsmechanismus. Im besten Fall würde eine Zellkernakkumulation von MoHog1p in $\Delta\text{Mohik1}/\text{MoHOG1::GFP}$ komplett ausbleiben. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf eine sensorische Funktion von MoHik1p zur Detektion von Hypoxie bzw. Störungen des zellulären Redoxpotentials.

Analog sollte das *MoHOG1::GFP*-Konstrukt, dessen Genprodukt durch Bestimmung der zellulären Lokalisation nach Stressapplikation als Reporter für eine Aktivierung des HOG-Signalwegs dient, in die übrigen 8 HK-lof-Mutanten $\Delta\text{Mohik2}-\Delta\text{Mohik9}$ transformiert werden. Eine Beteiligung der entsprechenden Genprodukte im HOG-Signalweg wird vermutet (4.2.1) (Jacob *et al.*, 2014). Infolgedessen könnte nach Applikation diverser Stimuli auf eine spezifische Funktion bei der Stress-Perzeption durch einzelne HKs geschlossen werden. Transkriptom- und Proteomanalysen könnten solche Untersuchungen ergänzen.

Die HAMP (Histidine kinase, Adenylyl cyclase, Methyl-accepting protein Phosphatase) Domänen von MoHik1p, durch die sich Gruppe III HK von anderen HK-Gruppen unterscheiden, sind weder typische „Input-Sensor-Domänen“, noch typische „Output-Receiver-Domänen“ (Aravind und Ponting, 1999). Eine direkte Detektion von NaNO_2 bzw. CoCl_2 erscheint unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu sind PAS-Domänen (period circadian protein, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, single-minded protein) für ihre Funktion in der Detektion von Sauerstoff und des zellulären Redoxpotentials bekannt (Taylor und Zhulin, 1999). In *M. oryzae* existieren insgesamt 10 HK-Gruppen von denen 5 HK-Gruppen PAS-Domänen besitzen (Jacob *et al.*, 2014). Möglicherweise könnten Interaktionen unterschiedlicher HK-Gruppen eine entsprechende spezifische Detektion und Signalübertragung vermitteln. Pilzliche HKs besitzen im Gegensatz zu bakteriellen Histidinkinasen zusätzliche regulatorische Domänen und vereinigen somit bakterielle Zweikomponentensysteme in einem einzigen Protein. Theoretisch ist denkbar, dass zusätzlich zu einer intramolekularen Phosphatgruppenübertragung von der Histidinkinase-Domäne zur regulatorischen Domäne auch eine intermolekulare Phosphatgruppenübertragung existiert, dass also HKs unterschiedlicher HK-Gruppen Komplexe bilden könnten, z.B. Heterodimere, so wie es bei Tyrosinkinasen der Fall ist (Olayioye *et al.*, 2000). Falls direkte Interaktionen von weiteren HKs neben MoSin1p und MoHik1p mit dem Phosphotransferprotein MoYpd1p nicht nachzuweisen sein sollten, könnten solche Komplexbildungen unterschiedlicher HK-Gruppen eine HOG-Signalweg-Aktivierung erklären durch Signalübertragung via MoHik1p als Verbindungsstelle zwischen sensorischen HKs und MoYpd1p. Dadurch könnte eine Perzeption von Hypoxie durch PAS-Domänen enthaltende HK-Gruppen über MoHik1p vermittelt werden und somit dennoch die beobachtete MoHik1p-

abhängige HOG-Signalweg-Aktivierung durch NaNO_2 oder CoCl_2 erklärt werden (3.2.4, 3.2.6). PAS-Domänen selbst können neben ihrer sensorischen Funktion auch in Protein-Protein-Interaktionen wie der Bildung von Heterodimeren beteiligt sein (Taylor und Zhulin, 1999). Eine direkte Interaktion von PAS- und HAMP-Domänen innerhalb desselben Proteins, Aer, welches in *Escherichia coli* als Sauerstoff- und Redox-Sensor fungiert, wurde bereits nachgewiesen (Garcia *et al.*, 2016). In bakteriellen membranständigen, sensorischen HKs sind HAMP-Domänen zum einen für die Bindung von Effektordomänen, zum anderen für die Signalübermittlung von Ligandenbindung-bedingter Konformationsänderungen extrazellulärer Domänen auf intrazelluläre Kinase-Domänen verantwortlich, wodurch downstream ein Signaltransduktionsprozess initiiert wird (Hulko *et al.*, 2006; Aravind und Ponting, 1999; Dunin-Horkawicz und Lupas, 2010). Möglicherweise könnten HAMP-Domänen in pilzlichen, zytosolischen Gruppe III HKs also ebenfalls eine nicht direkte Stimulus-spezifische sensorische Funktion besitzen, sondern Konformationsänderungen von sensorischen Interaktionspartnern bzw. generell Protein-Protein-Interaktionen vermitteln zur Integration von Input-Signalen in Phosphorelaysystemen.

Durch Austausch von HAMP-Domänen der bakteriellen Proteine EnvZ und Tar sowie CpxA und NarX konnten funktionale Hybridproteine mit veränderten Aktivitäten generiert werden (Utsumi *et al.*, 1989; Zhu und Inouye, 2003; Appleman *et al.*, 2003). Analog könnten Hybridproteine in *M. oryzae* generiert werden. So könnten die HAMP-Domänen von MoHik1p mit einer anderen HKs (z.B. einer HK mit PAS-Domänen) fusioniert und das entsprechende Hybridprotein in $\Delta\text{Mohik1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ exprimiert werden, um anschließend zu überprüfen, ob durch das Hybridprotein zum einen die Sensitivität der Mutante gegenüber Fludioxonil, NaNO_2 , CoCl_2 oder weiteren Stimuli verändert ist, und/oder zum anderen die zelluläre Lokalisation von MoHog1p bzw. die Dynamik der Zellkerntranslokation von MoHog1p verändert ist. So könnte die Bedeutung von HAMP-Domänen in der Signalspezifität im Phosphorelaysystem von *M. oryzae* untersucht werden.

4.2.5 Der Einfluss von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen auf intrazelluläre Primärmetabolitkonzentrationen ohne Stresssituationen

Es konnte beobachtet werden, dass das Verhältnis von intrazellulärer Trehalose-Konzentration zu intrazellulärer Mannitol-Konzentration bei Kultivierung von ΔMohik1 ohne Stressstimuli tendenziell kleiner und in ΔMosln1 tendenziell größer war als in *MoWT* (Anhang Abb. 32). Bei Abwesenheit beider HKs ist das Konzentrationsverhältnis dieser beiden Osmolyte zueinander wie in *MoWT*. Darüberhinaus ist in $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}$ im Gegensatz zu allen übrigen Stämmen eine basale Arabitol-Konzentration vorhanden.

Auch ohne Aktivierung des HOG-Signalwegs sind also die intrazellulären Osmolytverhältnisse bereits durch unterschiedliche HKs beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass HKs neben ihrer Beteiligung bei stressbedingter Aktivierung des HOG-Signalwegs zusätzliche Funktionen haben. Sekundäre Auswirkungen auf die zelluläre Homöostase bei Anwesenheit unterschiedlicher HKs verbunden mit unterschiedlicher intrazellulärer Osmolytzusammensetzung sind somit auch denkbar. Dies wiederum könnte sich auf verschiedenste Stresstoleranzen auswirken, möglicherweise auch unabhängig von einem intakten HOG-Signalweg. Zu überprüfen wäre dies durch Kultivierung von HK-lof-Mutanten, bei denen zusätzlich der HOG-Signalweg genetisch inaktiviert wurde, mit verschiedenen Stressoren, gefolgt von Analysen verschiedenster Parameter der Zellhomöostase. Auf diese Weise könnten HOG-Signalweg-unabhängige Aufgaben von HKs untersucht werden. Es ist bekannt, dass HKs zelluläre bzw. morphologische Differenzierungsprozesse beeinflussen, so z.B. bilden die Stämme $\Delta Mohik5$ und $\Delta Mohik8$ ein- bis zweizellige Konidien aus (Jacob *et al.*, 2014). Ob diese Einflüsse von HKs auf intrazelluläre Osmolytzusammensetzungen bzw. auf morphologische Differenzierungsprozesse HOG-Signalweg-abhängig oder -unabhängig sind, ist bisher noch nicht geklärt.

4.2.6 Die Beteiligung von Zweikomponenten-Hybrid-Histidinkinasen bei Differenzierungsprozessen und Zellkernteilungsprozessen

In der osmosensitiven lof-Mutante $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1/MoHOG1::GFP$ konnten polykaryotische Konidienzellen beobachtet werden (Anhang Abb. 30). In *M. oryzae* wurden di- oder polykaryotische Zellen bisher nicht beschrieben. In lof-Mutanten in *M. oryzae* mit inaktiviertem HOG-Signalweg downstream von MoHik1p und MoSln1p konnten im Rahmen dieser Arbeit keine di- oder polykaryotischen Konidienzellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies hebt den Einfluss von HKs auf viele zelluläre Prozesse auch unabhängig von Stressbedingungen hervor. Um eine potentielle Unabhängigkeit dieses Phänomens vom HOG-Signalweg zu überprüfen, sollte in der lof-Mutante $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1/MoHOG1::GFP$ zusätzlich downstream der HOG-Signalweg genetisch inaktiviert werden gefolgt von einer Analyse der Zellkernanzahl in Konidien des entsprechenden Mutantenstamms.

Im humanpathogenen Pilz *Candida albicans* (*C. albicans*) führt eine kombinierte genetische Inaktivierung der vier Gene *CaSSK1*, *CaSHO1*, *CaMSB2* und *CaOPY2* ebenfalls zu einem polykaryotischen und osmosensitiven Phänotyp (Herrero-de-Dios *et al.*, 2014). Diese Gene kodieren in den zwei CaHog1p- und CaCek1p-abhängigen (CaCek1p Homolog zu MoKss1p, früher Pmk1) Signalwegen upstream gelegene Proteine. In der polykaryotischen lof-Mutante $\Delta Mohik1/\Delta MosIn1/MoHOG1::GFP$ in *M. oryzae* sind ebenfalls Gene inaktiviert, die Proteine

kodieren, für die eine Beteiligung upstream im MoHog1p-abhängigen Signalweg (Jacob *et al.*, 2015), jedoch bisher nicht im MoKss1p-abhängigen Signalweg, nachgewiesen ist.

Die Analogie des Auftretens dieses außergewöhnlichen Phänomens von polykariotischen Zellen in Ascomyceten deutet auf einen ähnlichen Mechanismus in $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ und $\Delta\text{Cassk1}/\Delta\text{Casho1}/\Delta\text{Camsb2}/\Delta\text{Caopy2}$ hin, welcher zur Ausbildung multipler Zellkerne führt, ursächlich ausgelöst durch genetische Manipulation von in MAPK-Signalwegen upstream gelegenen Komponenten und somit einer Störung dieser Signalwege. Hinsichtlich der zellulären Auswirkung der genetischen Manipulation entspricht die Inaktivierung von *CaSSK1* in *C. albicans* dabei der Inaktivierung von *MoSLN1* in *M. oryzae*, nämlich einer Inaktivierung des Sln1p-Zweigs des jeweiligen HOG-Signalwegs in *C. albicans* bzw. in *M. oryzae*. In *C. albicans* kann das membranständige Sensorprotein *CaSho1p* eine HOG-Signalweg-Aktivierung über die MAPKK *CaPbs2p* durch osmotischen Stress übernehmen, in *M. oryzae* jedoch nicht – eine genetische Inaktivierung der upstream gelegenen Komponente *MoSsk2p* resultiert in Osmosensitivität (Jacob *et al.*, 2015), in *C. albicans* jedoch nicht (Walia und Calderone, 2008). Der polykaryotische Phänotyp von $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}$ könnte, in Analogie zum polykaryotischen Phänotyp der Mutante $\Delta\text{Cassk1}/\Delta\text{Casho1}/\Delta\text{Camsb2}/\Delta\text{Caopy2}$ auf eine zusätzliche Funktion von *MoHik1p* im Sho-Zweig bzw. im MoKss1p-abhängigen Signalweg in *M. oryzae* hindeuten.

