

**Heterochromatisches Gensilencing und
die Kontrolle der Pathogenität von
*C. graminicola***

Dissertation

**zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

Naturwissenschaftliche Fakultät I

Institut für Biologie

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Dipl.-Biol. Wiebke Kummer

Geb. am 26.07.1985 in Leipzig

Gutachter:

1. Herr Prof. Dr. Gunter Reuter
2. Herr Prof. Dr. Holger B. Deising
3. Frau Prof. Dr. Bettina Tudzynski

Verteidigt am: 12.06.2018

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	1
II Abbildungsverzeichnis	5
III Tabellenverzeichnis	7
IV Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1. Die Gattung <i>Colletotrichum</i>	11
1.2. Bedeutung und Biologie von <i>Colletotrichum graminicola</i>	13
1.3. Die Organisation des Chromatin	15
1.4. Epigenetische Regulationsmechanismen in verschiedenen Organismen	17
1.4.1. Histonmodifikationen	18
1.4.2. DNA-Methylierung.....	21
1.5. Heterochromatin Protein 1	22
2. Ziele der Arbeit	26
3. Material und Methoden	27
3.1. Biologische Material	27
3.1.1. <i>Colletotrichum graminicola</i>	27
3.1.2. Weitere Ascomyceten	27
3.1.3. <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.4. <i>Zea mays</i>	28
3.1.5. <i>Allium cepa</i>	28
3.2. Chemikalien	28
3.3. Bioinformatik	28
3.4. Medien, Lösungen und Puffer	29
3.4.1. Medien	29
3.4.2. Lösungen	30
3.4.3. Puffer	31
3.5. Vektoren	32
3.6. Antikörper	32
3.7. Präparation von Nukleinsäuren und Proteinen	32
3.7.1. Präparation genomischer DNA aus <i>Colletotrichum graminicola</i>	32

3.7.2.	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
3.7.3.	Präparation von RNA aus <i>Colletotrichum graminicola</i>	33
3.7.4.	Präparation von Histonen aus <i>Colletotrichum graminicola</i>	33
3.8.	Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	34
3.8.1.	Standard PCR.....	34
3.8.2.	Kolonie PCR	34
3.8.3.	Double Joint PCR	35
3.8.4.	qPCR	36
3.8.5.	DNA-Fällung	37
3.9.	Gelelektrophorese	37
3.10.	Untersuchung der Reversen Transkription.....	37
3.10.1.	cDNA-Synthese	37
3.10.2.	Semiquantitative RT-PCR.....	38
3.11.	Sequenzierung.....	38
3.12.	Klonierung.....	38
3.12.1.	Erzeugung zu klonierender DNA	38
3.12.2.	Ligation	39
3.12.3.	Transformation in <i>E.coli</i>	39
3.12.4.	Klonierung mittels „Quick Change II XL Site Directed Mutagenesis Kit“	39
3.13.	Massenspektrometrie.....	40
3.13.1.	DNA-Massenspektrometrie.....	40
3.13.2.	Histon-Massenspektrometrie	40
3.14.	Transformation in <i>Colletotrichum graminicola</i>.....	41
3.14.1.	Sporengewinnung.....	41
3.14.2.	Protoplastierung.....	41
3.14.3.	Transformation.....	41
3.15.	Southern Blot.....	42
3.15.1.	Restriktionsverdau und Gelelektrophorese	42
3.15.2.	Kapillartransfer.....	42
3.15.3.	Herstellung und Markierung radioaktiv markierter Sonde	43
3.15.4.	Hybridisierung.....	43
3.16.	Western Blot	44
3.17.	Immunozytologische Färbungen	45

3.17.1.	Antikörperfärbung von Histonmodifikationen	45
3.17.2.	5-Methylcytosin-Färbung	46
3.18.	Infektionsstudien und Mikroskopie	46
3.18.1.	Einstellung der Konidienkonzentration.....	46
3.18.2.	Blattsegmentassay	46
3.18.3.	Zwiebelinfektionen	47
3.18.4.	Anfärben und Auszählen von Infektionsstrukturen.....	47
3.18.5.	Lichtmikroskopie von infiziertem Blattmaterial (Semi-Dünnschnitte).....	47
4.	Ergebnisse.....	49
4.1.	Chromatinorganisation in Interphasekernen von <i>Colletotrichum</i>	49
	<i>graminicola</i>.....	49
4.2.	Epigenetische Faktoren für den Aufbau von Heterochromatin in	53
	<i>C. graminicola</i>.....	53
4.2.1.	Die CgDIM5 Histonmethyltransferase kontrolliert H3K9me3 bei	54
	<i>C. graminicola</i>	54
4.2.2.	Die DNA-Methylierung wird bei <i>C. graminicola</i> primär durch CgDIM2-1 kontrolliert	56
4.2.3.	Die Histonmethyltransferase CgE(Z) katalysiert die H3K27 Methylierung bei	57
	<i>C. graminicola</i>	57
4.2.4.	Das Heterochromatin Protein 1 ist essentiell für die Etablierung von	59
	DNA-Methylierung.....	59
4.2.5.	CgDIM7 – ein epigenetischer Faktor, der DIM5-abhängiges H3K9me3 kontrolliert	61
4.2.6.	Einfluss der Mutanten für epigenetische Kontrollfaktoren auf die	62
	Pathogenität.....	62
4.3.	Pathogenitätsdefekte der $\Delta hp1$ Mutante.....	64
4.4.	Komplementationsanalysen der Deletionsmutante $\Delta hp1$.....	66
4.5.	Das HP1-GFP Fusionskonstrukt ist in heterochromatischen Chromozentren lokalisiert.....	67
4.6.	Genetische Analyse des HP1 Proteins von <i>C. graminicola</i>	70
4.6.1.	Die Chromo Domäne ist essentiell für die Chromozentrenassoziation des HP1 Proteins.....	72
4.6.2.	Mutationen der Chromo und Chromo Shadow Domäne beeinflussen die DNA-Methylierung	73
4.6.3.	Die Chromo Shadow Domäne von HP1 ist essentiell für die Virulenz von.....	73
	<i>C. graminicola</i>	73

4.6.4.	HP1-GFP Mutanten beeinflussen das Wachstum von <i>C. graminicola</i> nicht.....	75
4.7.	Infektionsstudien auf verschiedenen Maiskultivaren, B73 und den Inzucht-Linien.....	76
5.	Diskussion.....	81
5.1.	<i>Colletotrichum graminicola</i> als Modellorganismus für epigenetische Analysen	81
5.2.	Heterochromatinbildung bei <i>Colletotrichum graminicola</i>	84
5.3.	Einfluss der Deletionsmutanten epigenetischer Faktoren auf die Entwicklung und Pathogenität von <i>C. graminicola</i>	91
5.4.	H3K27 Methylierung und Gensilencing bei <i>C. graminicola</i>	94
5.5.	Der Einfluss pflanzlicher Suszeptibilität auf die Virulenz von..... <i>C. graminicola</i>	97
6.	Zusammenfassung	99
7.	Literatur	100
8.	Anhang.....	112
8.1.	Chromatinorganisation der analysierten Ascomyceten	112
8.2.	Alignments der epigenetischen Faktoren	113
8.3.	Sequenzen der HP1-GFP Mutanten nach Mutagenese.....	118
8.4.	Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta hp1$	119
8.5.	H3K9me3 Western Blots der HP1-GFP Mutanten	119
8.6.	Quantifizierung der Infektionsstrukturen der Chromo Shadow Mutanten ...	120
8.7.	Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta CSD+\Delta C$ -Ter	121
8.8.	Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta dim7$	122
8.9.	Quantifizierung der Infektionsstrukturen auf Golden Jubilee und B73	123
8.10.	Southern Blots der generierten Mutanten	124
8.11.	Liste aller verwendeter Pilzlinien	128
8.12.	Liste aller verwendete Antikörper	128
8.13.	Liste aller verwendeter Primer	129
8.14.	Eidesstattliche Erklärung.....	131
8.15.	Danksagung.....	132
8.16.	Lebenslauf.....	133
8.17.	Publikationen.....	134

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau des aufwärtsgerichteten Southern Blots.....	43
Abbildung 2: Interphasechromatin in verschiedenen Organismen.....	49
Abbildung 3: Organisation von Heterochromatin in Interphasekernen verschiedener Ascomyceten.....	50
Abbildung 4: Immunozytologische Analyse verschiedener Histonmodifikationen in Interphasekernen von <i>C. graminicola</i>	51
Abbildung 5: Verteilung von Heterochromatin und H3K9me3 Methylierung in Interphasekernen von <i>C. graminicola</i> und verschiedenen Pilzen.....	52
Abbildung 6: CgDIM5 kontrolliert die H3K9 Trimethylierung im Heterochromatin	55
Abbildung 7: Kontrolle heterochromatischer DNA-Methylierung durch CgDIM2-1.....	57
Abbildung 8: CgE(Z) reguliert die komplette H3K27 Methylierung in <i>C. graminicola</i>	58
Abbildung 9: Das Heterochromatin Protein 1 ist für die DNA-Methylierung essentiell.....	60
Abbildung 10: CgDIM7 beeinflusst die H3K9 Trimethylierung durch CgDIM5.....	62
Abbildung 11: Pathogenitätsassay der Deletionsmutanten epigenetischer Kontrollfaktoren.....	63
Abbildung 12: Infektion von $\Delta hp1$ auf verwundeten Maisblättern	64
Abbildung 13: Pathogenitätsdefekte von $\Delta hp1$ Mutanten.....	65
Abbildung 14: Komplementation der Deletionsmutante $\Delta hp1$	67
Abbildung 15: HP1-GFP ist mit den heterochromatischen Chromozentren assoziiert.....	69
Abbildung 16: Genetische Analyse des HP1 Proteins von <i>C. graminicola</i>	71
Abbildung 17: HP1-GFP Lokalisation in den Chromo Shadow Domänen Mutanten.....	72
Abbildung 18: Die Chromo Shadow Domäne ist für die signifikant reduzierte Virulenz von <i>C. graminicola</i> bedeutend.....	75
Abbildung 19: Mutationen des HP1 Proteins beeinflussen das Wachstum von <i>C. graminicola</i> nicht.....	76
Abbildung 20: Infektionsstudien auf dem Maiskultivar Golden Jubilee, der Linie B73 und Mikado.....	77
Abbildung 21: Infektionsstudien auf verschiedenen Inzucht-Linien.....	80
Abbildung 22: Chromatinverteilung und H3K9me3 Färbungen der analysierten Pilze.....	112
Abbildung 23: Sequenzalignement von CgDIM5 mit anderen Organismen	113
Abbildung 24: Sequenzalignement von CgDIM2-1 mit anderen Organismen.....	114
Abbildung 25: Sequenzalignement von CgDIM2-2 mit anderen Organismen.....	115

Abbildung 26: Sequenzalignement von CgHP1 mit anderen Organismen	115
Abbildung 27: Sequenzalignement von CgE(Z) mit anderen Organismen.....	116
Abbildung 28: Sequenzalignement von CgDIM7 mit anderen Organismen.....	117
Abbildung 29: Sequenznachweis der erfolgreichen Mutagenese für die einzelnen HP1-GFP Mutanten.....	118
Abbildung 30: Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta hp1$	119
Abbildung 31: H3K9me3 Western Blots der HP1-GFP Mutanten.....	119
Abbildung 32: Quantifizierung der Infektionsstrukturen der Chromo Shadow Mutanten.....	120
Abbildung 33: Quantifizierung der Infektionsstrukturen der $\Delta CSD+\Delta C$ -Ter Mutante	121
Abbildung 34: Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta dim7$	122
Abbildung 35: Quantifizierung der Infektionsstrukturen verschiedener Maiskultivare.....	123
Abbildung 36: Southern Blot Komplementation von $\Delta dim7$	124
Abbildung 37: Southern Blot Komplementation von $\Delta hp1$	124
Abbildung 38: Southern Blot des HP1-GFP Fusionskonstrukt	124
Abbildung 39: Southern Blot der HP1-GFP Chromo Domänen Mutanten	125
Abbildung 40: Southern Blot der HP1-GFP Chromo Shadow Domänen Mutanten.....	126
Abbildung 41: Southern Blot der HP1-GFP Deletionsmutanten weiterer Domänen.....	127

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lösungen	30
Tabelle 2: Puffer	31
Tabelle 3: Standard PCR mit Taq-Polymerase	34
Tabelle 4: Kolonie PCR mit Taq-Polymerase	35
Tabelle 5: Amplifikation des Selektionsmarker und der Flanken	36
Tabelle 6: DJ-PCR.....	36
Tabelle 7: Sequenzieranalyse	38
Tabelle 8: PCR-Reaktion des „Quick Change II XL Site Directed Mutagenesis Kit“	40
Tabelle 9: Pipettierschema des Restriktionsverdau	42
Tabelle 10: Pipettierschema für ein 15%iges SDS-Proteingel	44
Tabelle 11: Epigenetische Kontrollfaktoren für den Aufbau von Heterochromatin bei <i>C. graminicola</i>	53
Tabelle 12: Verwendete Inzucht-Linien.....	78
Tabelle 13: Verwendete Pilzlinien.....	128
Tabelle 14: Verwendete Antikörper	128
Tabelle 15: Verwendete Primer	129

IV Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATh	AT-Hook
AUR	Aurofusarin
AWS	<i>Associated with SET</i>
BAH	<i>Bromo-Adjacent Homology</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
CAF-1	<i>Chromatin Assembly Factor-1</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CD	Chromo Domäne
cDNA	complementary DNA
C.g.	<i>Colletotrichum graminicola</i>
CM	Complete Medium
CMT3	CHROMOMETHYLASE 3
CSD	Chromo Shadow Domäne
C-terminal	carboxy-terminal
CUL4	Cullin 4
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DDB1	<i>DNA-Damage-Binding Protein</i>
DIG	Digoxygenin
DIM	<i>Defective in methylation</i>
DMAP1	<i>DNMT1 Associated Protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMT1-RFD	<i>Cytosine Specific DNA Methyltransferase Replication Foci Domain</i>
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
DON	Deoxynivalenol
dpi	<i>days post infection</i>
E	Glutaminsäure
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED	<i>Embryonic Ectoderm Development</i>
ESC	<i>Extra Sex Comb</i>
et al.	lat. et alii, et aliae
E(Z)	<i>Enhancer-of-Zeste</i>
F	Phenylalanin
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid

g	Gramm
g	Gravitationskonstante
G418	Geneticin
GNAT	<i>Gcn5-related N-acetyltransferases</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLRG	<i>Glomerella graminicola</i>
GO	<i>Gene Ontology</i>
h	Stunde
H₂O	Wasser
H1	Histonprotein 1
H2A	Histonprotein 2
H2B	Histonprotein 2
H3	Histonprotein 3
H4	Histonprotein 4
HDAC	Histon-Deacetylase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HKMT	Histon-Lysin-Methyltransferase
HP1	Heterochromatin Protein 1
HRP	<i>Horseradish Peroxidase Conjugate</i>
<i>hph</i>	Hygromycin-Phosphotransferase
kb	Kilobasen
KMTase	Lysin-Methyltransferase
KO	<i>Knockout</i>
l	Liter
L	Leucin
LB	Luria Bertani
LSD1	Lysin-spezifische Histon-Demethylase
M	Methionin
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mb	Megabasenpaar
merge	fusioniert
min	Minute
MIP	<i>Methylation Induced Premeiotically</i>
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
mRNA	messenger RNA
MYST	MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, Tip60
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAM	<i>Nested Association Mapping</i>
N-Terminal	amino-terminal
ng	Nanogramm
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OMA	<i>Oat Meal Agar</i>
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PEG	Polyethylenglycol

PEV	<i>Positions-Effekt-Variation</i>
PRC	<i>Polycomb Repressive Complex</i>
pH	lat. potentia hydrogenii
QDR	<i>Quantitative Disease Resistance</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Locus</i>
RID	<i>RIP Defective</i>
RIP	<i>Repeat Induced Point Mutation</i>
RIZ	<i>Retinoblastoma protein-Interacting zinc finger</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Rpd3	<i>reduced potassium dependency 3</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RRM	RNA-Erkennungsequenz
RT	Reverse Transkriptase
s / sec	Sekunde
SAM	S-Adenosyl Methionin
SANT	Swi3/ Ada2/ N-Cor/ TFIIB
SDS	Natriumdodecylsulfat
SET	Su(var)3-9/ Enhancer-of-Zeste / Trithorax
Sir2	<i>Silent Information Regulator -2</i>
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer
STC	Sorbitol/Tris/Calciumchlorid
SU(VAR)	<i>Suppressor of Variegation</i>
SUVH	SU(VAR)3-9 Homolog
Suz12	<i>Supressor- of-Zeste 12</i>
SWIRM	SWI3, RSC8 and MOIRA
T_A	Annealing- Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween20</i>
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIF	<i>Transcriptional Intermediary Factor 1</i>
TIG1	<i>Transducin β-like gene</i>
Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Valin
V	Volt
W	Tryptophan
WC-1	<i>White Collar-1</i>
WT	Wildtyp
WW	Tryptophan Tryptophan
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro-
°C	Grad Celsius

1. Einleitung

1.1. Die Gattung *Colletotrichum*

Die Gattung *Colletotrichum* gehört zur Gruppe der Ascomyceten (Unterabteilung Pezizomycotina, Klasse Sordariomycetes) und umfasst mehr als 100 verschiedene Spezies, welche alle Erreger von Anthraknosen, Blatt- und Knollenfäule oder Wurzelerkrankungen an unterschiedlichen Nutz- und Futterpflanzen sind (Dean et al. 2014). Aufgrund seiner ökonomischen Bedeutung wird diese Gattung als eine der 10 wichtigsten pilzlichen Pathogenen eingestuft (Dean et al. 2012). *Colletotrichum*-Spezies befallen ein breites Spektrum an unterschiedlichen Nutzpflanzen, wie Mais (*C. graminicola*), Bohnen (*C. lindemuthianum*), Kartoffeln (*C. coccode*), Erdbeeren und Bananen (*C. gleosporioides*) (Dean et al. 2014). Basierend auf molekularer Analysen können heute 9 verschiedene Aggregate phylogenetisch unterschieden werden: *acutatum*, *spaethianum*, *destructivum*, *demantium*, *gleosporioides*, *boninense*, *truncatum* und *orbiculare* (Cannon et al. 2012). Auch wenn diese *Colletotrichum*-Aggregate keinen formalen taxonomischen Rang tragen, ist es durch diese Bezeichnung möglich verschiedene Spezies in eine Gruppe einzuordnen. So besteht beispielsweise das *gleosporioides* Aggregate aus 22 Spezies, welche traditionell als *C. gleosporioides* bezeichnet werden. *Colletotrichum* ist eine asexuelle Gattung, mit einigen Ausnahmen, bei denen bekannt ist, dass sie eine telomorphe Fruchtförmigkeit ausbilden. Ein Beispiel dafür ist *Glomerella cingulata*, der Erreger von Bitterfäule an Quitte und Apfel (Dean et al. 2014; Brook 1977). Die Gattung *Colletotrichum* kann sowohl nekrotroph, hemibiotroph, saprophytisch aber auch als Endophyt die Wirtspflanze besiedeln und besitzt somit ein breites Spektrum an verschiedenen Lebensstilen. Um organische Stoffe und Nährstoffe dem Boden zu entziehen, haben einige Arten einen saprophytischen Lebensstil entwickelt (Dean et al. 2014). Viele Arten können, je nach Umweltbedingungen, auch verschiedene Lebensstrategien ausüben. *Colletotrichum*-Arten, welche einen nekrotrophen Lebensstil aufweisen, besiedeln kein lebendes Wirtsgewebe. Zunächst treten latente Infektionen mit einem unpenetrierten Appressorium auf, oder es wird subkutikuläres Myzel ausgebildet. Anschließend wechselt der Pilz in den pathogenen Lebensstil und besiedelt das Wirtsgewebe, während Symptome auf der Pflanze sichtbar werden. Nekrotrophe *Colletotrichum*-Spezies sind meist Verursacher von Fruchtfäulen, wie z. B. *Colletotrichum*-Arten aus dem Aggregat *C. acutatum* (Dean et al. 2014, Liao et al. 2012). Ein Großteil der