Es sollte überprüft werden, ob die Inaktivierung von *MoSHO1* in ΔMosln1 (bzw. in $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}$) möglich ist, und wenn ja, ob die resultierende Mutante osmosensitiver ist als ΔMosln1 (bzw. $\Delta\text{Mohik1}/\Delta\text{Mosln1}$). Dies könnte ein Hinweis sein auf eine unter dem Aspekt der Osmoregulation funktionale Interaktion von *MoHik1p* mit *MoSho1p*, einem zusätzlichen membranständigen sensorischen Protein neben *MoSln1p*. Zusätzlich könnte dies auch einen Erklärungsansatz liefern für die funktionelle Komplementation der Osmoregulation durch Expression der zytosolischen HK *MoHik1p* in *S. cerevisiae*-Mutanten mit genetisch inaktiverter membranständiger HK *Sln1p*: Die Mechanismen der Perzeption von hyperosmotischem Stress sind bisher nicht geklärt. Obwohl eine Membranständigkeit theoretisch nicht gegeben sein muss für die Funktionalität eines Osmosensors, werden physikalische Veränderungen in der Membran (Membran-Dehnung) oder der Abstand dieser zur Zellwand als eine Möglichkeit der Detektion von osmotischem Stress diskutiert (Hohmann, 2002). Bei hyperosmotischem Stress und einer damit einhergehenden Plasmolyse und somit der Entfernung der Plasmamembran von der Zellwand wird die Interaktion der extrazellulären Domänen von membranständigen potentiellen Osmosensoren mit der Zellwand unterbrochen, wodurch ein Signal intrazellulär weitergegeben werden und somit eine Aktivierung des HOG-Signalwegs erfolgen könnte. So ist der extrazelluläre Teil von der membranständigen HK *Sln1p* essentiell für die Funktionalität (Ostrander und

Gorman, 1999). Nach diesem Erklärungsmodell der Perzeption von hyperosmotischem Stress wäre ein membranständiges Sensorprotein, welches direkt oder indirekt im HOG-Signalweg involviert ist, essentiell. In *S. cerevisiae* ist die Beteiligung des membranständigen Proteins Sho1p (neben Sln1p) im HOG-Signalweg bekannt. Sho1p besitzt eine Protein-Protein-Interaktion-vermittelnde SH3-Domäne, welche essentiell ist für die native Funktion des Proteins (Maeda *et al.*, 1995). Möglicherweise kann die Abwesenheit von Sln1p durch heterologe Expression von MoHik1p in *S. cerevisiae* komplementiert werden, weil MoHik1p als Verbindungsstelle zwischen Sho1p und dem Phosphorelaysystem fungiert.

4.2.7 MoHog1p-GFP als Screening-Tool und zur Identifizierung und Validierung zellulärer Targets von antifungischen Substanzen

Es ist unbedingt erforderlich neue zelluläre Targets für neuartige Fungizid-Leitstrukturen zu etablieren, um auftretende Kreuzresistenzen gegenüber verschiedenen Fungizid-Klassen zu vermindern oder auszuschließen. Der HOG-Signalweg repräsentiert ein relativ neues Target für antifungische Substanzen. Die Hyperaktivierung dieses Signalwegs ist unmittelbar verbunden mit der fungiziden Aktivität von Wirkstoffen aus den kommerziellen Wirkstoffklassen der Phenylpyrrole, der Dicarboximides und der aromatischen Hydrocarbone (Vetcher *et al.*, 2007). Fludioxonil, aus der Gruppe der Phenylpyrrole, hyperaktiviert den HOG-Signalweg in Abhängigkeit von Gruppe III HKs. HKs sind in pathogenen Pilzen stark konserviert (Defosse *et al.*, 2015) und kommen dort als Komponenten von Phosphorelaysystemen nicht in Tieren und Menschen vor (Wolanin *et al.*, 2002), wodurch sie als attraktive potentielle Targets für neu zu entwickelnde spezifische Fungizide in Frage kommen.

In *M. oryzae* existieren insgesamt 10 HKs, die im Phosphorelaysystem des HOG-Signalwegs beteiligt sein könnten. Eine direkte Interaktion mit dem Phosphotransferprotein MoYpd1 wurde bisher nur für die HKs MoSln1p und MoHik1p nachgewiesen, es ist jedoch zu vermuten, dass die übrigen 8 HKs (MoHik2p-MoHik9p) ebenso im HOG-Signalweg beteiligt sind (Jacob *et al.*, 2014) (4.2.1). Eine fungizide Aktivität eines Wirkstoffs durch spezifische Modulation einer HK aus einer einzelnen HK-Gruppe, gefolgt von einer Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs ist denkbar – analog zur Modulation der Gruppe III HKs durch Fludioxonil. So wurde bereits beschrieben, dass Marasminsäure in Abhängigkeit von MoSln1p den HOG-Signalweg in *M. oryzae* hyperaktiviert (Jacob *et al.*, 2016). In Bakteriensystemen wurden Wirkstoffe entdeckt, die spezifisch die in Histidinkinasen konservierte ATP-Bindestelle blockieren und somit die Phosphatgruppenübertragung von Histidinkinasen zu den regulatorischen Antwortproteinen hemmen (Wilke *et al.*, 2015). Solche Wirkstoffe können in

Kombination mit verschiedenen HK-lof-Mutanten zum einen hilfreich sein bei der Entschlüsselung der Signalspezifität in Signaltransduktionsvorgängen zwischen HKs und dem Phosphorelaysystem, aber auch bei der Etablierung von Screening-Systemen zur Identifikation von HOG-Signalweg-hyperaktivierenden Substanzen.

Ein solches Screening-System könnte wie folgt etabliert werden: Nach Behandlung von *MoHOG1::GFP*-Konidien mit bioaktiven Substanzen oder Extrakten wird manuell, oder im besten Fall automatisiert, das GFP-Fluoreszenzsignal lokalisiert. Eine gleich bleibende Verteilung des Signals im Zytosol nach Behandlung der Konidien deutet darauf hin, dass die entsprechende Substanz bzw. Extrakt den HOG-Signalweg nicht aktiviert. Eine unmittelbare Akkumulation des Signals im Zellkern hingegen, wie z.B. bei Fludioxonil-Applikation als Positivkontrolle, würde eine Aktivierung des HOG-Signalwegs bedeuten. Dabei ist darauf zu achten, dass das Volumen des Lösungsmittels im Testansatz gering bleibt, damit nicht durch das Lösungsmittel bereits eine Translokation von MoHog1p in den Zellkern erfolgt (3.2.4, Anhang Tab. 4). Durch Expression des Fusionskonstrukts *MoHOG1-GFP* in allen 10 HK-lof-Mutanten in *M. oryzae* könnten die resultierenden Mutanten als Counterscreen bzw. als Target-Validierung für Treffer aus dem ersten Screen verwendet werden: Wenn in Konidien einer der entsprechenden HK-lof-*MoHOG1::GFP*-Mutante eine Akkumulation des GFP-Fluoreszenzsignal im Zellkern nach Behandlung mit einer bestimmten Substanz ausbleibt, in der Mutante *MoHOG1::GFP* jedoch zu detektieren ist, deutet dies auf eine Beteiligung der entsprechenden HK an der durch die Substanz ausgelöste Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs hin. Gegebenenfalls sollte jedoch zunächst eine Beteiligung der übrigen 8 HKs von *M. oryzae* im Phosphorelaysystem und somit im HOG-Signalweg nachgewiesen werden, z.B. mittels Yeast-2-Hybrid oder Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation.

Es ist zu beachten, dass nach langer Bestrahlung von Konidien der *MoHOG1::GFP*-Mutante mit Licht der Anregungswellenlänge für GFP nach einiger Zeit eine Akkumulation des GFP-Fluoreszenzsignals im Zellkern zu beobachten ist, auch ohne hyperosmotischen Stress oder Fungizidstress. Da eine solche strahlungsbedingte Akkumulation des GFP-Fluoreszenzsignals im Zellkern bei Verwendung von energieärmerem Licht der Anregungswellenlänge für RFP (*Red Fluorescent Protein*)-vermittelte Strahlung nicht zu beobachten ist (3.2.4, Anhang Tab. 4), wäre die Expression eines *MoHOG1::RFP*, Konstruktes in den entsprechenden Mutantenstämmen vermutlich ein robusterer Ansatz zur Etablierung eines Screening-Systems.

Auf diese Weise könnten potentielle Leitstrukturen entdeckt werden für putative Fungizide, die im besten Fall spezifischer wirken und weniger negative Seiteneffekte auf Nicht-Zielorganismen haben als Fludioxonil (Verdisson *et al.*, 2001): Es wurde bereits gezeigt, dass Fludioxonil unabhängig vom primären antibiotischen Wirkmechanismus – der Hyper-

aktivierung des HOG-Signalwegs – auch in das Redox-Regulationssystem von Zellen eingreift: Die Wirkung von Fludioxonil kann durch Störung der Glutathion-Homöostase oder der antioxidativen Stressantwort verstärkt werden (Kim *et al.*, 2007a; Kim *et al.*, 2007b). So ist auch zu erkennen, dass Fludioxonil das Wachstum von HOG-Signalweg-lof-Mutanten verlangsamt – wenn auch in weitaus geringerem Maße als das des Wildtypstammes (3.1.1, Abb. 4) (Jacob *et al.*, 2015). Möglicherweise ist die fungizide Wirkung somit nur durch eine Kombination dieser beiden Wirkungsweisen gegeben (Brandhorst und Klein, 2019).

Grundsätzlich ist eine Signalweiterleitung ausgehend von verschiedenen upstream gelgenden HKs über das Phosphotransferprotein MoYpd1p nicht zum regulatorischen Antwortprotein MoSsk1p, sondern zum regulatorischen Antwortprotein MoSkn7p denkbar – analog zum homologen Signalweg in *S. cerevisiae* (Lu *et al.*, 2003). Eine Zellkerntranslokation von MoHog1p wäre somit bei Aktivierung von MoSkn7p durch „HK-abhängige“ bioaktive Substanzen nicht zu detektieren. MoSkn7p, als einziges weiteres regulatorisches Antwortprotein im Genom von *M. oryzae* neben MoSsk1p, ist jedoch vermutlich, so wie homologe Proteine in anderen Pilzen, im Zellkern lokalisiert im Gegensatz zum zytosolischen MoSsk1p (Lu *et al.*, 2003). In diesem Fall wäre über ein Screening-System nachzudenken, bei dem die zelluläre Lokalisation des Phosphotransferproteins und vermutlichen Interaktionspartners von MoSkn7, nämlich MoYpd1p, ebenfalls durch Fusion mit einem Fluoreszenzprotein, zur Beurteilung einer MoSkn7p-abhängigen Wirkung von Substanzen oder Extrakten verwendet wird. MoSkn7p-abhängige Wirkungen von Substanzen sind bisher nicht bekannt.

Das Reporter-Protein MoHog1-GFP könnte gegebenenfalls auch als Marker zur *mode-of-action*-Bewertung von Wirkstoffen verwendet werden, welche nicht primär den HOG-Signalweg aktivieren. In dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass mindestens zwei verschiedene Mechanismen der HOG-Signalweg-Aktivierung bzw. der Zellkerntranslokation von MoHog1p existieren müssen. Es konnte eine Translokation von MoHog1p in den Zellkern beobachtet werden, welche unmittelbar nach Stimulus-Applikation stattfand und gefolgt war von einer intrazellulären Osmolyt-Akkumulation (hyperosmotischer Stress oder Fludioxonil-Stress, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 14). Zusätzlich konnte eine Zellkerntranslokation von MoHog1p beobachtet werden, die erst 5 min nach Stimulus-Applikation stattfindet und nicht gefolgt ist von intrazellulärer Osmolyt-Akkumulation (NaNO₂-Stress oder CoCl₂-Stress, 3.2.4, 3.3.5).

Diese verspätete Zellkerntranslokation von MoHog1p könnte darauf hindeuten, dass sekundär Veränderungen von bislang unbekannten Parametern der zellulären Homöostase wahrgenommen werden und ein entsprechendes Signal über den HOG-Signalweg weitergegeben wird, was in der Zellkerntranslokation von MoHog1p resultiert. So könnten durch Lokalisierung der Zellkernakkumulation des Fluoreszenzsignals zu späteren Zeitpunkten nach Wirkstoffapplikation solche Substanzen identifiziert werden, die nicht primär zu einer Hyperaktivierung des HOG-Signalwegs führen, sondern analog zu NaNO_2 - oder CoCl_2 -Stress zu Veränderungen der zellulären Homöostase, und schließlich zur nukleären Lokalisation von MoHog1p. Möglicherweise könnten so nach Aufbau eines erforderlichen Datensatzes eindeutige Zusammenhänge der exakten Verzögerungsdauer der Zellkerntranslokation von MoHog1p und verschiedenen *modes of action* unterschiedlicher Wirkstoffklassen aufgedeckt werden.

4.2.8 Signalspezifität bei begrenzter Anzahl an Signalproteinen

Signalübertragungen und spezifische zelluläre Antwortreaktionen bei Salzstress, Zuckerstress oder Hypoxie scheinen abhängig zu sein von der Funktionalität jeweils unterschiedlicher Histidinkinasen, aber auch allesamt von der Funktionalität des jeweils selben downstream gelegenen HOG-Signalwegs. Die Beobachtungen dieser und vorangegangener Arbeiten zu HKs, zum Phosphorelaysystem und zum HOG-Signalweg in *M. oryzae* (Jacob *et al.*, 2014; Jacob *et al.*, 2015; Jacob *et al.*, 2016; Jacob *et al.*, 2017a; Jacob *et al.*, 2017b), sowie die daraus gefolgerten Hypothesen führen unausweichlich zur grundsätzlichen Fragestellung von Signalspezifität: Wie ist es möglich, dass ein einzelner Signalweg bei verschiedenen Signal-Inputs (Stressbedingungen) unterschiedliche Outputs (Antwortreaktionen) und somit differenzierte, dem jeweiligen Stimulus angepasste zelluläre Antwortreaktionen initiieren kann?

Zum einen scheint es mindestens zwei verschiedene Aktivierungsmechanismen und zwei Signal-Outputs des HOG-Signalwegs zu geben – einer, bei dem eine nukleäre Translokation von MoHog1p an eine intrazelluläre Akkumulation von Arabitol gekoppelt ist (hyperosmotischer Stress oder Fludioxonil-Stress, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 14), und ein anderer bei dem dies nicht der Fall ist und die nukleäre Translokation von MoHog1p verspätet einsetzt (NaNO_2 - oder CoCl_2 -Stress, 3.2.4, 3.3.5). Weiterhin scheinen bei einem vermeintlich ähnlichen Aktivierungsmechanismus des HOG-Signalwegs durch Salzstress oder Zuckerstress die zellulären Anpassungsstrategien unterschiedlich zu sein (4.2.1, Abb. 21) (Jacob *et al.*, 2014).