Colletotrichum-Gattung bevorzugt die intrazelluläre hemibiotrophe Lebensweise, in der zunächst symptomlose biotrophe Hyphen ausgebildet werden. Diese sind von einer Plasmamembran umgeben und trennen somit die Pilzzelle von der Pflanzenzelle. Mit Hilfe dieser primären Hyphen umgeht der Pilz die pflanzliche Abwehr und kann somit Nährstoffe aus dem Wirt beziehen, bevor die nekrotrophe Entwicklung beginnt und die Pflanze abgetötet wird. Es existieren drei verschiedene Modelle für die intrazelluläre Hemibiotrophie. Beim *C. destructivum*-Modell wird lediglich die erste epidermale Zelle mit biotrophen Hyphen besiedelt. Danach erfolgt sofort der Übergang in die nekrotrophe Phase und die Bildung von Sekundärhyphen sowie das Abtöten des Wirtes. Ein typisches Beispiel für dieses Modell ist *C. higginsianum*. Im Gegensatz zu dieser Infektionsstrategie werden beim *C. orbiculare*-Modell mehrere Zellen mit primären biotrophen Hyphen besiedelt, ehe der Übergang in die Nekrotrophie erfolgt. Dabei stirbt die erste infizierte Epidermalzelle ab, während die später infizierten Zellen am Leben bleiben und erst in der nekrotrophen Phase absterben. Das dritte Modell für intrazelluläre Hemibiotrophie wird als *C. graminicola*-Modell bezeichnet. Ähnlich dem *C. orbiculare*-Modell bilden sich primäre biotrophe Hyphen in mehreren Zellen aus, jedoch ist der Übergang in die nekrotrophe Phase verschieden. In diesem Modell gehen die schmalen sekundären Hyphen als Zweige aus den biotrophen Hyphen hervor und töten die besiedelten Zellen ab, jedoch werden neue Zellen weiterhin über biotrophe Hyphen erschlossen. Somit erfolgt eine biotrophe und nekrotrophe Lebensweise parallel an unterschiedlichen Orten der Pilzkolonie innerhalb des Wirts. Erste sichtbare Symptome treten kurz nach der Ausbildung der nekrotrophen Hyphen auf (Dean et al. 2014). Bisher wurden nur wenige *Colletotrichum*-Arten so detailliert untersucht. Deshalb bedarf es weiterer Studien, um Aufschluss darüber zu erhalten, ob diese Modelle auf alle *Colletotrichum*-Aggregate zutreffen, oder spezifisch für die beschriebenen Aggregate sind. Alle pflanzenassoziierten *Colletotrichum*-Spezies haben jedoch gemein, dass spezialisierte Infektionsstrukturen, wie das melanisierte Appressorium, für die Penetration der Wirtszelle benötigt werden (Kubo & Takano 2013).

1.2. Bedeutung und Biologie von *Colletotrichum graminicola*

Eine der bekanntesten Vertreter der *Colletotrichum*-Gattung ist *C. graminicola* (Cesati) G.W. Wils., der Erreger der Anthraknose Blattflecken und Stängelfäule an *Zea mays*. Die telomorphe Form ist *Glomerella graminicola* (Bergstrom & Nicholson 1999). Typische Symptome sind deutlich abgegrenzte gelbliche bis braune Flecken an den Blättern (*anthracnose leaf blight* (ALB)) und den Stängeln (*anthracnose stalk rot* (ASR)) von Maispflanzen. Begünstigt werden diese Symptome durch Insekten, wie dem Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*), welcher Verletzungen an den Pflanzenstängeln verursacht (Bergstrom & Nicholson 1999). Der Befall von Maispflanzen mit *C. graminicola* führte in den frühen 1970er Jahren in Nordamerika zu großen Verlusten in der Landwirtschaft. Aufgrund einer erhöhten Suszeptibilität der Maispflanzen und den optimalen Wetterbedingungen kam es zu einer vermehrten Verbreitung des Pathogens, was erhebliche Ernteauffälle zur Folge hatte. Im Laufe der Jahre konnte das Ausmaß der Verbreitung von *C. graminicola* durch den Anbau von resistenteren Maissorten reduziert werden (Mims & Vaillancourt 2002).

Weil Mais eines der am meisten angebauten Getreide in den USA ist, rückte das Pathogen in den Fokus der Wissenschaft, um Aufschluss über den Infektionsverlauf zu erhalten und somit weitere Epidemien zu verhindern. *C. graminicola* weist alle Vorteile eines Modellorganismus auf. Der Ascomycet besitzt eine kurze Generationsdauer und ist auf unterschiedlichen Nährmedien leicht zu kultivieren. *C. graminicola* ist in der Lage, *in vitro* große Mengen an asexuellen Sporen zu produzieren, die für Interaktionsstudien zwischen Pilz und Pflanze verwendet werden können. Des Weiteren existieren verschiedene Transformationstechniken, um den Pilz genetisch zu manipulieren (Flowers & Vaillancourt 2005; Epstein et al. 1998). Aufgrund seines haploiden Genoms ist es einfach, Einzelknockout-Mutanten zu generieren, um den Einfluss von Gendelektionen auf den Infektionsverlauf des Pilzes zu analysieren. Das Genom von *C. graminicola* ist nahezu komplett sequenziert und weist eine Größe von 57,4 Mb auf. Inklusive der 3 Minichromosomen ist es in 13 Chromosomen organisiert. Im Vergleich zu anderen *Colletotrichum*-Spezies besitzt *C. graminicola* mit ca. 12,2% mehr als 10 mal so viele repetitive Sequenzen (O'Connell et al. 2012; Gan et al. 2013).

Als fakultativer Saprophyt ist *C. graminicola* in der Lage, auf abgestorbenen Pflanzenresten zu überwintern und im Frühjahr das primäre Inokulum zu bilden. In den Acervuli, den

Sporenlagern, werden die asexuellen sichelförmigen Konidien produziert. Dabei sind die Konidien von einer wasserlöslichen extrazellulären Matrix umgeben, welche aus Polysacchariden und Glykoproteinen besteht und die Sporen vor dem Austrocknen schützt. Somit sind diese in der Lage, unter trockenen Bedingungen auch über einen längeren Zeitraum von mehreren Wochen bis zu Monaten zu überleben (Nicholson & Moraes 1980). Des Weiteren schützen prolinreiche Verbindungen die Konidien vor toxischen polyphenolischen Verbindungen, welche vom Wirt während der Infektion ausgesondert werden (Hagerman & Butler 1981). Ein weiterer Bestandteil der wasserlöslichen Matrix sind Mycosporinalanine, welche als Keimungsinhibitoren fungieren und somit nur ein Auskeimen der Konidien unter optimalen Bedingungen ermöglichen (Leite & Nicholson 1992). Die Verbreitung der Sporen im Frühjahr erfolgt durch Wind und Regenwasser. Aufgrund des Regenwassers wird die wasserlösliche extrazelluläre Matrix und somit auch die Konzentration der Mycosporinalanie verdünnt. Sinkt die Konzentration auf unter 0,5 mM, so ist der Keimungsinhibitor nicht länger effektiv und die Sporen können nach Anheften auf der Blattoberfläche auskeimen (Bergstrom & Nicholson 1999). Für die Etablierung der Konidien auf der Blattoberfläche sind weitere Komponenten der Konidienmatrix, wie die Enzyme Laccase und Cutinase, wichtig (Pascholati et al. 1993). 6 bis 8 h nach Anheften der Konidien an die hydrophobe Blattoberfläche der Maispflanzen beginnen die Konidien zu keimen. Dabei septiert die Konidie und eine der beiden Seiten bildet einen Keimschlauch aus, an dessen Ende sich ein Appressorium bildet. Während der Bildung des Appressoriums sekretiert dieses ein Adhäsiv, welches für die Anheftung an der Blattoberfläche erforderlich ist (Sugui et al. 1998). Die Appressorienbildung wird durch die Härte und Hydrophobizität der Blattoberfläche induziert (Howard et al. 1991; Chaky et al. 2001). Nach 15 bis 18 h melanisiert die Zellwand des Appressoriums. Durch die Einlagerung von Melanin wird die Permeabilität der Appressorienzellwand herabgesetzt. Diese Porenverkleinerung bewirkt, dass große osmotische Substanzen, wie Glycerol, nicht mehr aus dem Appressorium diffundieren können. Nur noch kleine Wassermoleküle können in das Appressorium einströmen, sodass sich in diesem ein hoher osmotischer Druck aufbaut. Mit der Melanisierung ist das Appressorium ausgereift und kann mittels hohem Tugordruck die Wirtszelle penetrieren (de Jong et al. 1997). Der Infektionsprozess wird durch zahlreiche vom Pilz produzierte Enzyme, wie Cutinasen, Cellulasen und Pektinasen unterstützt. Diese Enzyme dienen zum Abbau von Cutin, welches in der Kutikula und Zellwand der Pflanze enthalten ist. Die Penetration der Wirtszelle erfolgt über die appressoriale Pore, eine dünne zirkuläre Zone, welche nicht melanisiert ist. Anschließend

wird ein Infektionsvesikel ausgebildet, welches die Plasmamembran der Wirtszelle einstülpt, jedoch nicht penetriert (Bergstrom & Nicholson 1999). Erste biotrophe primäre Hyphen werden gebildet, die ebenfalls von der Plasmamembran umgeben sind. Die biotrophe Lebensphase ermöglicht *C. graminicola* Nährstoffe effektiv von der Pflanze aufzunehmen. Nach ca. 36 h erfolgt der Übergang in die nekrotrophe Phase. Es werden dünne verzweigte Sekundärhyphen ausgebildet. Mittels dieser nekrotrophen Hyphen kann das Pathogen die Plasmamembran der Wirtszelle penetrieren und schädigen. Der Pilz sekretiert in diesem Stadium Depolymerasen (Münch et al. 2008), welche die pflanzlichen Zellwände abbauen. Die entstehenden Abbauprodukte dienen *C. graminicola* als Nährstoffe. Des Weiteren werden auch Zellinhaltsstoffe nach erfolgter Lyse als Nahrungsquelle genutzt (Münch et al. 2008). Mit dem Übergang in die nekrotrophe Phase werden auch makroskopisch erste Symptome in Form von Blattflecken auf der Pflanze sichtbar. Nach 3 bis 5 Tagen werden auf diesem nekrotischen Gewebe neue Konidien in den Acervuli gebildet und der Entwicklungszyklus von *C. graminicola* ist abgeschlossen (Bergstrom & Nicholson 1999). Der Wechsel von der biotrophen zur nekrotrophen Phase wird als Hemibiotrophie bezeichnet (Perfect et al. 1999). *C. graminicola* besitzt ebenfalls die Fähigkeit, neben Blätter auch Maisstängel zu infizieren.

1.3. Die Organisation des Chromatin

Bei dem Ascomyceten *C. graminicola* sind epigenetische Prozesse, welche die Organisation des Chromatins kontrollieren weitestgehend unbekannt. Diese regulatorischen Prozesse sind entscheidend für die Verpackung der DNA und somit für die aktive Transkription genomischer Bereiche, die für die Entwicklung eines Organismus benötigt werden. Die Verpackung der DNA erfolgt in verschiedenen Ebenen und ist ein Protein – DNA – RNA – Komplex, welcher als Chromatin bezeichnet wird. Die kleinste Verpackungseinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Dies besteht aus einem Oktamer von je zwei negativ geladenen Core-Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Um dieses Oktamer sind in zwei Windungen 147 bp DNA gewickelt (Luger 2003). Diese 10 nm Faser wird auch als „beads on a string“ bezeichnet (Hsieh & Fischer 2005). Die nächste Verpackungseinheit der DNA ist das Solenoid. Hier werden die 6 – 8 Nukleosomen über ihre Linker-DNA, welche zwischen zwei Nukleosomen liegt, mit dem Histon H1 gebunden, wodurch eine

helikale Anordnung entsteht (Kasinsky et al. 2001). Dieser Chromatidfaden hat einen Durchmesser von 30 nm und ist 40-fach verdichtet. Diese 30 nm-Faser kann sich dann zu höheren Verpackungsgraden auffalten, bis zuletzt das Metaphasechromosom entsteht (Brosch et al. 2008). Für die Kompaktierung des Chromatins ist das Histon H1 essentiell. Bei höheren Eukaryoten existieren mehrere H1-Varianten. Im Vergleich dazu wurde bei *S. cerevisiae* und auch bei *C. graminicola* nur eine Isoform gefunden. In *S. pombe* konnte kein Histon H1 detektiert werden (Brosch et al. 2008; Kasinsky et al. 2001). Studien haben gezeigt, dass ein Stilllegen des H1 zu einem veränderten Phänotyp führen kann. Bei dem Ascomyceten *Ascobolus immersus* konnte mittels MIP (*methylation induced premeiotically*) das Gen komplett deletiert werden, was zu einer Hypermethylierung der globalen DNA und einer verkürzten Lebensdauer führte (Barra et al. 2000). Im Gegensatz dazu hat eine Deletion des H1 bei *Neurospora crassa* keinen Einfluss auf die globale DNA-Methylierung, RIP (*repeat induced point mutation*) oder der DNA-Reparatur, jedoch zeigen *hH1*-Mutanten einen langsam wachsenden Phänotyp, welcher von der Kohlenstoffquelle abhängig ist (Folco et al. 2003). Die Hauptaufgabe der Histonproteine ist die dichte Verpackung der DNA. Gleichzeitig muss jedoch dauerhaft gewährleistet sein, dass wichtige Funktionen der DNA, wie DNA-Replikation, Transkription oder DNA-Reparatur, weiterhin erfolgen können. Somit ist eine Expression regulatorischer Gene in bestimmten Entwicklungsstadien eines Organismus essentiell. Es existieren verschiedene Mechanismen, wie sich das Chromatin dynamisch verändern kann. Zum einen können Histone posttranslational modifiziert werden, was strukturelle und funktionelle Veränderungen bewirkt. Zum anderen kann die DNA selbst durch Methylierung modifiziert werden. DNA-Methylierung, Chromatin Remodelling und Histonmodifikationen sind *in vivo* eng miteinander verbunden und wirken abhängig voneinander (Brosch et al. 2008). Die Core-Histone der Nukleosomen bestehen aus einem globulären Zentrum und einem flexiblen N-Terminus (Jenuwein & Allis 2001). An den n-terminalen Schwänzen („*tails*“) der Histone befinden sich zahlreiche Aminosäuren, welche posttranslational modifiziert werden können. Modifikationen, wie Methylierung von Lysin und Arginin, Acetylierung von Lysin, Phosphorylierung von Serin (Zhang & Reinberg 2001), Ubiquitinierung oder ADP-Ribosylierung, beeinflussen die Struktur des Chromatins und somit die Zugänglichkeit der DNA (Bhaumik et al. 2007; Kouzarides 2000; Jenuwein & Allis 2001). Alle Modifikationen sind reversibel. Aufgrund verschiedener Modifikationen können zwei verschiedene Chromatinzustände beobachtet werden. Ist die Chromatinstruktur aufgelockert, spricht man von Euchromatin. In dieser Struktur befinden sich zahlreiche transkriptionsaktive Gene. Hoch kondensierte Genombereiche werden als

Heterochromatin bezeichnet. Diese Bereiche sind während des gesamten Zellzyklus inaktiv. Das Heterochromatin wird in konstitutives und fakultatives Heterochromatin unterteilt. Letzteres besitzt reversible Eigenschaften wie das Euchromatin und wird nur in wenigen Zellen gebildet, meist zu bestimmten Entwicklungsstadien. Dabei wird oft nur einer der beiden homologen Partner stillgelegt. Das bekannteste Beispiel ist das Barr-Körperchen, das inaktivierte X-Chromosom der weiblichen Säuger. Konstitutives Heterochromatin hingegen ist dauerhaft inaktiv und besteht vorwiegend aus mittel und hoch repetitiven Sequenzen. Konstitutives Heterochromatin ist in perizentrischen Regionen lokalisiert (Bryan 2001).

1.4. Epigenetische Regulationsmechanismen in verschiedenen Organismen

Für die Steuerung von verschiedenen Entwicklungsprozessen bei Pflanzen, Tieren und Pilzen spielen epigenetische Modifikationen und Regulationen eine wichtige Rolle. Die Bezeichnung Epigenetik wurde erstmals 1942 von Conrad Waddington verwendet (Waddington 1942). Im Gegensatz zur Genetik beschreibt die Epigenetik Mechanismen, welche nicht auf der Veränderung der DNA-Sequenz beruhen. Aufgrund posttranslationaler Histonmodifikationen und DNA-Methylierung wird die Chromatinorganisation verändert, wodurch die genetische Aktivität einzelner Gene oder ganzer Chromosomenabschnitte beeinflusst wird. Diese dynamischen Chromatinveränderungen bewirken genomweite und lokale Veränderungen der Genexpression und beeinflussen somit eine Vielzahl von Prozessen während des Wachstums, der Differenzierung von Zellen, oder auch Stoffwechselprozesse. Es existiert eine Reihe von Modellorganismen, an denen epigenetische Prozesse intensiv untersucht werden. Modelle zur Analyse epigenetischer Prozesse von heterochromatischem Gensilencing bzw. der Heterochromatisierung sind unter anderem Maus (*Mus Musculus*), *Drosophila melanogaster* oder der Ascomycet *N. crassa*. Eine der bekanntesten Beispiele bei Säugetieren ist die Inaktivierung des X-Chromosom bei weiblichen Mäusen (*Mus musculus*) (Heard et al. 1997). Bei *D. melanogaster* wird die Heterochromatisierung beispielsweise mittels Positions-Effekt-Variation (PEV) beeinflusst. Dabei kommt es zu einer Verlagerung von euchromatischen Genen in die Nähe von konstitutivem Heterochromatin, wodurch diese Gene stillgelegt werden. Dieses System ermöglichte erstmals Schlüsselfunktionen für die

Heterochromatinbildung zu identifizieren (Muller 1930; Reuter et al. 1982; Schotta et al. 2002).

Bei filamentösen Pilzen gibt es bislang zahlreiche Untersuchungen von Genen, welche als epigenetische Faktoren aus anderen Organismen bekannt sind. So konnte bei *N. crassa* ein funktioneller Zusammenhang zwischen H3K9 Methylierung und DNA-Methylierung gefunden werden. Die DNA-Methylierung in diesem Organismus ist von der H3K9 Methylierung, welche durch DIM5 (*defective in methylation*, H3K9 Histonmethyltransferase) katalysiert wird, abhängig (Tamaru & Selker 2001). Auch bei *Leptosphaeria maculans* wurden homologe Proteine zum Heterochromatin Protein 1 (HP1) oder DIM5, der H3K9 Histonmethyltransferase, gefunden. Ein Silencing dieser Faktoren führt zu einer Reduktion des Wachstums. *LmDIM5* Mutanten zeigen außerdem noch eine reduzierte Pathogenität (Soyer et al. 2014).