So könnten z.B. bei Salzstress, Zuckerstress oder Hypoxie zusätzlich zu einer Aktivierung des HOG-Signalwegs durch MoSln1p oder durch MoHik1p noch andere Signalmoleküle bzw. Signalwege aktiviert werden, was wiederum zu einer differenziellen zellulären Antwortreaktion führen könnte im Vergleich zu einer ausschließlichen Aktivierung des HOG-Signalwegs (4.2.1 Abb. 21 b, vertikale gepunktete Linien). Diese Möglichkeit der Signalkodierung ist beispielsweise in *S. cerevisiae* im Fus3-/Kss1-MAPK-Signalweg unter dem Begriff „AND-gate“ bekannt: Durch gleichzeitige Aktivierung des zusätzlichen Signalproteins Ste5 erfolgt ein anderer Signal-Output als durch alleinige Aktivierung der Ste11-MAPKKK (Flatauer *et al.*, 2005; Bardwell, 2006; Zalatan *et al.*, 2012).

Durch unterschiedliche Stimuli können bei Aktivierung desselben Signalwegs also verschiedene zelluläre Antwortreaktionen erfolgen. Eine derartige Stimulus-abhängige Signalspezifität in einem einzigen Signalweg könnte u.a. auch in einer unterschiedlichen Intensität der Signalweg-Aktivierung kodiert sein, in der Dauer oder der Frequenz der Aktivierung, in einer räumlich-zeitlich abgegrenzten Formation von Signalkomponenten-Komplexen, im Gebrauch unterschiedlicher Konformationen von Signalproteinen durch alternatives Splicing, oder in Kombinationen daraus (Jacob *et al.*, 2017b; Ebisuya *et al.*, 2005; Bardwell, 2006).

In Signaltransduktionswegen spielen modulare Mechanismen bei Input-Output-Interaktionen eine weitaus größere Rolle als es bei klassischen Stoffwechselwegen der Fall ist (Pawson und Nash, 2003). Signalproteine bestehen üblicherweise aus einer kassettenartigen oder modularen Form von Proteindomänen, welche biochemische Wechselwirkungen vermitteln oder enzymatische Aktivität besitzen. So enthalten diese Proteine oft mehrere, sich unabhängig voneinander faltende Domänen oder Motive, die durch Interaktion mit unterschiedlichen Signalkomponenten einen hohen Grad an Vernetzung vermitteln (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Durch gezielte genetische Manipulationen könnten Hybridproteine konstruiert werden, bei denen einzelne Module bzw. Proteindomänen von Signalproteinen durch einzelne Domänen anderer Signalproteine aus anderen Signalwegen ausgetauscht werden. In Kombination mit entsprechenden Reporter-Tools wie z.B. MoHog1p-GFP oder Phosphoproteom-Ansätzen könnte auf diese Weise die Signalspezifität in Signalwegen untersucht werden.

Durch Fusion der in der Lichtperzeption beteiligten Domäne LOV des Proteins YtvA aus *Bacillus subtilis* mit der HK Sln1p und der Expression dieses Hybridproteins in *S. cerevisiae* zusammen mit Hog1p-GFP als Reportersystem, konnte die Zellkerntranslokation von Hog1p-GFP und entsprechende Genexpression durch Licht an Stelle von Salzstress induziert werden (Bury und Hellingwerf, 2018). Auf diese Weise können die Signal-Outputs (Genregulation, metabolische Antwortreaktion) des HOG-Signalwegs getrennt von

generellen Stress-Outputs untersucht werden, indem Stimuli verwendet werden, die keine zusätzlichen und so starken physiologischen Effekte haben so wie Salzstress. So können durch aktivierte Signalwege initiierte, physiologische zelluläre Reaktionen besser voneinander abgegrenzt und verstanden werden.

Die Entschlüsselung von Mechanismen der Signalspezifität in Signaltransduktionssystemen wird unser Verständnis von molekularen Interaktionen verschiedenster Proteindomänen fundamental verbessern und birgt ein enormes Potential an Anwendungsmöglichkeiten bei der Generierung von künstlichen Signalwegen in der synthetischen Biologie (Howard *et al.*, 2003; Peri-Naor *et al.*, 2015; Bäumler *et al.*, 2017).

5 Ausblick

Der „High Osmolarity Glycerol“ (HOG)-Signalweg als Osmoregulationssystem phytopathogener Pilze und gleichzeitig als Fungizid-Target ist ein etabliertes und vielversprechendes System zur Erforschung zellphysiologischer Fragestellungen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse beziehen sich auf die Signaltransduktion und zelluläre Antwort als Reaktion auf externe physiologische Stimuli und auf das Fungizid Fludioxonil.

Als nächster Schritt empfiehlt es sich zum einen die Signalspezifität im HOG-Signalweg weiter zu entschlüsseln: Wie kann ein Signalweg bei verschiedenen Signal-Inputs (Stressbedingungen) unterschiedliche Outputs (Antwortreaktionen) liefern? Dafür könnten Komponenten des Signalwegs genetisch modifiziert werden, z.B. durch Manipulation der Peptidsequenzen in aktiven Zentren, oder durch Generierung von Hybridproteinen, die mit Domänen anderer Signalproteine fusioniert werden, um Signaltransduktionsvorgänge besser zu verstehen. In Kombination mit Phosphoproteomics können so Veränderungen in Phosphorylierungsmustern und somit auch putative „Crosstalks“ mit anderen Signalwegen entdeckt und verstanden werden.

Zum anderen besteht ein großes Interesse daran, den Wirkmechanismus von Fludioxonil weiter aufzudecken. Dabei steht vor allem die Frage nach der molekularen Interaktion des Wirkstoffs mit dem in der Literatur diskutierten vermeintlichen Targetprotein MoHik1p oder aber mit potentiellen weiteren putativen Interaktionspartnern Vordergrund. Dafür erscheint eine Überexpression und Isolierung von MoHik1p gefolgt von *in vitro* Protein-Wirkstoff-Interaktionsstudien z.B. mittels „*Microscale Thermophoresis*“ sinnvoll. Zur Identifikation potentieller weiterer an der Interaktion mit MoHik1p beteiligter Proteine sind proteinbiochemische *in vitro* oder *in vivo* Studien denkbar, wie z.B. Pulldown-Experimente mit MoHik1p und Fludioxonil-behandeltem Proteinextrakt, oder Hefe-Zwei-Hybrid-System-Experimente mit Kultivierung bei Fludioxonil-Stress. Des Weiteren gilt aufzuklären, ob die intrazelluläre Akkumulation von Arabitol bei Fludioxonil-Stress nur ein sekundärer Effekt ist, oder unmittelbar an der Wirkung des Fungizids beteiligt ist und somit eine Rolle im Fludioxonil-induzierten Zelltod spielt. Dies kann z.B. mit Hilfe von Arabitol-Biosynthesedefizienten Mutanten untersucht werden.

Die Entwicklung von Target-basierten *in vivo*-Testsystemen für ein Screening nach HOG-Signalweg-modulierenden protektiven Pflanzenschutzmitteln mit Hilfe von MoHog1p-GFP als Reporter-Tool in Kombination mit „loss of function“-Mutanten ist grundsätzlich durchführbar, wie die Validierung dieses Systems mit Fludioxonil in dieser Arbeit gezeigt hat.

Die bisherige Forschung zum HOG-Signalweg in *M. oryzae* bildet eine solide Basis für versierte und substantielle zukünftige Untersuchungen zur Aufklärung der Wirkmechanismen HOG-Signalweg-modulierender Fungizide, zur Erforschung der Funktionen sensorischer Zwei-komponenten-Hybrid-Histidinkinasen und ihrer Beteiligung im Phosphorelaysystem, sowie zur Entschlüsselung von Signalspezifität in Signaltransduktionsprozessen.

6 Literaturverzeichnis

- Ajouz, S., Bardin, M., Nicot, P., El Maâtaoui, M. (2011). Comparison of the development in planta of a pyrrolnitrin-resistant mutant of *Botrytis cinerea* and its sensitive wild-type parent isolate. *European Journal of Plant Pathology*, 129(1), 31-42.
- Anderson, P., Cunningham, A., Patel, N., Morales, F., Epstein, P., Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(10), 535-544.
- Appleman, J., Chen, L.-L., Stewart, V. (2003). Probing conservation of HAMP linker structure and signal transduction mechanism through analysis of hybrid sensor kinases. *Journal of bacteriology*, 185(16), 4872-82.
- Aravind, L., Ponting, C. (1999). The cytoplasmic helical linker domain of receptor histidine kinase and methyl-accepting proteins is common to many prokaryotic signalling proteins. *FEMS Microbiology Letters*, 176(1), 111-116.
- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuta, A., Tamura, G. (1964). Pyrrolnitrin, a New Antibiotic Substance, Produced by *Pseudomonas*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 28(8), 575-576.
- Attwood, P. (2013). Histidine kinases from bacteria to humans. *Biochemical Society Transactions*, 41(4), 1023-1028.
- Babazadeh, R., Adiels, C., Smedh, M., Petelenz-Kurdziel, E., Goksör, M., Hohmann, S. (2013). Osmostress-induced cell volume loss delays yeast Hog1 signaling by limiting diffusion processes and by Hog1-specific effects. *PLOS ONE*, 8(11), e80901.
- Baeumler, T., Ahmed, A., Fulga, T. (2017). Engineering Synthetic Signaling Pathways with Programmable dCas9-Based Chimeric Receptors. *Cell Reports*, 20(11), 2639-2653.
- Bardwell, L. (2006). Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochemical Society transactions*, 34(5), 837-841.
- Bar-Nun, S., Shneyour, Y., Beckmann, J. (1983). G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochimica et biophysica acta*, 741(1), 123-7.
- Befani, C., Mylonis, I., Gkotiakou, I., Georgoulas, P., Hu, C., Simos, G., Liakos, P. (2013). Cobalt stimulates HIF-1-dependent but inhibits HIF-2-dependent gene expression in liver cancer cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(11), 2359-68.
- Bhate, M., Molnar, K., Goulian, M., DeGrado, W. (2015). Signal transduction in histidine kinases: insights from new structures. *Structure*, 23(6), 981-94.
- Bhattacharyya, R., Reményi, A., Yeh, B., Lim, W. (2006). Domains, Motifs, and Scaffolds: The Role of Modular Interactions in the Evolution and Wiring of Cell Signaling Circuits. *Annual Review of Biochemistry*, 75(1), 655-680.
- Bien, C., Espenshade, P. (2010). Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryotic cell*, 9(3), 352-9.
- Blomberg, A., Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Advances in microbial physiology*, 33, 145-212.
- Bohnert, H., Nelson, D., Jensen, R. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7(7), 1099-1111.

- Bohnert, S., Neumann, H., Thines, E., Jacob, S. (2018a). Visualizing fungicide action: an *in vivo* tool for rapid validation of fungicides with target location HOG pathway. *Pest Management Science*, 75(3), 772-778.
- Bohnert, S., Heck, L., Gruber, C., Neumann, H., Distler, U., Tenzer, S., Yemelin, A., Thines, E., Jacob, S. (2018b). Fungicide resistance toward fludioxonil conferred by overexpression of the phosphatase gene $\Delta MoPTP2$ in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular microbiology*, 0(0), 1-16.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M., Nwachukwu, I., Slusarenko, A. (2014). Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules*, 19(8), 12591-12618.
- Börner, H. (2009). Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 8. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Brandhorst, T., Klein, B. (2019). Uncertainty surrounding the mechanism and safety of the post-harvest fungicide fludioxonil. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 561-565.
- Brewster, J., de Valoir, T., Dwyer, N., Winter, E., Gustin, M. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259(5102), 1760-3.
- Brown, A. (1978). Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic micro-organisms. *Advances in microbial physiology*, 17, 181-242.
- Brown, S., Campbell, L., Lodge, J. (2007). *Cryptococcus neoformans*, a fungus under stress. *Current opinion in microbiology*, 10(4), 320-5.
- Buck, V., Quinn, J., Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B.-A., Millar, J. (2001). Peroxide Sensors for the Fission Yeast Stress-activated Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2), 407-419.
- Bury, A., Hellingwerf, K. (2018). Design, characterization and in vivo functioning of a light-dependent histidine protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Express*, 8(1), 53.
- Catlett, N., Yoder, O., Turgeon, B. (2003). Whole-genome analysis of two-component signal transduction genes in fungal pathogens. *Eukaryotic cell*, 2(6), 1151-61.
- Chang, C., Kwok, S., Bleecker, A., Meyerowitz, E. (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science*, 262(5133), 539-44.
- Cheetham, J., Smith, D., da Silva Dantas, A., Doris, K., Patterson, M., Bruce, C., Quinn, J. (2007). A Single MAPKKK Regulates the Hog1 MAPK Pathway in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11), 4603-4614.
- Chen, R., Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1311-40.
- Choi, Y.-E., Shim, W.-B. (2008). Functional characterization of *Fusarium verticillioides* CPP1, a gene encoding a putative protein phosphatase 2A catalytic subunit. *Microbiology*, 154(1), 326-336.
- Chung, D., Barker, B., Carey, C., Merriman, B., Werner, E., Lechner, B., Dhingra, S., Cheng, C., Xu, W., Blosser, S., Morohashi, K., Mazurie, A., Mitchell, T., Haas, H., Mitchell, A., Cramer, R. (2014). ChIP-seq and In Vivo Transcriptome Analyses of the *Aspergillus fumigatus* SREBP SrbA Reveals a New Regulator of the Fungal Hypoxia Response and Virulence. (T. Doering, Hrsg.) *PLOS Pathogens*, 10(11), e1004487.
- Cole, M., Augustin, M., Robertson, M., Manners, J. (2018). The science of food security. *npj Science of Food*, 2(1), 14.
- Davies, B., Rine, J. (2006). A role for sterol levels in oxygen sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 174(1), 191-201.
- De Groote, M., Fang, F. (1995). NO inhibitions: antimicrobial properties of nitric oxide. *Clinical infectious diseases*, 21 Suppl 2, S162-5.