1.4.1. Histonmodifikationen

In Abhängigkeit von der Aminosäure am Core Histonschwanz können sowohl Lysin-, als auch Argininreste methyliert werden. Die Methylierung von Lysinen wird durch sogenannte Histon-Lysin-Methyltransferasen (HKMTs) katalysiert, welche eine Mono-, Di-, oder Trimethylierung von Lysinen vermitteln. Bei der Methylierung wird eine Methylgruppe von S-Adenosyl Methionin (SAM) auf einen Lysinrest des Substratproteins übertragen. Im Histon werden Lysinreste an den Positionen 4, 9, 14, 27, 36 und 79 methyliert. Auch das Lysin 26 im Histon H1 und die Lysine 20 und 59 des Histon H4 werden methyliert (Brosch et al. 2008). Proteine, welche als HKMTs beschrieben sind, besitzen zumeist eine katalytische SET (Su(var)3–9, Enhancer-of-Zeste, Trithorax) Domäne (Brosch et al. 2008). In Abhängigkeit von dem Vorhandensein einer pre- und/oder postSET Domäne werden die HKMTs in vier Klassen unterteilt: SUV39 (*Suppressor of variegation*), SET1, SET2 und RIZ (*Retinoblastoma protein-Interacting zinc finger*) (Kouzarides 2002; Brosch et al. 2008). Bei filamentösen Pilzen, wie *N. crassa* oder *A. nidulans*, wurden bislang alle Klassen identifiziert, außer RIZ (Brosch et al. 2008). Die größte Klasse der HKMTs ist die SUV39 Familie. Sie beinhaltet die Methyltransferasen für die H3K9 oder die H3K27 Methylierung (Selker et al. 2003; Rea et al. 2000; Tamaru & Selker 2001; Tachibana et al. 2001). In dieser Klasse von Proteinen wird die SET-Domäne von einer n-terminalen pre- und einer c-terminalen postSET Domäne flankiert. Pre- und postSET Domänen sind dabei reich an

Cytosinen. Die bekannteste HKMT ist Dim-5 (*defective in methylation*) aus *N. crassa*. Dim-5 katalysiert die Trimethylierung des Lysins 9 am Histon H3 und ist essentiell für die DNA-Methylierung. Deletionsmutanten zeigen neben dem Verlust der DNA Methylierung auch Wachstumsdefekte und reduzierte Fertilität (Tamaru & Selker 2001; Tamaru et al. 2003). Das Dim-5 Homolog bei *S. pombe* ist Clr4. Diese Histonmethyltransferase besitzt neben der SET-Domäne noch eine Chromo Domäne, welche für die Methylierungsaktivität *in vivo* erforderlich ist. Im Vergleich dazu konnte bei *S. cerevisiae* keine H3K9 Histonmethyltransferase identifiziert werden (Brosch et al. 2008). Bei *C. graminicola* wurde ebenfalls ein Dim-5 Homolog gefunden, welches den typischen Aufbau eines SUV39 Proteins aufweist.

Bei zahlreichen filamentösen Pilzen, wie *N. crassa*, *A. nidulans* oder *U. maydis*, konnten homologe Proteine aus der SET1 Familie gefunden werden, welche neben der SET Domäne noch eine postSET Domäne, sowie eine RNA Erkennungssequenz (RRM) aufweisen. Zusätzlich besitzen viele Proteine noch ein bis zwei *coiled coil* Domänen. Mitglieder dieser Proteinfamilie methylieren Lysin 4 oder Lysin 27 am Histon H3. Bei *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass Set1 die H3K4 Methylierung katalysiert (Kano et al. 2003). Bei *D. melanogaster* wird die H3K27 Methylierung von der Methyltransferase E(Z) (Enhancer-of-Zeste), einer Untereinheit des Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) katalysiert. Die HMT Aktivität des PRC2 Komplexes ist dabei abhängig von der intakten SET-Domäne des E(Z)-Proteins (Cao et al. 2002; Kuzmichev et al. 2002). Bei *N. crassa* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass der PRC2 Komplex für die Trimethylierung des Lysins 27 am Histon H3 verantwortlich ist. Die Deletion des SET-7 Genes, welches homolog zu E(Z) ist, resultierte in einem Verlust von H3K27me₃ (Jamieson et al. 2013). Auch bei *F. fujikuroi* oder *E. festucae* wird die H3K27 Trimethylierung durch entsprechende homologe Enzyme katalysiert (Chujo & Scott 2014; Studt 2016). Jedoch besitzen nicht alle filamentösen Pilze H3K27 Trimethylierung. Bei *S. cerevisiae* wurde weder H3K27me₃ noch H3K9me₃ nachgewiesen. *S. pombe* besitzt ebenfalls keine H3K27me₃, aber H3K9me₃ (Jamieson et al. 2013; Lachner et al. 2004). Eine putative H3K27 Histonmethyltransferase wurde auch bei *C. graminicola* gefunden.

Proteine der SET2 Familie besitzen neben der SET- und der postSET Domäne zusätzlich eine AWS (*associated with SET*) und eine WW (Tryptophan) Domäne, welche prolinreiche Polypeptide bindet (Gao et al. 2006). Bei *N. crassa* und *S. pombe* konnte gezeigt werden, dass ein Set2 Protein für die Methylierung am Lysin 36 des Histon H3 verantwortlich ist

(Adhvaryu et al. 2005; Morris et al. 2005). Eine Set2 Deletion bei *N. crassa* zeigt, dass dieses Enzym für die normale Entwicklung des Ascomyceten essentiell ist. Mutanten weisen ein langsames Wachstum, eine geringe Konidienbildung und Sterilität auf (Adhvaryu et al. 2005).

Die Methylierung von Histonen galten lange Zeit als irreversibel und stabil. 2004 wurde die erste lysinspezifische Demethylase LSD1 identifiziert, welche H3K4 demethyliert. LSD1 ist eine Aminooxidase, die H3K4me1 und H3K4me2, aber nicht H3K4me3 in einem FAD abhängigen Prozesse zu unmodifizierten Lysin und Formaldehyd umwandelt (Shi et al. 2004). Durch die Demethylierung der Lysine 4 und 9 reprimiert LSD1 die Genexpression (Metzger et al. 2005). LSD1 homologe Proteine bei filamentösen Pilzen, wie *N. crassa* und *A. nidulans*, besitzen eine SWIRM Domäne (SWI3, RSC8 and MOIRA) und eine C-terminale FAD abhängige Aminooxidase (Brosch et al. 2008). Bei *S. pombe* wurden zwei LSD1 Proteine, *splsd1* und *splsd2*, identifiziert. *splsd1* Mutanten weisen ein reduziertes Wachstum auf. Des Weiteren führt der Verlust dieses Gens zu einer erhöhten H3K9 Methylierung, was eine Reduktion der Transkription euchromatischer Gene zur Folge hat. Die Deletion des *splsd2* ist letal (Lan et al. 2007).

Auch Acetylierungen können die Chromatinstruktur flexibel beeinflussen. Dabei spielen zwei antagonistische Gruppen von Enzyme, Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC), eine wichtige Rolle, welche Acetylierungen vermitteln oder reversibel wieder entfernen können. Histonacetylierung von Core-Histonen bewirken eine aufgelockerte euchromatische Struktur. Im Gegensatz zu anderen Modifizierungen, welche durch ein spezifisches Enzym katalysiert werden, besitzen HATs die Fähigkeit, multiple Lysinreste zu acetylieren. Stets erfolgt dies mittels eines Proteinkomplexes (Jeon et al. 2014). Histonacetyltransferasen werden in zwei große Gruppen unterteilt, GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferases) und MYST (MOZ, YBF2/SAS3, SAS2, Tip60) Enzyme. GNATs sind Komponenten von regulatorischen Komplexen, welche die Chromatinaktivität beeinflussen. Eine der am besten untersuchten Acetyltransferasen ist GCN5 aus *S. cerevisiae*. Bei *N. crassa* wird das Homologe NGF-1 für die Induktion eines blaulicht-induzierten Gens WC-1 (*White Collar-1*) benötigt. Eine RIP induzierte Mutation dieses Gens führt zu einer Reduktion der H3K14 Acetylierung (Grimaldi et al. 2006). Mitglieder der MYST Gruppe acetylieren Lysinreste am Histon H2A, H3 und H4 (Roth et al. 2001). Esa1 aus *S. cerevisiae* wird beispielsweise für die DNA Reparatur oder den Ablauf des Zellzyklus benötigt (Jeon et al. 2014).

Histondeacetylasen entfernen Acetylgruppen von den Lysinresten. Durch die Deacetylierung wird der Lysinrest wieder positiv geladen, sodass eine erhöhte Affinität zum negativ geladenen DNA-Gerüst entsteht. Somit bewirken diese Enzyme ein transkriptionelles Gensilencing (Bannister & Kouzarides 2011). HDACs werden in vier Klassen unterteilt. Klasse I und II beinhaltet Enzyme, welche eng verwandt zu Rpd3 (*reduced potassium dependency 3*) und Hda1 sind (Jeon et al. 2014). Sir2 (*silent information regulator -2*) oder Sirtuine (*Sir2-like protein*) gehören zur Klasse III der Histondeacetylasen. Diese benötigen für ihre Aktivität einen speziellen Cofaktor, NAD⁺. Aus Klasse IV sind bisher nur wenige Enzyme bekannt (Jeon et al. 2014). Bei pflanzenpathogenen Pilzen werden Regulationsmechanismen während des Infektionszyklus durch Histondeacetylasen reguliert. So konnte bei dem Reispathogen *Magnaporthe oryzae* gezeigt werden, dass die Inhibierung von Histondeacetylasen die Differenzierung der Appressorien verhindert (Izawa et al. 2009). Auch einzelne Bestandteile des HDAC-Komplexes, wie *TIG1* (*Transducin β -like gene*), nehmen Einfluss auf die Infektiosität dieses Ascomyceten (Ding et al. 2010). Auch bei *Fusarium graminearum* führt die Deletion von HDF1, eine Klasse II HDAC, zu einer Reduktion der Virulenz und Toxinbildung von Deoxynivalenol (DON) (Li et al. 2011).