- Dean, R., Talbot, N., Ebbole, D., Farman, M., Mitchell, T., Orbach, M., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J., Pan, H., Read, N., Lee, Y., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y., Donofrio, N., Jeong, J., Soanes, D., 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., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J., Birren, B. (2005). The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 434(7036), 980-986.
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond-Kosack, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.
- Defosse, T., Sharma, A., Mondal, A., Dugé de Bernonville, T., Latgé, J.-P., Calderone, R., Giglioli-Guivarc'h, N., Courdavault, V., Clastre, M., Papon, N. (2015). Hybrid histidine kinases in pathogenic fungi. *Molecular Microbiology*, 95(6), 914-924.
- Diano, A., Bekker-Jensen, S., Dynesen, J., Nielsen, J. (2006). Polyol synthesis in *Aspergillus niger*: Influence of oxygen availability, carbon and nitrogen sources on the metabolism. *Biotechnology and Bioengineering*, 94(5), 899-908.
- Dickman, M., Yarden, O. (1999). Serine/Threonine Protein Kinases and Phosphatases in Filamentous Fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 26(2), 99-117.
- Dihazi, H., Kessler, R., Eschrich, K. (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *The Journal of biological chemistry*, 279(23), 23961-8.
- Dijksterhuis, J., de Vries, R. (2006). Compatible solutes and fungal development. *The Biochemical Journal*, 399(2), e3-5.
- Dixon, K., Xu, J., Smirnov, N., Talbot, N. (1999). Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant cell*, 11(10), 2045-58.
- Dunin-Horkawicz, S., Lupas, A. (2010). Comprehensive Analysis of HAMP Domains: Implications for Transmembrane Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 397(5), 1156-1174.
- Ebisuya, M., Kondoh, K., Nishida, E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *Journal of Cell Science*, 118(14), 2997-3002.
- Ehrlich, P., Ehrlich, A. 1990. The population explosion. Why isn't everyone as scared as we are? *The Amicus Journal*, 12(1), 22-9.
- El-Mowafy, M., Bahgat, M., Bilitecki, U. (2013). Deletion of the HAMP domains from the histidine kinase CaNik1p of *Candida albicans* or treatment with fungicides activates the MAP kinase Hog1p in *Saccharomyces cerevisiae* transformants. *BMC Microbiology*, 13(1), 209.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M., Lucas, C., Brandt, A. (2005). A Member of the Sugar Transporter Family, Stt1p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), 2068-2076.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., Silver, P. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO Journal*, 17(19), 5606-5614.
- Ficarro, S., McClelland, M., Stukenberg, P., Burke, D., Ross, M., Shabanowitz, J., Hunt, D., White, F. (2002). Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotechnology*, 20(3), 301-305.
- Fillinger, S., Ajouz, S., Nicot, P., Leroux, P., Bardin, M. (2012). Functional and Structural Comparison of Pyrrolnitrin- and Iprodione-Induced Modifications in the Class III Histidine-Kinase Bos1 of *Botrytis cinerea*. *PLOS ONE*, 7(8), e42520.

- Fisher, M., Hawkins, N., Sanglard, D., Gurr, S. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 360(6390), 739-742.
- Flatauer, L., Zadeh, S., Bardwell, L. (2005). Mitogen-Activated Protein Kinases with Distinct Requirements for Ste5 Scaffolding Influence Signaling Specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(5), 1793-1803.
- Forman, H., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 1-12.
- Franck, W., Gokce, E., Randall, S., Oh, Y., Eyre, A., Muddiman, D., Dean, R. (2015). Phosphoproteome Analysis Links Protein Phosphorylation to Cellular Remodeling and Metabolic Adaptation during *Magnaporthe oryzae* Appressorium Development. *Journal of Proteome Research*, 14(6), 2408-2424.
- Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I. (2000a). Fungicide Resistance and Osmotic Stress Sensitivity in os Mutants of *Neurospora crassa*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 67(2), 125-133.
- Fujimura, M., Ochiai, N., Ichiishi, A., Usami, R., Horikoshi, K., Yamaguchi, I. (2000b). Sensitivity to Phenylpyrrole Fungicides and Abnormal Glycerol Accumulation in Os and Cut Mutant Strains of *Neurospora crassa*. *Journal of Pesticide Science*, 25(1), 31-36.
- Furukawa, K., Randhawa, A., Kaur, H., Mondal, A., Hohmann, S. (2012). Fungal fludioxonil sensitivity is diminished by a constitutively active form of the group III histidine kinase. *FEBS Letters*, 586(16), 2417-2422.
- Gao, R., Stock, A. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, 63, 133-54.
- Galperin, M., Higdon, R., Kolker, E. (2010). Interplay of heritage and habitat in the distribution of bacterial signal transduction systems. *Molecular Biosystems*, 6(4), 721-728.
- Garcia, D., Watts, K., Johnson, M., Taylor, B. (2016). Delineating PAS-HAMP interaction surfaces and signalling-associated changes in the aerotaxis receptor Aer. *Molecular Microbiology*, 100(1), 156-172.
- Ghosh, A., Servin, J., Park, G., Borkovich, K. (2014). Global Analysis of Serine/Threonine and Tyrosine Protein Phosphatase Catalytic Subunit Genes in *Neurospora crassa* Reveals Interplay Between Phosphatases and the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *G3 Genes, Genomes, Genetics*, 4(2), 349-365.
- Ghugre, S., Rai, A., Suprasanna, P. (2010). Comparative Effects of NaCl, PEG and Mannitol Iso-osmotic Stress on Solute Accumulation and Antioxidant Enzyme System in Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Global Science Books: Plant Stress*, 4, 50-55.
- Gibson D., Young L., Chuang R., Venter J., Hutchison C. 3rd, Smith H. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5): 343-5.
- Green, M., Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, New York.
- Gupta, B., Huang, B. (2014). Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*, <https://doi.org/10.1155/2014/701596>.
- Hagiwara, D., Sakamoto, K., Abe, K., Gomi, K. (2016). Signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(9), 1667-1680.
- Hahn, M. (2014). The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *Journal of chemical biology*, 7(4), 133-41.
- Hamel, L.-P., Nicole, M.-C., Duplessis, S., Ellis, B. (2012). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *The Plant cell*, 24(4), 1327-51.

- Heller, J., Ruhnke, N., Espino, J., Massaroli, M., Collado, I., Tudzynski, P. (2012). The Mitogen-Activated Protein Kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* Is Required for Pathogenic Development and Has Broad Regulatory Functions Beyond Stress Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(6), 802-816.
- Hérivaux, A., So, Y.-S., Gastebois, A., Latgé, J.-P., Bouchara, J.-P., Bahn, Y.-S., Papon, N. (2016). Major Sensing Proteins in Pathogenic Fungi: The Hybrid Histidine Kinase Family. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005683.
- Herrero-de-Dios, C., Alonso-Monge, R., Pla, J. (2014). The lack of upstream elements of the Cek1 and Hog1 mediated pathways leads to a synthetic lethal phenotype upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Fungal Genetics and Biology*, 69, 31-42.
- Hewitt, G. (2000). New modes of action of fungicides. *Pesticide Outlook*, 11(1), 28-32.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(2), 300-72.
- Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 583(24), 4025-4029.
- Hon, T., Dodd, A., Dirmeier, R., Gorman, N., Sinclair, P., Zhang, L., Poyton, R. (2003). A Mechanism of Oxygen Sensing in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 50771-50780.
- Howard, P., Chia, M., Del Rizzo, S., Liu, F.-F., Pawson, T. (2003). Redirecting tyrosine kinase signaling to an apoptotic caspase pathway through chimeric adaptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), 11267-11272.
- Howard, R., Valent, B. (1996). Breaking and entering: Host Penetration by the Fungal Rice Blast Pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 491-512.
- Hulko, M., Berndt, F., Gruber, M., Linder, J., Truffault, V., Schultz, A., Lupas, A., Coles, M. (2006). The HAMP Domain Structure Implies Helix Rotation in Transmembrane Signaling. *Cell*, 126(5), 929-940.
- Hult, K., Veide, A., Gatenbeck, S. (1980). The distribution of the NADPH regenerating mannitol cycle among fungal species. *Archives of microbiology*, 128(2), 253-5.
- Islam, M., Croll, D., Gladieux, P., Soanes, D., Persoons, A., Bhattacharjee, P., Hossain, M., Gupta, D., Rahman, M., Mahboob, M., Cook, N., Salam, M., Surovy, M., Sancho, V., Maciel, J., Nhani Júnior, A., Castroagudín, V., Reges, J., Ceresini, P., Ravel, S., Kellner, R., Fournier, E., Tharreau, D., Lebrun, M., McDonald, B., Stitt, T., Swan, D., Talbot, N., Saunders, D., Win, J., Kamoun, S. (2016). Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Biology*, 14(1), 84.
- Islas-Flor, I., Sanchez-Ro, Y., Brito-Arga, L., Peraza-Ech, L., Rodriguez, C., Couoh-Uica, Y., James, A., Tzec-Simá, M., Canto-Canc, B., Peraza-Ech, S. (2011). The Amazing Role of the Group III of Histidine Kinases in Plant Pathogenic Fungi, an Insight to Fungicide Resistance. *Asian Journal of Biochemistry*, 6(1), 1-14.
- Jacob, S., Foster, A., Yemelin, A., Thines, E. (2014). Histidine kinases mediate differentiation, stress response, and pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *MicrobiologyOpen*, 3(5), 668–687.
- Jacob, S., Foster, A., Yemelin, A., Thines, E. (2015). High osmolarity glycerol (HOG) signaling in *Magnaporthe oryzae*: Identification of MoYPD1 and its role in osmoregulation, fungicide action and pathogenicity. *Fungal Biology*, 119(7), 580–594.
- Jacob, S., Schueffler, A., Thines, E. (2016). Hog1p-activation by marasmiic acid through inhibition of the histidine kinase Sln1p. *Pest Management Science*, 72(6), 1268–1274.
- Jacob, S., Yemelin, A., Bohnert, S., Andresen, K., Thines, E. (2017a). The exceptionality of stress response in *Magnaporthe oryzae*: a set of “salt stress-induced” genes unique to the rice blast fungus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(4), 399-402.

- Jacob, S., Thines, E. (2017b). Multistep phosphorelay in fungi: the enigma of multiple signals and a limited number of signaling pathways. *Mycological Progress*, 16(11-12).
- Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A., Mattison, C., Ota, I. (1997). Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *The Journal of biological chemistry*, 272(28), 17749-55.
- Jeon, J., Park, S.-Y., Chi, M.-H., Choi, J., Park, J., Rho, H.-S., Kim, S., Goh, J., Yoo, S., Park, J., Yi, M., Yang, S., Kwon, M., Han, S., Kim, B., Khang, C., Park, B., Lim, S., Jung, K., Kong, S., Karunakaran, M., Oh, H., Kim, H., Kang, S., Choi, W., Lee, Y.-H. (2007). Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus. *Nature Genetics*, 39(4), 561-565.
- Jiang, C., Zhang, X., Liu, H., Xu, J.-R. (2018). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant pathogenic fungi. *PLOS Pathogens*, 14(3), e1006875.
- Johnson, L. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627-641.
- Johnson, L., Barford, D. (1993). The Effects of Phosphorylation on the Structure and Function of Proteins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22(1), 199-232.
- Joseph-Horne, T., Hollomon, D., Wood, P. (2001). Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochimica et biophysica acta*, 1504(2-3), 179-95.
- Kaur, H., Singh, S., Rathore, Y., Sharma, A., Furukawa, K., Hohmann, S., Ashish, Mondal, A. (2014). Differential role of HAMP-like linkers in regulating the functionality of the group III histidine kinase DhNik1p. *The Journal of biological chemistry*, 289(29), 20245-58.
- Keating, B., Herrero, M., Carberry, P., Gardner, J., Cole, M. (2014). Food wedges: Framing the global food demand and supply challenge towards 2050. *Global Food Security*, 3(3-4), 125-132.
- Kehoe, D., Grossman, A. (1996). Similarity of a chromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science*, 273(5280), 1409-12.
- Keith, J., Derek, W. (2007). Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed? 2. Auflage, *Fungicide Resistance Action Committee*.
- Kilani, J., Fillinger, S. (2016). Phenylpyrroles: 30 Years, Two Molecules and (Nearly) No Resistance. *Frontiers in microbiology*, 7, 2014.
- Kim, J., Campbell, B., Mahoney, N., Chan, K., Molyneux, R., May, G. (2007a). Enhancement of fludioxonil fungicidal activity by disrupting cellular glutathione homeostasis with 2,5-dihydroxybenzoic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 270(2), 284-290.
- Kim, J., Campbell, B., Mahoney, N., Chan, K., Molyneux, R., May, G. (2007b). Enhanced activity of strobilurin and fludioxonil by using berberine and phenolic compounds to target fungal antioxidative stress response. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 134-141.
- Kimura, M., Kamakura, T., Tao, Q., Kaneko, I., Yamaguchi, I. (1994). Cloning of the blasticidin S deaminase gene (BSD) from *Aspergillus terreus* and its use as a selectable marker for *Schizosaccharomyces pombe* and *Pyricularia oryzae*. *Molecular and General Genetics*, 242(2), 121-9.
- Knauth, P., Reichenbach, H. (2000). On the Mechanism of Action of the Myxobacterial Fungicide Ambruticin. *The Journal of Antibiotics*, 53(10), 1182-1190.
- Kojima, K., Takano, Y., Yoshimi, A., Tanaka, C., Kikuchi, T., Okuno, T. (2004). Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 53(6), 1785-1796.
- Kosmidou, E., Lunness, P., Doonan, J. (2001). A type 2A protein phosphatase gene from *Aspergillus nidulans* is involved in hyphal morphogenesis. *Current genetics*, 39(1), 25-34.