1.4.2. DNA-Methylierung

DNA-Methylierung ist bei vielen verschiedenen Organismen, wie Bakterien, Pilzen, höheren Pflanzen und auch Säugetieren, zu finden. Bei Eukaryoten erfolgt eine Methylierung an der C5-Position der DNA. Cytosine in der DNA werden mittels DNA-Methyltransferasen (DNMTasen) methyliert. Diese nutzen den Cofaktor S-Adenosyl Methionin (SAM), um eine Methylgruppe auf das Cytosin zu übertragen, wodurch 5-Methylcytosin (5mC) entsteht. Dabei entstehen symmetrische (CG und CHG) und asymmetrische (CHH) Methylierungsmuster. Bei Säugetieren und Pflanzen sind zentromer- und perizentromere Regionen sowie repetitive Sequenzen stark methyliert (He et al. 2011). Die erste charakterisierte DNA-Methyltransferase DNMT1 aus Maus bewirkt eine *maintanence* Methylierung. Dies bedeutet, dass nach der Replikation das vorhandene Methylierungsmuster erhalten bleibt. Im Gegensatz dazu wurden auch zwei *de-novo* Methyltransferasen, DNMT3a und DNMT3b, gefunden. Diese katalysieren die Übertragung der Methylgruppe auf neue, vorher unmethylierte Bereiche der DNA (Bestor et al. 1988; Li et al. 1992; Okano et al. 1999). Bei Säugetieren und Pflanzen wird DNA-Methylierung für

die normale Entwicklung der Organismen benötigt. Auch bei Pilzen wird der Einfluss von DNA-Methyltransferasen untersucht. Jedoch scheinen Gene, welche in diesen Organismen als DNA-Methyltransferasen vorhergesagt werden, nicht immer essentiell für den Organismus zu sein. Bei *N. crassa* eliminiert eine Deletion von DIM2 (*defective in methylation*) die gesamte DNA-Methylierung, aber der Verlust beeinflusst das Wachstum dieser Mutante nicht (Foss et al. 1993). Für die DNA-Methylierung bei *N. crassa* ist nicht nur DIM2 entscheidend, sondern auch DIM5, die H3K9 Histonmethyltransferase (Tamaru & Selker 2001). Diese wird von dem HP1-DIM2 Komplex erkannt und von HP1 gebunden, was eine direkte Interaktion mit DIM2 zur Folge hat und die Methylierung der DNA erfolgt. DNA-Methylierung bei *N. crassa* ist somit das Ergebnis eines unidirektionalen Pathway (Freitag et al. 2004; Honda & Selker 2008). Bei *Magnaporthe oryzae* wurden 2 verschiedene DNA-Methyltransferasen, MoDIM-2 und MoRID, welche eine hohe Homologie zu *N. crassa* aufweisen, identifiziert. MoDIM-2 scheint als *Maintenance*-DNA Methyltransferase zu fungieren, da bei der Deletionsmutante in den analysierten Transposon MAGGY keine C5-Methylierung mehr nachzuweisen ist. Im Vergleich dazu konnte bei der Δ *Morid* noch DNA-Methylierung detektiert werden, jedoch auch reduziert im Vergleich zum Wildtyp (Jeon et al. 2015). Diese zwei verschiedenen Typen von DNA-Methyltransferasen scheinen für filamentöse Pilze der Unterabteilung Pezizomycotina typisch zu sein, da sowohl bei *F. graminearum* als auch bei *C. graminicola* diese beiden Homologe (CgDIM2-1 und CgDIM2-1) gefunden wurden.

1.5. Heterochromatin Protein 1

Ein essentieller Faktor für den Aufbau von Heterochromatin ist das Heterochromatin Protein 1 (HP1) und dessen Bindung von H3K9me2/me3 (Mishima et al. 2013). HP1 wurde erstmals als ein chromosomales Nichthiston-Protein bei *D. melanogaster* beschrieben, welches überwiegend an perizentrischem Heterochromatin und den Telomeren lokalisiert ist (James & Elgin 1986). Bei *Drosophila* ist eine mutierte Form des Proteins an der Unterdrückung des PEV beteiligt. Bei der Positions-Effekt-Variegation wird ein euchromatisch lokalisiertes Gen inaktiviert, wenn es durch Transposition in die Nähe von Heterochromatin gebracht wird. HP1 ist dabei der dominante Suppressor (Eissenberg et al. 1990; Eissenberg et al. 1992). Das Heterochromatin Protein 1 ist ein hochkonserviertes

Protein, welches bei Säugetieren und auch Pilzen vorkommt. Bei der Maus wurden drei verschiedene Isoformen gefunden, HP1 α , HP1 β und HP1 γ . HP1 α ist dabei vorwiegend in den heterochromatischen Regionen lokalisiert, während HP1 β über die gesamten Chromosomen verteilt und HP1 γ meistens im Euchromatin zu finden ist (Minc et al. 1999; Minc et al. 2000; Minc et al. 2001). Bei *D. melanogaster* wurden ebenfalls drei HP1 Proteine gefunden (HP1a, HP1b und HP1c). In dem Ascomyceten *Schizosaccharomyces pombe* wurde das HP1 Homolog Swi6 identifiziert. Im Vergleich dazu hat *Saccharomyces cerevisiae* kein HP1 Ortholog. Während *N. crassa* nur ein HP1 Proteinhomolog besitzt, weist *Dictyostelium* zwei HP1 Homologe auf. Bei verschiedenen tierischen Systemen wurden bis zu fünf HP1 Homologe gefunden (Lomberk et al. 2006; Halverson et al. 2000).

Alle HP1 Proteine bestehen aus zwei konservierten Domänen, die über eine Hinge Region miteinander verbunden sind. Im N-terminalen Bereich befindet sich die Chromo Domäne (*chromatin organization modifier*) und am C-Terminus die Chromo Shadow Domäne (Eissenberg & Elgin 2000). Die Chromo Domäne bindet H3K9me2/me3 und ist somit für eine transkriptionelle Repression verantwortlich, während die Chromo Shadow Domäne für die Dimerisierung entscheidend ist. Die Hinge Region ist unstrukturiert und ermöglicht somit den beiden Domänen eine unabhängige Mobilität innerhalb des Proteins (Thiru et al. 2004; Brasher et al. 2000).

Studien bei *Drosophila* zeigen, dass die Stabilität der Chromo Domäne entscheidend für die Gensilencing-Funktion des Proteins ist. Die Punktmutation einer stark konservierten Aminosäure (V26M) führt dazu, dass die Struktur dieser Domäne destabilisiert wird. Dadurch ist das Protein nicht mehr in der Lage, H3K9me2/me3 zu erkennen und daran zu binden (Platero et al. 1995; Jacobs et al. 2001).

Im Vergleich zu der hohen Bindungsspezifität der Chromo Domäne mit H3K9me2/me3, interagiert die Chromo Shadow Domäne mit mehreren verschiedenen Proteinen (Lomberk et al. 2006). Viele Interaktionspartner nehmen dabei direkten Einfluss auf die Ausbildung von Heterochromatin. Die Chromo Shadow Domäne ist verantwortlich für die Lokalisierung des HP1 ins Heterochromatin. Proteine, welche keine intakte Chromo Shadow Domäne aufweisen, sind auch nicht im Heterochromatin lokalisiert (Aasland & Stewart 1995). Bevor HP1 mit anderen Proteinen interagieren kann, muss dieses dimerisieren, was ebenfalls über die Chromo Shadow Domäne vermittelt wird. Durch diese Homo- und

Heterodimerisierung wird es dem Protein ermöglicht, andere Proteine über seine entstehende unpolare Furche zu binden.

Bei *N. crassa* wurde erstmals gezeigt, dass HP1 für die DNA-Methylierung in diesem Organismus benötigt wird. Erst durch die Interaktion von HP1 mit H3K9me3 wird DNA-Methylierung über DIM2 ermöglicht (Brasher et al. 2000; Yamamoto & Sonoda 2003; Freitag et al. 2004). Proteine, welche mit der Chromo Shadow Domäne wechselwirken, besitzen ein PXVXL Pentapeptid Motiv, wie beispielsweise p150, die große Untereinheit des CAF-1 (Chromatin Assembly Faktors 1) oder Proteine, welche an der Regulation der Transkription beteiligt sind (TIF1 α oder TIF1 β in Maus). Mutationen in diesem Motiv verhindern, dass diese Faktoren an HP1 binden können (Thiru et al. 2004). Auch Pilze weisen ein ähnliches Sequenzmotiv auf. Bei *N. crassa* interagiert die Chromo Shadow Domäne mit DIM-2. Dieses Protein weist kein klassisches PXVXL Motiv auf, jedoch ein Tandempaar ähnlicher Sequenzen im C-terminalen Bereich des Proteins (ITVDL und PVSTL), durch welches eine Interaktion mit HP1 erfolgen kann. Auch bei *Magnaporthe grisea* konnte ein PXVXL ähnliches Motiv gefunden werden, welches eine Protein-Protein Interaktion mit HP1 ermöglicht (Thiru et al. 2004; Honda & Selker 2008).

Beide Domänen sind über die wenig konservierte Hinge Region verbunden. Diese flexible Region ist besonders für posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierung gut zugänglich. HP1 ist selbst mehrfach phosphoryliert. Dies beeinflusst jedoch nicht die Dimerisierung, sondern verändert nur die DNA Bindeeigenschaften. Modifikationen der Hinge Region beeinträchtigen ebenfalls die Lokalisation des Proteins, da dieser Bereich das Kernlokalisierungssignal enthält. Somit scheint diese Linker Region auch eine zentrale Rolle in der Regulation des Proteins einzunehmen (Zhao et al. 2001; Badugu et al. 2005; Lomberk et al. 2006).

Veränderungen in der Aminosäuresequenz von HP1 beeinflussen die Funktionalität des Proteins in Bezug auf H3K9me2/me3 Bindung oder der Protein-Protein-Interaktionen. Ein Verlust von HP1 nimmt jedoch auch Einfluss auf physiologische Prozesse. Bei *S. pombe* sind beide HP1 Proteine, SWI6 und Clo2 für das normale Wachstum wichtig, aber die Pilze sind lebensfähig (Halverson et al. 2000; Lorentz et al. 1994). Im Gegensatz dazu führt der Verlust von HP1 bei *Drosophila* im dritten Larvenstadium zur Letalität (Kellum & Alberts 1995). *hpo* Mutanten bei *N. crassa* zeigen drastische Wachstumsdefekte. Bei diesen Mutanten wird ein blumenkohl-ähnliches Myzel ausgebildet, welches auch sehr wenige und

abnormale Sporen enthält. Des Weiteren sind die Ausbildung der asexuellen Sporen sowie die Carotinoidproduktion verzögert. Auch beim Pflanzenpathogen *L. maculans*, dem Erreger der Umfallkrankheit auf Raps, konnte ebenfalls ein reduziertes Wachstum beobachtet werden (Freitag et al. 2004; Soyer et al. 2014). Sekundärmetabolite können durch Chromatinveränderungen ebenfalls beeinflusst sein. Das HP1 Homolog HEP1 bei *F. graminearum* ist in die Expression von Genen involviert, welche unter anderem für die Produktion von Aurofusarin (AUR) benötigt werden. Eine Deletion von HEP1 hat zur Folge, dass die Aurofusarin Produktion gesteigert wird, da die Expression der *AUR*-Gene stark ansteigt (Reyes-Dominguez et al. 2012).

2. Ziele der Arbeit

Der filamentöse Ascomycet *Colletotrichum graminicola* gehört zu einer der ökonomisch bedeutendsten Pflanzenpathogenen. Vorrangegangenen Studien zeigen, welche spezialisierten Infektionsstrukturen der Pilz ausbildet und wie der hemibiotrophe Lebenszyklus auf und innerhalb der Wirtspflanze abläuft. Welche Rolle epigenetische Prozesse bei der Kontrolle der Pathogenität von *C. graminicola* spielen, ist jedoch bislang nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit soll der Einfluss dieser Prozesse auf die Differenzierung und Etablierung der pilzlichen Infektionsstrukturen untersucht werden. Weiterhin von Interesse ist die Regulation der Heterochromatinbildung und welche Faktoren dafür entscheidend sind. Dazu wurden mittels homologer Rekombination verschiedene Knockout-Mutanten für epigenetische Kontrollfaktoren, wie DNA-Methyltransferasen oder Histonmethyltransferasen erzeugt. Immunozytologische und phytopathologische Analysen der Knockout-Mutanten sollen Aufschluss darüber bringen, wie bei *C. graminicola* die epigenetische Kontrolle der Heterochromatinbildung und das Gensilencing erfolgt. Infektionsstudien auf Mais, sollen klären, ob und wie die Pathogenität durch diese Kontrollfaktoren beeinflusst wird.

HP1 ist das zentrale Protein für den Aufbau von Heterochromatin. Bei *C. graminicola* soll die Funktion von HP1 durch die Deletion des kompletten Gens, einzelner Domänen oder Aminosäureaustausche genauer untersucht werden. Durch die Erzeugung von HP1-GFP Fusionskonstrukten kann die Expression und Lokalisation des Proteins innerhalb des Infektionszyklus analysiert werden. Bei verschiedenen Organismen wurden gezeigt, dass die Deletion von HP1 zu Beeinträchtigungen der Lebensfähigkeit führt. Mittels Infektionsassays und Wachstumsversuche soll die Virulenz und Vitalität der generierten Mutanten untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Biologische Material

3.1.1. *Colletotrichum graminicola*

Für alle durchgeführten Untersuchungen wurde das Wildtypisolat CgM2 von *Colletotrichum graminicola* als Referenzobjekt und Ausgangsmaterial verwendet (Bergstrom & Nicholson 1999; Panaccione et al. 1988). Die Kultivierung der Pilze erfolgte in Flüssigmedium und auf verschiedenen Festmedien. Zur Erzeugung großer Myzelmassen für die Isolation von Nukleinsäuren und Histonen wurde *C. graminicola* in Komplettmedium (M3) angezogen und für fünf bis sieben Tage auf einem Taumelschüttler (50 rpm, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) oder in einem Schüttelinkubator (Multitron Standard, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) bei Raumtemperatur kultiviert. Zur Anregung der Sporulation wurde der Pilz auf Haferflockenmedium (OMA – *Oat Meal Agar*) (M1) kultiviert. Die Lagerung der Platten erfolgte bei 23 °C in einem Inkubationsschrank. Generierte Mutanten von *C. graminicola* wurden auf festem Kartoffel-Dextrose-Agar (PDA – *Potato Dextrose Agar* (M2)) mit dem Antibiotikum Hygromycin B oder Geneticin, ebenfalls bei 23 °C kultiviert. Um Dauerkulturen zu erzeugen, wurden Sporen von OMA-Platten mit 25% (v/v) Glycerol ab gespült und bei – 80 °C gelagert.

3.1.2. Weitere Ascomyceten

Für genauere epigenetische Untersuchungen der Chromatinverteilung im Zellkern wurden weitere verschiedene Ascomyceten verwendet (Anhang 8.11.). Alle Ascomyceten wurden vom Leibniz-Institut für Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig (Deutschland) oder von Jena Microbial Resource Collection (JMRC, Deutschland) bezogen.

3.1.3. *Escherichia coli*

Der *Escherichia coli* Stamm DH5 α von Invitrogen GmbH (Karlsruhe, Deutschland) wurde für alle Experimente in dieser Arbeit verwendet. Für die Kultivierung wurde flüssiges LB-Medium (M9) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler (Orbitron, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Auf festem LB-Agar (M8) erfolgte die *E.coli* Kultivierung ebenfalls bei 37 °C im Inkubator. Zur Selektion der Bakterien wurden die Medien mit entsprechenden Antibiotika versehen.

3.1.4. *Zea mays*

Infektionsstudien von *C. graminicola* und daraus resultierender Mutanten erfolgten auf der Sorte „Mikado“ (KWS Saat AG Einbeck, Deutschland). Pro Topf wurden 4 Pflanzen in Substraterde angezogen. Die Maiskörner wurden für zwei Tage vorgekeimt und anschließend für 3 Tage im Gewächshaus, bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 16h/8h und einer Minimaltemperatur von 20 °C, angezogen. Für die Anzucht im Gewächshaus wurden Hochdruck-Metallhalogendampf-Lampen (Master HPI-T Plus 400W, Phillips, Amsterdam, Niederlande) verwendet, welche einen Lichtstrom von 35000 Lumen erzeugen. Nach 3 Tagen wurden die Pflanzen im Klimaschrank AR-66L (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) mit den Einstellungen „Tag“ (16 h, 50% relative Luftfeuchte, 24 °C, 70% Lichtintensität) und „Nacht“ (8 h, 70% relative Luftfeuchtigkeit, 22 °C, 0% Lichtintensität) kultiviert.

Für detailliertere Infektionsstudien wurden weitere Inzucht-Maislinien aus Iowa von der North Central Regional Plant Introduction Station bezogen. Diese Inzucht-Linien wurden unter gleichen Bedingungen wie Mikado angezogen (Tabelle 12.). Die Mais Sorte Golden Jubilee wurde von der Firma Territorial Seed Company (Cottage Grove, OR, USA) bezogen und B73 von ARS-USDA (Ames, Iowa, USA).

3.1.5. *Allium cepa*

Für Infektionsstudien zwischen *Colletotrichum graminicola* und *Allium cepa* wurden Speisezwiebeln in Bioqualität verwendet.

3.2. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt, Deutschland), Biorad (München, Deutschland), Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Enzyme und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) und Promega (Madison, Wisconsin, USA) verwendet. Oligonukleotide wurden bei der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) bestellt.

3.3. Bioinformatik

Für *in silico* Analysen wurden verschiedene Datenbanken verwendet. Für DNA- und Proteinvergleiche wurde BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Des

Weiteren wurden für die Suche von Proteinen und Proteinstrukturen UniProt (<http://www.uniprot.org/>) und SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) genutzt. Für die Vorhersage von Genen und deren Strukturen wurde Augustus Gene Prediction (<http://bioinf.uni-greifswald.de/augustus/>) zur Hilfe genommen.

3.4. Medien, Lösungen und Puffer

3.4.1. Medien

M1 Haferflockenagar, *Oat Meal Agar (OMA)*. In 1000 ml destilliertem Wasser wurden 50 g homogenisierte Haferflocken und 15 g Agar gelöst. Anschließend wurde das Medium 45 min. bei 120 °C autoklaviert.

M2 Kartoffeldextroseagar, *Potato Dextrose Agar (PDA)*. In 1000 ml destilliertem Wasser wurden 39 g PDA (BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) gelöst. Das Medium wurde 25 min. autoklaviert. Optional wurde dem Medium Antibiotikum für die Selektion hinzugefügt (Geneticin oder Hygromycin B je 100µg/ml).

M3 Kompletmedium, *Complete Medium (CM)*. (modifiziert nach Leach et al. 1982). In einem Gesamtvolumen von 1000 ml destilliertem Wasser wurden je 10 ml von Stammlösung A und B (L1 und L2), 10 g Glucose, 1 g Hefeextrakt und 1 g Caseinhydrolysat gelöst und 25 min. autoklaviert.

M4 Sporulationsmedium. In 1000 ml H₂Odest wurden 171,2 g Saccharose und 2 g Hefeextrakt gelöst und autoklaviert.

M5 Regenerationsmedium. In einem Gesamtvolumen von 500 ml destilliertem Wasser wurde 171,5 g Saccharose, 0,5 g Hefeextrakt, 0,5 g Caseinhydrolysat und 7,5 g Agar-Agar gelöst und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C erfolgte die Zugabe der Selektionsmarker Geneticin oder Hygromycin B in einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml.