- Kotzka, J., Müller-Wieland, D., Roth, G., Kremer, L., Munck, M., Schürmann, S., Knebel, B., Krone, W. (2000). Sterol regulatory element binding proteins (SREBP)-1a and SREBP-2 are linked to the MAP-kinase cascade. *Journal of Lipid Research*, 41(1), 99-108.
- Kramer, B., Thines, E., Foster, A. (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.
- Krantz, M., Becit, E., Hohmann, S. (2006). Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Current Genetics*, 49(3), 137-151.
- Krausmann, F., Lauk, C., Haas, W., Wiedenhofer, D. (2018). From resource extraction to outflows of wastes and emissions: The socioeconomic metabolism of the global economy, 1900–2015. *Global Environmental Change*, 52, 131-140.
- Lara-Rojas, F., Sánchez, O., Kawasaki, L., Aguirre, J. (2011). *Aspergillus nidulans* transcription factor AtfA interacts with the MAPK SakA to regulate general stress responses, development and spore functions. *Molecular Microbiology*, 80(2), 436-454.
- Latt, S., Stetten, G., Juergens, L., Willard, H., Scher, C. (July 1975). Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 23(7): 493–505.
- Lawry, S., Tebbets, B., Kean, I., Stewart, D., Hetelle, J., Klein, B. (2017). Fludioxonil induces Drk1, a fungal group III hybrid histidine kinase, to dephosphorylate its downstream target, Ypd1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2), 01414-16.
- Lawry, S. (2017). Characterization of the Mechanism of Action of Fludioxonil, an Agricultural Antifungal. *Madison ProQuest Dissertations Publishing*, 10286058
- Lazo, G., Stein, P., Ludwig, R. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnology*, 9(10), 963-967.
- Lee, H., Bien, C., Hughes, A., Espenshade, P., Kwon-Chung, K., Chang, Y. (2007). Cobalt chloride, a hypoxia-mimicking agent, targets sterol synthesis in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* 65(4), 1018-1033.
- Lee, K.-T., Byun, H.-J., Jung, K.-W., Hong, J., Cheong, E., Bahn, Y.-S. (2014). Distinct and Redundant Roles of Protein Tyrosine Phosphatases Ptp1 and Ptp2 in Governing the Differentiation and Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell*, 13(6), 796-812.
- Leroux, P. (1996). Recent Developments in the Mode of Action of Fungicides. *Pesticide Science*, 47(2), 191-197.
- Lew, R. (2010). Turgor and net ion flux responses to activation of the osmotic MAP kinase cascade by fludioxonil in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, 47(8), 721-726.
- Li, G., Zhou, X., Xu, J.-R. (2012). Genetic control of infection-related development in *Magnaporthe oryzae*. *Current Opinion in Microbiology*, 15(6), 678-684.
- Li, M., Elledge S. (2007). Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC. *Nature Methods*, 4(3): 251-6.
- Li, X., Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Schnabel, G. (2014). Resistance to Fludioxonil in *Botrytis cinerea* Isolates from Blackberry and Strawberry. *Phytopathology*, 104(7), 724-732.
- Liu, X., Li, H., Liu, Q., Niu, Y., Hu, Q., Deng, H., Cha, J., Wang, Y., Liu, Y., He, Q. (2015). Role for Protein Kinase A in the *Neurospora* Circadian Clock by Regulating White Collar-Independent frequencyTranscription through Phosphorylation of RCM-1. *Molecular and Cellular Biology*, 35(12), 2088-2102.
- Lluis, J., Morales, A., Blasco, C., Colell, A., Mari, M., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J. (2005). Critical Role of Mitochondrial Glutathione in the Survival of Hepatocytes during Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 280(5), 3224-3232.

- Loehrer, M., Botterweck, J., Jahnke, J., Mahlmann, D., Gaetgens, J., Oldiges, M., Horbach, R., Deising, H., Schaffrath, U. (2014). *In vivo* assessment by Mach-Zehnder double-beam interferometry of the invasive force exerted by the Asian soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi*). *New Phytologist*, 203(2), 620-631.
- Lu, J.-Y., Deschenes, R., Fassler, J. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryotic cell*, 2(6), 1304-14.
- Maeda, T., Takekawa, M., Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, 269(5223), 554-8.
- Maeda, T., Tsai, A., Saito, H. (1993). Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 13(9), 5408-17.
- Mansfield, K., Simon, M., Keith, B. (2004). Hypoxic reduction in cellular glutathione levels requires mitochondrial reactive oxygen species. *Journal of Applied Physiology*, 97(4), 1358-1366.
- Mapes, J., Ota, I. (2004). Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *The EMBO journal*, 23(2), 302-11.
- Mascher, T., Helmann, J., Unden, G. (2006). Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 910-38.
- Mattison, C., Spencer, S., Kresge, K., Lee, J., Ota, I. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Molecular and Cellular Biology*, 19(11), 7651-60.
- Mattison, C., Ota, I. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes & Development*, 14(10), 1229-35.
- McDonald, B., Stukenbrock, E. H. (2016). Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 371(1709), 20160026.
- Meena, N., Kaur, H., Mondal, A. (2010). Interactions among HAMP domain repeats act as an osmosensing molecular switch in group III hybrid histidine kinases from fungi. *The Journal of biological chemistry*, 285(16), 12121-32.
- Melgar, J., Guidi, L., Remorini, D., Agati, G., Degl'innocenti, E., Castelli, S., Camilla Baratto, M., Faraloni, C., Tattini, M. (2009). Antioxidant defences and oxidative damage in salt-treated olive plants under contrasting sunlight irradiance. *Tree Physiology*, 29(9), 1187-1198.
- Mizuno, T., Wurtzel, E., Inouye, M. (1982). Osmoregulation of gene expression. II. DNA sequence of the envZ gene of the ompB operon of *Escherichia coli* and characterization of its gene product. *The Journal of biological chemistry*, 257(22), 13692-8.
- Morton, V., Staub, T. (2008). A Short History of Fungicides. *APSnet Feature Articles*. <https://doi.org/10.1094/APSnetFeature-2008-0308>
- Motoyama, T., Ohira, T., Kadokura, K., Ichiishi, A., Fujimura, M., Yamaguchi, I., Kudo, T. (2005). An Os-1 family histidine kinase from a filamentous fungus confers fungicide-sensitivity to yeast. *Current Genetics*, 47(5), 298-306.
- Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I., Brown, A. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC evolutionary biology*, 9, 44.
- Nordberg, H., Cantor, M., Dusheyko, S., Hua, S., Poliakov, A., Shabalov, I., Smirnova, T., Grigoriev, I. V., Dubchak, I. (2013). The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D26-31.

- Nyfeler, R., Ackermann, P. (1992). Phenylpyrroles, a New Class of Agricultural Fungicides Related to the Natural Antibiotic Pyrrolnitrin. *Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III*, 395-404.
- Ochiai, N., Fujimura, M., Oshima, M., Motoyama, T., Ichiishi, A., Yamada-Okabe, H., Yamaguchi, I. (2002). Effects of Iprodione and Fludioxonil on Glycerol Synthesis and Hyphal Development in *Candida albicans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(10), 2209-2215.
- Oerke, E.-C., Dehne, H.-W. (2004). Safeguarding production—losses in major crops and the role of crop protection. *Crop Protection*, 23(4), 275-285.
- Oerke, E. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Olayioye, M., Neve, R., Lane, H., Hynes, N. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO Journal*, 19(13), 3159-3167.
- Ostrander, D., Gorman, J. (1999). The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *Journal of bacteriology*, 181(8), 2527-34.
- Ota, I., Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, 262(5133), 566-9.
- Pawson, T., Nash, P. (2003). Assembly of Cell Regulatory Systems Through Protein Interaction Domains. *Science*, 300(5618), 445-452.
- Pennisi, E. (2010). Armed and dangerous. *Science*, 327(5967), 804-805.
- Peri-Naor, R., Motiei, L., Margulies, D. (2015). Artificial signal transduction therapy: a futuristic approach to disease treatment. *Future Medicinal Chemistry*, 7(16), 2091-2093.
- Peters, C., Picardy, J., Darrouzet-Nardi, A., Wilkins, J., Griffin, T., Fick, G. (2016). Carrying capacity of U.S. agricultural land: Ten diet scenarios. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 4(0), 000116.
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
- Poore, J., Nemecek, T. (2018). Reducing food's environmental impacts through producers and consumers. *Science*, 360(6392), 987-992.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., McCartney, R., Schmidt, M., Rachidi, N., Lee, S., Mah, A., Meng, L., Stark, M., Stern, D., De Virgilio, C., Tyers, M., Andrews, B., Gerstein, M., Schweitzer, B., Predki, P., Snyder, M. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*, 438(7068), 679-684.
- Qi, M., Elion, E. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, 118(16), 3569-3572.
- Rabinkov, A., Miron, T., Mirelman, D., Wilchek, M., Glozman, S., Yavin, E., & Weiner, L. (2000). S-Allylmercaptogluthathione: the reaction product of allicin with glutathione possesses SH-modifying and antioxidant properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1499(1-2), 144-153.
- Rauscher, S., Pacher, S., Hedtke, M., Kniemeyer, O., Fischer, R. (2016). A phosphorylation code of the *Aspergillus nidulans* global regulator VelvetA (VeA) determines specific functions. *Molecular Microbiology*, 99(5), 909-924.
- Ravikumar, V., Shi, L., Krug, K., Derouiche, A., Jers, C., Cousin, C., Kobir, A., Mijakovic, I., Macek, B. (2014). Quantitative Phosphoproteome Analysis of *Bacillus subtilis* Reveals Novel Substrates of the Kinase PrkC and Phosphatase PrpC. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(8), 1965-1978.
- Reiser, V., Ammerer, G., Ruis, H. (1999). Nucleocytoplasmic traffic of MAP kinases. *Gene expression*, 7(4-6), 247-54.

- Ren, W., Shao, W., Han, X., Zhou, M., Chen, C. (2016). Molecular and Biochemical Characterization of Laboratory and Field Mutants of *Botrytis cinerea* Resistant to Fludioxonil. *Plant Disease*, 100(7), 1414-1423.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J., Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *The Journal of biological chemistry*, 275(12), 8290-300.
- Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J., Hohmann, S., Ammerer, G., Ruis, H. (1999). Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Molecular and cellular biology*, 19(8), 5474-85.
- Richardson, K., Cooper, K., Marriott, M., Tarbit, M., Troke, P., Whittle, P. (1990). Discovery of fluconazole, a novel antifungal agent. *Reviews of infectious diseases*, 12 Suppl 3, S267-71.
- Rong, Z., Wilson, M., Cooper, C. (2013). A model for the nitric oxide producing nitrite reductase activity of hemoglobin as a function of oxygen saturation. *Nitric Oxide*, 33, 74-80.
- Rudolph, J., Oesterhelt, D. (1995). Chemotaxis and phototaxis require a CheA histidine kinase in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *The EMBO journal*, 14(4), 667-73.
- Russel, P. (2005). A century of fungicide evolution. *The Journal of Agricultural Science*, 143(1), 11-25.
- Saito, H., Tatebayashi, K. (2004). Regulation of the Osmoregulatory HOG MAPK Cascade in Yeast. *Journal of Biochemistry*, 136(3), 267-272.
- Sakulkoo, W., Osés-Ruiz, M., Oliveira Garcia, E., Soanes, D., Littlejohn, G., Hacker, C., Correia, A., Valent, B., Talbot, N. (2018). A single fungal MAP kinase controls plant cell-to-cell invasion by the rice blast fungus. *Science*, 359(6382), 1399-1403.
- Sambrock, J., Russel, D. (2001). Molecular Cloning - a laboratory manual. 3. Auflage, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schramski, J., Gattie, D., Brown, J. (2015). Human domination of the biosphere: Rapid discharge of the earth-space battery foretells the future of humankind. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), 9511-9517.
- Schuster, S., Noegel, A., Oehme, F., Gerisch, G., Simon, M. (1996). The hybrid histidine kinase DokA is part of the osmotic response system of *Dictyostelium*. *The EMBO journal*, 15(15), 3880-9.
- Serrano, R. (1996). Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *International review of cytology*, 165, 1-52.
- Shavrukov, Y. (2013). Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 119-127.
- Shen, B., Hohmann, S., Jensen, R., Bohnert, H. (1999). Roles of sugar alcohols in osmotic stress adaptation. Replacement of glycerol by mannitol and sorbitol in yeast. *Plant Physiology*, 121(1), 45-52.
- Shen, B., Jensen, R., Bohnert, H. (1997). Mannitol Protects against Oxidation by Hydroxyl Radicals. *Plant physiology*, 115(2), 527-532.
- Shitamukai, A., Hirata, D., Sonobe, S., Miyakawa, T. (2004). Evidence for antagonistic regulation of cell growth by the calcineurin and high osmolarity glycerol pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 279(5), 3651-61.
- Shor, E., Chauhan, N. (2015). A Case for Two-Component Signaling Systems As Antifungal Drug Targets. *PLOS Pathogens*, 11(2), e1004632.
- Skerker, J., Prasol, M., Perchuk, B., Biondi, E., Laub, M. (2005). Two-Component Signal Transduction Pathways Regulating Growth and Cell Cycle Progression in a Bacterium: A System-Level Analysis. *PLOS Biology*, 3(10), e334.

- Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., Savouré, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany*, 115(3), 433-47.
- Solomon, P., Waters, O., Jörgens, C., Lowe, R., Rechberger, J., Trengove, R., Oliver, R. (2006). Mannitol is required for asexual sporulation in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum* (glume blotch). *Biochemical Journal*, 399(2), 231-239.
- Stamler, J. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78(6), 931-6.
- Stensvold, C., Jørgensen, L., Arendrup, M. (2012). Azole-Resistant Invasive Aspergillosis: Relationship to Agriculture. *Current Fungal Infection Reports*, 6(3), 178-191.
- Stock, A., Robinson, V., Goudreau, P. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183-215.
- Stoll-Kleemann, S., Schmidt, U. (2017). Reducing meat consumption in developed and transition countries to counter climate change and biodiversity loss: a review of influence factors. *Regional Environmental Change*, 17(5), 1261-1277.
- Sweigard, J., Chumley, F., Carroll, A., Farrall, L., Valent, B. (1997). A series of vectors for fungal transformation. *Fungal Genetics Newsletter* 44(19), 52-53.
- Talbot, N. (2003). On the Trail of a Cereal Killer: Exploring the Biology of *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 177-202.
- Tanaka, C., Izumitsu, K. (2010). Two-Component Signaling System in Filamentous Fungi and the Mode of Action of Dicarboximide and Phenylpyrrole Fungicides. In *Fungicides*. InTech, Rijeka, Croatia, 523-538.
- Tao, W., Deschenes, R., Fassler, J. (1999). Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(1), 360-7.
- Taylor, B., Zhulin, I. (1999). PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 479-506.
- Thines, E., Weber, R., Talbot, N. (2000). MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *The Plant cell*, 12(9), 1703-18.
- Thorsen, M., Di, Y., Tängemo, C., Morillas, M., Ahmadpour, D., Van der Does, C., Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R., Tamás, M. (2006). The MAPK Hog1p Modulates Fps1p-dependent Arsenite Uptake and Tolerance in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17(10), 4400-4410.
- Tsuda, M., Tanaka, C., Yoshimi, A. (2004). Cloning and characterization of the histidine kinase gene Dic1 from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. *Molecular Genetics and Genomics*, 271(2), 228-236.
- Tucker, S., Talbot, N. (2001). Surface Attachment and Pre-Penetration Stage Development By Plant Pathogenic Fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39(1), 385-417.
- Ulrich, L., Zhulin, I. (2010). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Research*, Suppl 1 D401-D407.
- Upadhyay, R., Kim, H., Jung, K.-W., Park, G., Lam, W., Lodge, J., Bahn, Y.-S. (2013). Sulphiredoxin plays peroxiredoxin-dependent and -independent roles via the HOG signalling pathway in *Cryptococcus neoformans* and contributes to fungal virulence. *Molecular Microbiology*, 90(3), 630-648.
- Utsumi, R., Brisette, R., Rampersaud, A., Forst, S., Oosawa, K., Inouye, M. (1989). Activation of bacterial porin gene expression by a chimeric signal transducer in response to aspartate. *Science*, 245(4923), 1246-9.

- Valderrama, R., Corpas, F., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M., Chaki, M., Pedrajas, J., Fernández-Ocaña, A., Del Río, L., Barroso, J. (2006). The dehydrogenase-mediated recycling of NADPH is a key antioxidant system against salt-induced oxidative stress in olive plants. *Plant, Cell & Environment*, 29(7), 1449-59.
- Verdisson, S., Couderchet, M., Vernet, G. (2001). Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants. *Chemosphere*, 44(3), 467-74.
- Vetcher, L., Menzella, H., Kudo, T., Motoyama, T., Katz, L. (2007). The Antifungal Polyketide Ambruticin Targets the HOG Pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(10), 3734-3736.
- Viaud, M., Fillinger, S., Liu, W., Polepalli, J., Le Pêcheur, P., Kunduru, A., Leroux, P., Legendre, L. (2006). A Class III Histidine Kinase Acts as a Novel Virulence Factor in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(9), 1042-1050.
- Vyska, M., Cuniffe, N., Gilligan, C. (2016). Trade-off between disease resistance and crop yield: a landscape-scale mathematical modelling perspective. *Journal of the Royal Society*, 13(123), 1042-1050.
- Wackernagel, M., Schulz, N., Deumling, D., Linares, A., Jenkins, M., Kapos, V., Monfreda, C., Loh, J., Myers, N., Norgaard, R., Randers, J. (2002). Tracking the ecological overshoot of the human economy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14), 9266-71.
- Walia, A., & Calderone, R. (2008). The Ssk2 MAPKKK of *Candida albicans* is required for oxidant adaptation *in vitro*. *FEMS Yeast Research*, 8(2), 287-299.
- Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., Ota, I. (2001). Ptc1, a Type 2C Ser/Thr Phosphatase, Inactivates the HOG Pathway by Dephosphorylating the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), 51-60.
- Wilke, K., Francis, S., Carlson, E. (2015). Inactivation of multiple bacterial histidine kinases by targeting the ATP-binding domain. *ACS Chemical Biology*, 10(1), 328-35.
- Willger, S., Puttikamonkul, S., Kim, K.-H., Burritt, J., Grahl, N., Metzler, L., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C., Cramer, R. (2008). A Sterol-Regulatory Element Binding Protein Is Required for Cell Polarity, Hypoxia Adaptation, Azole Drug Resistance, and Virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Pathogens*, 4(11), e1000200.
- Winkelströter, L., Bom, V., de Castro, P., Ramalho, L., Goldman, M., Brown, N., Rajendran, R., Ramage, G., Bovier, E., Dos Reis, T., Savoldi, M., Hagiwara, D., Goldman, G. (2015). High osmolarity glycerol response PtcB phosphatase is important for *Aspergillus fumigatus* virulence. *Molecular Microbiology*, 96(1), 42-54.
- Wolanin, P., Thomason, P., Stock, J. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), Reviews3013.
- Wong, J., Chen, Y., Gan, Y.-H. (2015). Host Cytosolic Glutathione Sensing by a Membrane Histidine Kinase Activates the Type VI Secretion System in an Intracellular Bacterium. *Cell Host & Microbe*, 18(1), 38-48.
- Wood, P. (1980). Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 85(2), 271-287.
- Wurgler-Murphy, S., Maeda, T., Witten, E., Saito, H. (1997). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), 1289-97.
- Xu, J., Staiger, C., Hamer, J. (1998). Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(21), 12713-8.
- Yancey, P., Clark, M., Hand, S., Bowlus, R., & Somero, G. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.

- Yang, Q., Yu, F., Yin, Y., Ma, Z. (2013). Involvement of Protein Tyrosine Phosphatases BcPtpA and BcPtpB in Regulation of Vegetative Development, Virulence and Multi-Stress Tolerance in *Botrytis cinerea*. *PLOS ONE*, 8(4), e61307.
- Yatzkan, E., Szöör, B., Fehér, Z., Dombrádi, V., Yarden, O. (1998). Protein phosphatase 2A is involved in hyphal growth of *Neurospora crassa*. *Molecular & General Genetics*, 259(5), 523-31.
- Yoshimi, A., Kojima, K., Takano, Y., Tanaka, C. (2005). Group III histidine kinase is a positive regulator of Hog1-type mitogen-activated protein kinase in filamentous fungi. *Eukaryotic cell*, 4(11), 1820-8.
- Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S., Ota, I. (2002). Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryotic cell*, 1(6), 1032-40.
- Zalatan, J., Coyle, S., Rajan, S., Sidhu, S., Lim, W. (2012). Conformational control of the Ste5 scaffold protein insulates against MAP kinase misactivation. *Science*, 337(6099), 1218-22.
- Zellerhoff, N., Jarosch, B., Groenewald, J., Crous, P., Schaffrath, U. (2006). Nonhost Resistance of Barley Is Successfully Manifested Against *Magnaporthe grisea* and a Closely Related *Pennisetum* -Infecting Lineage but Is Overcome by *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(9), 1014-1022.
- Zhang, Y., Lamm, R., Pilonel, C., Lam, S., Xu, J.-R. (2002). Osmoregulation and fungicide resistance: the *Neurospora crassa* os-2 gene encodes a HOG1 mitogen-activated protein kinase homologue. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 532-8.
- Zhao, X., Mehrabi, R., Xu, J.-R. (2007). Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic cell*, 6(10), 1701-14.
- Zhu, Y., Inouye, M. (2003). Analysis of the role of the EnvZ linker region in signal transduction using a chimeric Tar/EnvZ receptor protein, Tez1. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22812-9.

7 Anhang

7.1 Abbildungen

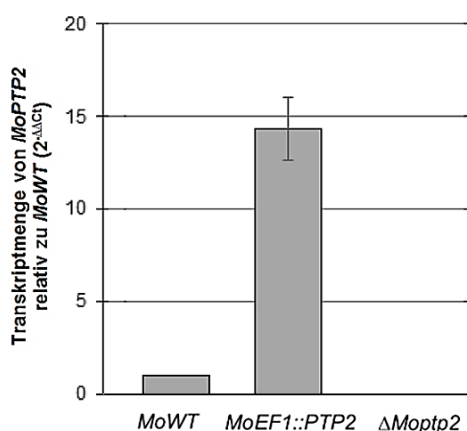


Abb. 22: Überexpression von MoPTP2 in MoEF1::PTP2. Dargestellt sind die relativen Transkriptmengen von MoPTP2 in MoWT, MoEF1::PTP2 und $\Delta Moptp2$ bezogen auf die Transkriptmenge von MoPTP2 in MoWT (= 1) bei nicht induziertem Wachstum der Stämme in CM. Zur Normalisierung wurde jeweils das Transkript des konstitutiv aktiven Gens β -Tubulin verwendet. Die Standardabweichungen resultieren aus 3 technischen Replikaten.

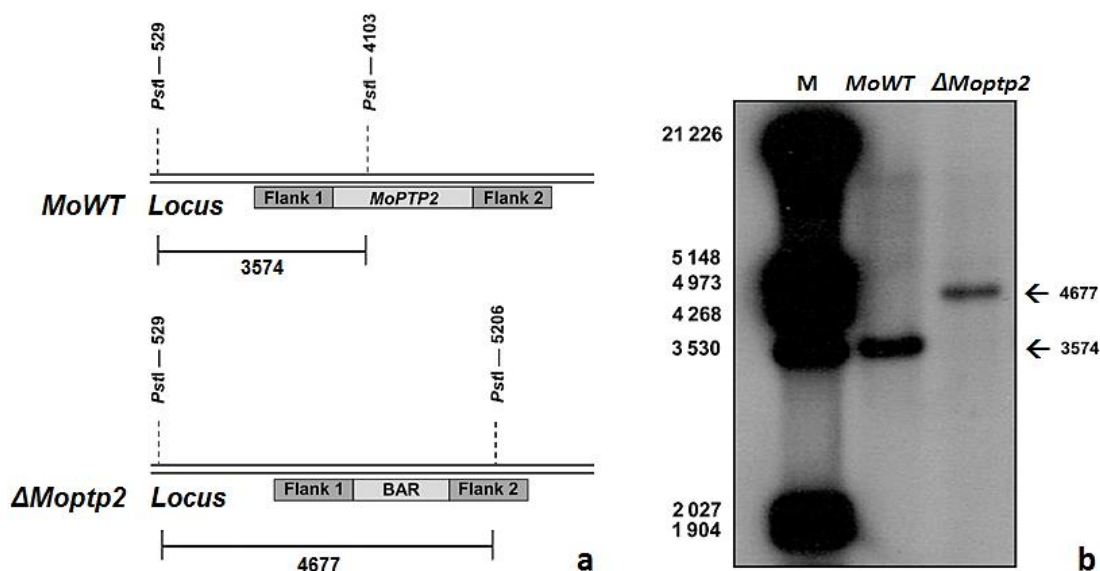


Abb. 23: Nachweis der genetischen Inaktivierung von MoPTP2 in $\Delta Moptp2$. Dargestellt sind Schemata des Genlocus von MoPTP2 im Genom von MoWT und $\Delta Moptp2$ (a), sowie der Nachweis der Inaktivierung mittels Southern Blot Analyse (b). Die DNA-Sonde wurde mittels des Primerpaars 00912_DIG_for/-rev amplifiziert und hybridisiert im Bereich von Flank 1. Flank 1 ist der Bereich genomischer DNA 1000 bp upstream des Startcodons von MoPTP2, Flank 2 ist der Bereich genomischer DNA 1000 bp downstream des Stopcodons von MoPTP2. Nukleotidsequenzlängen sind in bp angegeben.

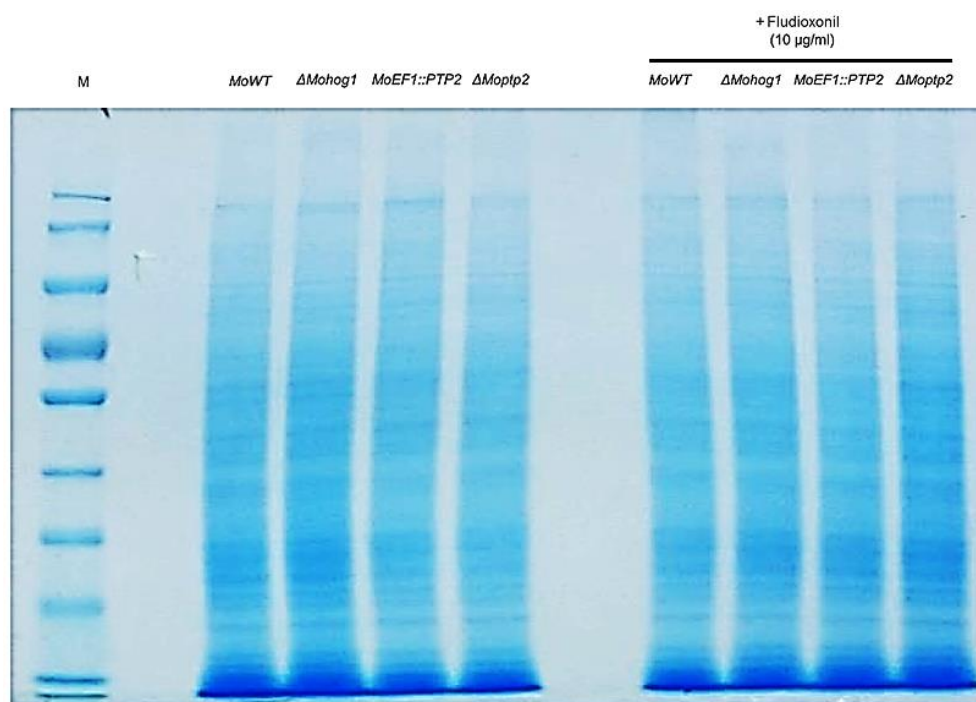


Abb. 24: SDS-PAGE-chromatographische Auftrennung der Proteinextrakte aus *MoWT*, *ΔMohog1*, *MoEF1::PTP2* und *ΔMoptp2* jeweils vor und während Fludioxonil-Stress – Ladekontrolle zur Western Blot-Analyse (Abb. 7). Es wurden für jede Probe gleiche Proteinextraktmengen verwendet. M = PageRuler Prestained Protein Marker.

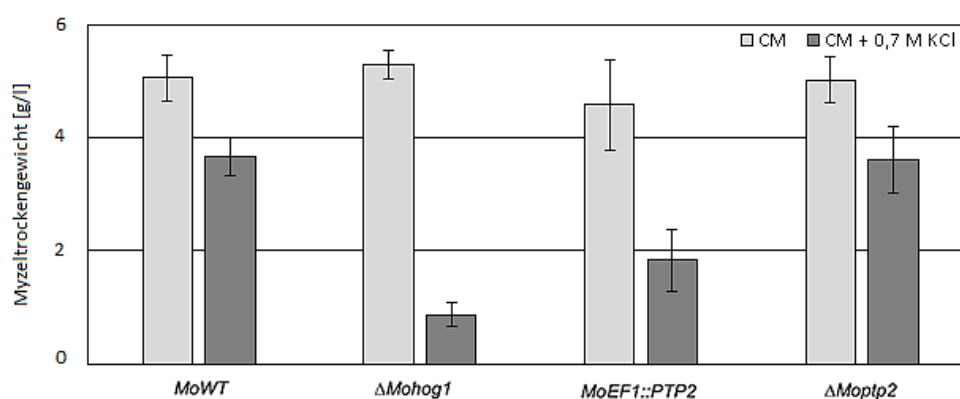


Abb. 25: Myzel-Trockengewichte von *MoWT*, der Überexpressionsmutante *MoEF1::PTP2* und den lof-Mutanten *ΔMohog1* und *ΔMoptp2* nach Kultivierung in CM bzw. nach Kultivierung in CM mit KCl. Die Pilzkulturen wurden in flüssigem CM (hellgrau) bzw. in flüssigem CM inklusive 0,7 M KCl (dunkelgrau) für 4 Tage mit 100 Upm bei 26 °C inkubiert. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von jeweils drei biologischen Replikaten an.

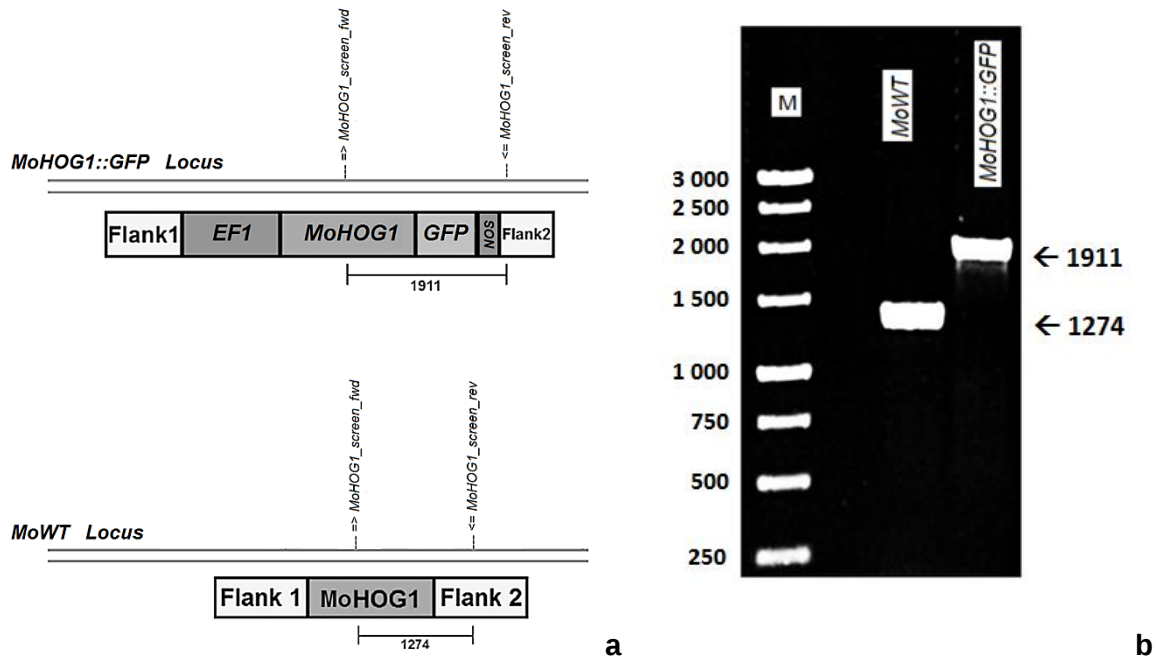


Abb. 26: Nachweis der Abwesenheit der nativen *MoHOG1*-Gensequenz im Genom von *MoHOG1::GFP*.

(a) Dargestellt sind Schemata der Gensequenzen von *MoHOG1* bzw. *MoHOG1-GFP* im Genom von *MoWT* bzw. von *MoHOG1::GFP*, sowie die jeweiligen Binstellen für die Primer des Primerpaars *MoHOG1_screen_forl-rev*

(b) Nachweis mittels PCR (von Herrn Hendrik Neumann durchgeführt). Das Fusionskonstrukt *MoHOG1-GFP* ist nicht im Genom von *MoWT* vorhanden, jedoch die native Sequenz von *MoHOG1* ohne Fusion mit *GFP* (Länge des Amplifikats mit dem Primerpaar *MoHOG1_screen_forl-rev*: 1274 bp). Im Genom von *MoHOG1::GFP* ist *MoHOG1* mit *GFP* fusioniert (Länge des Amplifikats mit dem Primerpaar *MoHOG1_screen_forl-rev*: 1911 bp), die native Sequenz von *MoHOG1* ohne Fusion mit *GFP* ist nicht im Genom von *MoHOG1::GFP* vorhanden. Nukleotidsequenzlängen sind in bp angegeben. Flank 1 ist der Bereich genomischer DNA 1000 bp vor dem Startcodon von *MoHOG1*, Flank 2 ist der Bereich genomischer DNA 1000 bp hinter dem Stopcodon von *MoHOG1*. Nukleotidsequenzlängen sind in bp angegeben.

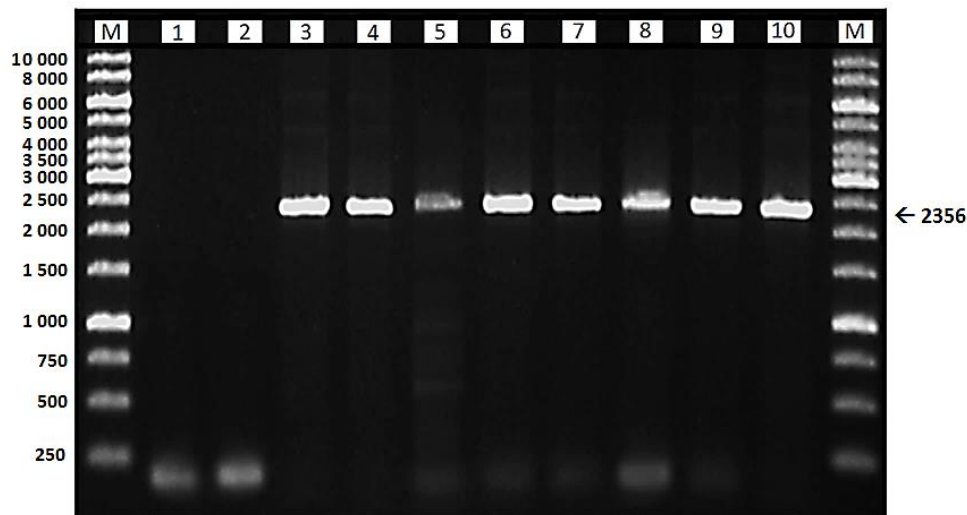


Abb. 27: Nachweis der Genom-Integration des Fusionskonstrukts *MoHOG1-GFP* mittels PCR. Die erwartete Größe der jeweiligen Amplifikate unter Verwendung des Primerpaars *MoHOG1-for(b)/eGFP-rev* beträgt 2356 bp. Nukleotidsequenzlängen sind in bp angegeben. In Proben der Stämme *MoHOG1::GFP* (3), *ΔMopbs2/MoHOG1::GFP* (4), *ΔMossk2/MoHOG1::GFP* (5), *ΔMossk1/MoHOG1::GFP* (6), *ΔMoypd1/MoHOG1::GFP* (7), *ΔMohik1/MoHOG1::GFP* (8), *ΔMosln1/MoHOG1::GFP* (9), *ΔMohik1/ΔMosln1/MoHOG1::GFP* (10) ist ein Signal auf erwarteter Höhe zu erkennen; nicht hingegen in Proben der Stämme *MoWT* (1), *MoEF1::GFP* (2), welche nicht mit dem Fusionskonstrukts *MoHOG1-GFP* transformiert wurden. Nukleotidsequenzlängen sind in bp angegeben.

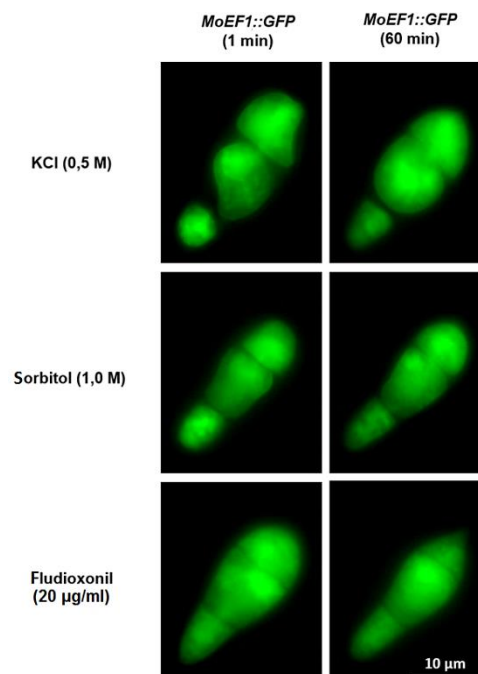


Abb. 28: Gleichmäßige Verteilung des GFP-Signals in *MoEF1::GFP* bei hyperosmotischem Stress bzw. Fludioxonil-Stress. Im Stamm *MoEF1::GFP*, welcher das Fluoreszenzprotein GFP (ohne Fusion mit MoHog1p) mit dem konstitutiv aktiven Promotor *EF1* exprimiert, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p bestimmt. Konidien wurden mit 0,5 M KCl, 1 M Sorbitol oder mit 20 µg/ml Fludioxonil behandelt und nach 1 min und nach 60 min fotografiert.

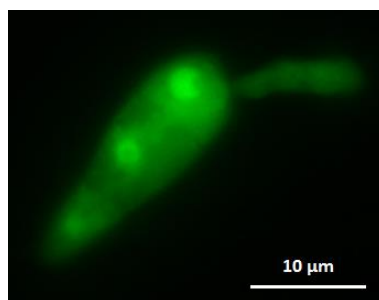


Abb. 29: Zellkerntranslokation von MoHog1p während der Konidienkeimung. Im Stamm *MoHOG1::GFP*, welcher das Fusionsprotein MoHog1p-GFP exprimiert, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Lokalisation der MAPK MoHog1p bestimmt. Die Keimung der Konidien erfolgte in H₂O. Die fotografische Aufnahme erfolgte nach 4 h.

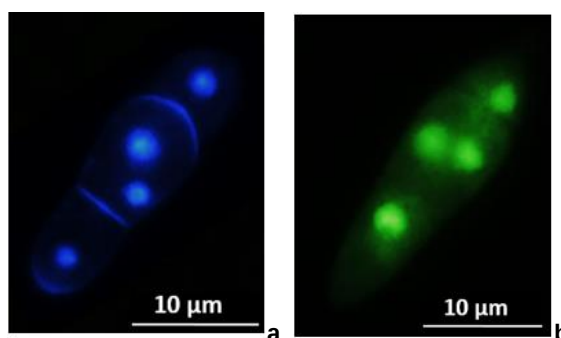


Abb. 30: Multinukleäre Zellen in Konidien von Δ *Mohik1*/ Δ *Mosln1*/*MoHOG1::GFP*. Ungestresste Konidie nach Applikation von Hoechst 33258 („DAPI“-Filterset, 2.3.6) **(a)**. Mit 0,25 M KCl induzierte Konidie („GFP“-Filterset, 2.3.6) **(b)**. Mit verlängerter Dauer der Kultivierung von Δ *Mohik1*/ Δ *Mosln1*/*MoHOG1::GFP* auf CM Agarplatten vor der Gewinnung von Konidien stieg der Anteil an dreizelligen Konidien mit insgesamt mindestens 4 Zellkernen. Es konnten vereinzelt Konidien mit bis zu 4 Zellkernen in einer einzigen Zelle beobachtet werden. Nach 15 Tagen Kultivierung waren bei ca. 50 % der Konidien mindestens 4 Zellkerne pro dreizelliger Konidie nachzuweisen.

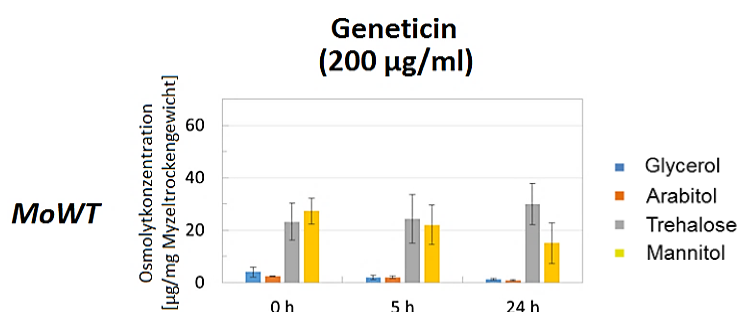


Abb. 31: Intrazelluläre Konzentrationen von Glycerol, Arabinol, Mannitol und Trehalose in *MoWT* nach Applikation von 200 µg/ml Geneticin. Angegeben sind die gemessenen Carbohydramengen bezogen auf Myzeltrockengewicht jeweils 0 h (= vor Applikation), 5 h nach und 24 h nach Applikation des Antibiotikums. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

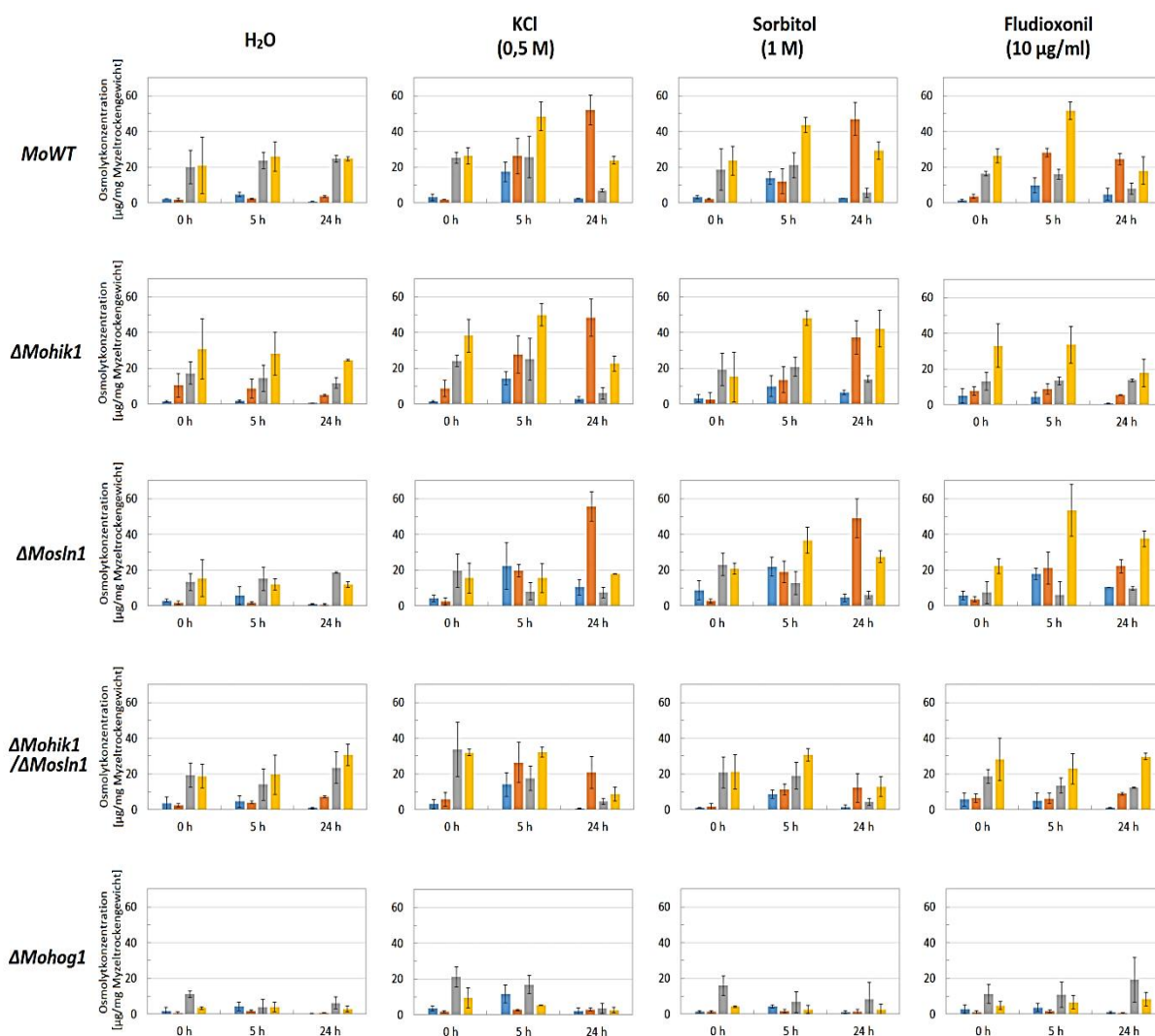


Abb. 32: Übersicht über die intrazellulären Konzentrationen von Glycerol, Arabitol, Mannitol und Trehalose in *MoWT*, *ΔMohik1*, *ΔMosIn1*, *ΔMohik1/ΔMosIn1* und *ΔMohog1* vor und nach Induktion mit hyperosmotischem KCl- bzw. Sorbitol-Stress, Fludioxonil oder H₂O als Kontrolle. Angegeben sind die gemessenen Carbohydratmengen bezogen auf Myzelltrockengewicht jeweils 0 h (= vor Applikation), 5 h nach und 24 h nach Stimulusapplikation. Glycerol blau, Arabitol orange, Trehalose grau, Mannitol gelb. Fehlerbalken geben die Standardabweichung von 3 unabhängigen biologischen Replikaten an.

7.1 Tabellen

Tab. 3: Hog1p-interagierende Proteinphosphatasen in *Saccharomyces cerevisiae* und deren Homologe in *Magnaporthe oryzae*. Aufgeführt sind die jeweiligen Proteinnamen (sowie Gennummern bei *M. oryzae*), und die bei den Homologievergleichen ermittelten E-values (BLASTp, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, Stand 2016). Für die Phosphatasen Ptc2p, Ptc3p und Ptc4p konnte insgesamt nur ein homologes Gen in *M. oryzae* identifiziert werden.

Hog1p dephosphorylierende Phosphatase in <i>S. cerevisiae</i>	Homolog in <i>M. oryzae</i>	Homologie (E-value)
Ptp2p	MoPtp2p (MGG_00912)	$1e^{-08}$
Ptp3p	MoPtp3p (MGG_01376)	$7e^{-28}$
Ptc1p	MoPtc1p (MGG_05207)	$1e^{-85}$
Ptc2p; Ptc3p; Ptc4p	MoPtc2p (MGG_01351)	$3e^{-97}$; $1e^{-100}$; $5e^{-53}$

Bei nur ca. 50 % der Konidien der Mutante $\Delta\text{Mohik1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ und bei weniger als 0,1 % der Konidien der Mutante $\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ konnte ein GFP-Fluoreszenzsignal festgestellt werden. Je länger die Dauer der Kultivierung dieser beiden Stämme auf CM nach der Transformation der entsprechenden lof-Ausgangsstämme mit dem Expressions-Konstrukt $\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ war, desto geringer war der Anteil an Konidien mit detektierbarem GFP-Fluoreszenzsignal, bis nach ca. 2–4 Wochen keine Konidien mit GFP-Fluoreszenzsignal mehr zu finden waren. Aus Gründen der stark reduzierten Sporulationsrate von $\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$, korrelierend mit der bereits beschriebenen stark reduzierten Sporulationsrate des lof-Ausgangsstammes ΔMosln1 im Vergleich zu MoWT (Jacob *et al.*, 2014), und der äußerst geringen Anzahl an Konidien mit detektierbarem GFP-Fluoreszenzsignal, wurde eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von Konidien des Mutantenstammes $\Delta\text{Mosln1}/\text{MoHOG1}::\text{GFP}$ nur nach KCl-, Sorbitol- und Fludioxonil-Behandlung durchgeführt (Tab 4):

Tab. 4: Zellkerntranslokation von MoHog1p-GFP nach Stressapplikation. Angegeben sind die Mindestkonzentrationen bzw. -Intensitäten von Stimuli, die in Konidien des Referenzstamms *MoHOG1::GFP* mit intaktem HOG-Signalweg und in Konidien von lof-Mutanten mit inaktivierten Komponenten des HOG-Signalwegs zu einer Translokation von MoHog1p-GFP in den Zellkern führte. Bei einer verzögerten Translokation von MoHog1-GFP in den Zellkern ist die Dauer der Verzögerung in Klammern angegeben. „n.t.“ = nicht getestet, „*“ = geringere Konzentration nicht getestet, „**“ = geringere Zeitabstände nicht getestet, „-“ = keine Zellkerntranslokation von MoHog1p-GFP, „Fluoreszenz“ = Bestrahlung unter Verwendung der Filter-Sets „GFP“, „CFP“, „DAPI“ und der höchsten Einstellung der Fluoreszenzlampe HXP 120 C (2.3.6). Für *ΔMosIn1/MoHOG1::GFP* wurden aufgrund der sehr geringen Anzahl an Konidien mit detektierbarem Fluoreszenzsignal nicht alle Bedingungen getestet. Bei *ΔMoypd1/MoHOG1::GFP* wurde Myzel untersucht (keine Konidiogenese), hierbei wurden nicht alle Bedingungen getestet.

	Fludioxonil	KCl	Sorbitol	NaNO ₂	CoCl ₂	NaCl/ NaNO ₃	Ethanol/ DMSO	Acetonitril	Fluo- reszenz	pH 2	40°C	Keimung in H ₂ O
<i>MoHOG1::GFP</i> (funktionaler HOG-Signalweg)	10 nM	0,2 M	0,4 M	0,05 M (4–5 min)	1 mM (4–5 min)	0,2 M	0,5 % (v/v)	0,1 % (v/v)	2 min	5 min **	1 min **	ca. 3–5 h
<i>ΔMosIn1/MoHOG1::GFP</i>	4 μM*	0,25 M*	0,5 M*	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>ΔMohik1/ΔMosIn1 /MoHOG1::GFP</i>	-	0,2 M	0,4 M	0,1 M (6–7 min)	2 mM (6–7 min)	0,2 M	0,5 % (v/v)	0,1 % (v/v)	2 min	5 min **	1 min **	ca. 3–5 h
<i>ΔMohik1/MoHOG1::GFP</i>	-	0,2 M	0,4 M	0,1 M (6–7 min)	2 mM (6–7 min)	0,2 M	0,5 % (v/v)	0,1 % (v/v)	2 min	5 min **	1 min **	ca. 3–5 h
<i>ΔMoypd1/MoHOG1::GFP</i> (Myzel)	-	-	-	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>ΔMossk1/MoHOG1::GFP</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ΔMossk2/MoHOG1::GFP</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ΔMopbs2/MoHOG1::GFP</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-