M6 Regenerationsmedium (Topagar). In 100 ml destilliertem Wasser wurden 34,3 g Saccharose, 0,1 g Hefeextrakt, 0,1 g Caseinhydrolysat und 0,6 g Agar-Agar gelöst und autoklaviert. Dieses Medium wurde bei 45 °C bis zum Gebrauch flüssig gehalten.

M7 H₂O- Agar. In 1000 ml destillierten Wasser wurden 1,5% Agar gelöst und autoklaviert.

M8 LB-Agar. 35 g LB-Agar wurden in einem Gesamtvolumen von 1000 ml gelöst. Zur Selektion der Bakterien erfolgte nach dem Autoklavieren die Zugabe von Antibiotikum (z.B. Ampicillin) in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml

M9 LB- Flüssigmedium. 25 g LB-Flüssigmedium werden in einem Gesamtvolumen von 1000 ml gelöst. Die Selektion erfolgte mittels Antibiotikumzugabe, (z.B. 0,1 mg/ml Ampicillin).

M10 SOC Medium. Das Medium wurde von der Firma Invitrogen bezogen.

3.4.2. Lösungen

Tabelle 1: Lösungen

Nr.	Bezeichnung	Zusammensetzung
L1	Stammlösung A	600 mM Ca(NO ₃) ₂
L2	Stammlösung B	150 mM KH ₂ PO ₄ , 100 mM MgSO ₄ , 92 mM NaCl
L3	STC	1M Sorbitol, 50 mM CaCl ₂ , 10 mM TrisCl
L4	DAPI	0.1 µg/ml DAPI in McIlvaine´s Buffer (0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat (pH 7,0) mit 25% Glycerol
L5	PEG Lösung	40% (w/v) PEG 4000, 50 mM TrisCl (pH8), 0,6 M KCl, 50 mM CaCl ₂
L6	1x PBS	140mM NaCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
L7	Entfärbelösung	Ethanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1
L8	Lactophenol	20% (v/v) Milchsäure 20% (v/v) Phenol 40% (v/v) Glycerin 20% (v/v) H ₂ O bidest
L9	Anilinblau-Lactophenol	0,025% (w/v) Anilinblau in Lactophenol
L10	Hoechst 33342	0.1 µg/ml Hoechst 33342 (Stock: 1mg/ml in 1xPBS gelöst) in McIlvaine´s Buffer (0,1 M Zitronensäure, 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat (pH 7,0)) mit 25% Glycerol

3.4.3. Puffer

Tabelle 2: Puffer

Nr.	Bezeichnung	Zusammensetzung
P1	DNA-Extraktionspuffer I	7 M Harnstoff, 2% SDS [w/v], 5 mM EDTA (pH 8)
P2	DNA-Extraktionspuffer II	150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl
P3	Histon-Extraktionspuffer	20 mM HEPES (pH 7,9), 400 mM Sucrose, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM KCl, 0,1% TritonX-100, 0,02% NaN ₃ (w/v), 1,5 mM PMSF, 1 mM DTT
P4	Laufpuffer (1x ELPHO)	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0, 1% SDS
P5	Blotpuffer	20% Methanol in 1x Elphopuffer
P6	1x TBST Waschpuffer	10 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20
P7	Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 1 M NaOH
P8	Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl (pH 7,4)
P9	20x SSC	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat-Puffer (pH 7,4)
P10	2x Waschpuffer	2x SSC, 0,1% SDS (w/v)
P11	Protoplastierungspuffer	400 mg Lyse Enzyme von <i>Trichoderma harzianum</i> (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 0,1% β-Mercaptoethanol, 20 ml NaCl 0,7 M
P12	5x Stop Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8), 120mM EDTA, 50% Glycerol, 0, 1% Acridinorange
P13	50x TAE	20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, 40 mM Tris-Cl (pH 8,3)
P14	10x TBE	108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 4 ml 0,5M EDTA (pH 8)
P15	Denaturierungspuffer für 5-Methylfärbung	70% Formamid, 2xSSC, 50mM Na-Phosphat (pH 7,0)

3.5. Vektoren

Als Vektor für Klonierungen wurde der blunt end pJET1.2 Vektor von der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) verwendet. Dieser Plasmidvektor vermittelt eine Resistenz gegenüber Ampicillin.

3.6. Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurden von den Firmen Diagenode (Liège, Belgien), Abcam (Cambridge, UK) oder Active Motif (La Hulpe, Belgien) bezogen (Anhang 8.12.).

3.7. Präparation von Nukleinsäuren und Proteinen

3.7.1. Präparation genomischer DNA aus *Colletotrichum graminicola*

Die Präparation genomischer DNA aus *C. graminicola* erfolgte nach Döbbeling et al. 1997. Pilzmyzel wurde 7 Tage in flüssigem CM – Medium (M3) auf einem Taumelschüttler (50 rpm, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) kultiviert. Durch Filtration wurde das Myzel aus dem Kolben geerntet und auf saugfähigem Papier kurz getrocknet. 500 mg Pilzmyzel wurden mittels flüssigen Stickstoff homogenisiert und in ein Eppendorfggefäß mit 800 µl Extraktionspuffer I (P1) überführt. Im Verhältnis 1:1 wurde die Probe mit 800 µl Phenol-Chloroform versetzt, kräftig gevortext und für 10 min. bei 4 °C und 14500 g zentrifugiert. Die entstehende obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfggefäß überführt und mit Chloroform im gleichen Volumen versetzt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 14500 g und 4 °C wurde die obere wässrige Phase erneut in ein neues Eppendorfggefäß überführt und mit Isopropanol im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Probe wurde 3 - 4-mal invertiert und bei -20 °C für 60 min. inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (15 min., 6800 g und 4 °C) wurde das Pellet in 700 µl Extraktionspuffer II (P2) resuspendiert. Das gelöste Pellet wurde mit 3,5 µl (10 mg/ml) RNase A (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) versetzt und für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Proteinase K (14-22 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) erfolgte eine weitere Inkubation bei 60 °C für eine Stunde. Nach diesem

Schritt schloss sich die zweite Fällung der DNA an. Dazu wurden die Proben erneut mit Phenol-Chloroform, Chloroform und Isopropanol (siehe oben) behandelt. Die ausgefällte DNA wurde nach 60 min. Inkubation bei -20 °C erneut zentrifugiert (14500 g, 20 min. und 4 °C). Das entstandene Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter der Sterilbank getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen. Der Reinheitsgrad und die Konzentration wurden mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.7.2. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Präparation aus *E.coli* wurden 2 ml flüssiges, ampicillinhaltiges LB-Medium (M9) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm (Orbitron, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) kultiviert. Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* erfolgte mittels des „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland). Die Präparation basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um eine höhere Konzentration der isolierten Plasmid-DNA zu erhalten, erfolgte eine Elution nicht, wie im Protokoll angegeben, in 50 µl, sondern in 30 µl Elution-Puffer. Bei -20 °C wurde die Plasmid-DNA gelagert.

3.7.3. Präparation von RNA aus *Colletotrichum graminicola*

Die Isolation von pilzlicher RNA aus *C. graminicola* erfolgte nach den Angaben des Herstellerprotokolls aus dem RNeasy Plant-Mini-Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland). Zusätzlich wurde eine DNase-Behandlung direkt auf der Säule mit Hilfe des RNase-Free DNase Sets vom gleichen Hersteller durchgeführt. Mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurden die Konzentration und der Reinheitsgrad der isolierten RNA gemessen. Eine Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.7.4. Präparation von Histonen aus *Colletotrichum graminicola*

Die Präparation der Histone erfolgte nach dem Protokoll von Houben et al. 2003, mit einigen Modifikationen. Pilzmyzel von *C. graminicola* wurde für 5-7 Tage in Flüssigmedium (M3) angezogen und wie 3.7.1. beschrieben geerntet. Mittels flüssigen Stickstoff wurde das Myzel homogenisiert und in 4 ml kalten Histon-Extraktionspuffer (P3) überführt und kräftig gevortext. Anschließend erfolgte der Zellausschluss mittels Ultraschall (3 x für 10 sec.). Nach Zugabe von 4 ml frischer 0,4 M Schwefelsäure (H₂SO₄) wurden die Proben für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Präparation für 10 min. bei 1400 g und 4

°C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in eine neues 15 ml Greiner-Reaktionsgefäß überführt, mit 2,5 ml Methanol/Chloroform (1:1) versetzt und für 10 min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min. bei 1400 g und 4 °C wurden die Ober- und Unterphase vorsichtig abgegossen. Die Interphase wurde nun 4-5-mal mit 5 ml eiskalten 80%igem Aceton gewaschen. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur getrocknet und in 500 µl Roti-Load-Ladepuffer (375 µl H₂O und 125 µl Roti-Load, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen. Die Histone wurden für 5 min. bei 95 °C denaturiert.

3.8. Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

3.8.1. Standard PCR

DNA-Fragmente können mittels spezifischer Primer, einer Polymerase in einer PCR amplifiziert werden. Das Protokoll für eine Standard PCR ist in Tabelle 3 dargestellt. Die entsprechende Annealingtemperatur eines Primerpaares wurde mit Hilfe einer Gradienten-PCR ermittelt. Für eine Standard PCR wurde die Taq-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet, welche eine Elongationszeit von 1 kb pro Minute besitzt. Bei PCR Reaktionen, wo eine *proof-reading* Aktivität erforderlich war, wurde eine *hotstart* Phusion-Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) eingesetzt, welche eine Elongationszeit von 0,5 kb pro Minute aufweist (Tabelle 3).

Tabelle 3: Standard PCR mit Taq-Polymerase

Pipettierschema		PCR-Programm	T	Zeit	Zyklen
Pfu-Puffer	1 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
dNTPs	1 µl	Denaturierung	95 °C	45 sec	
Primer forward (10 pmol)	1 µl	Annealing	T _A °C	45 sec	x 34
Primer reverse (10 pmol)	1 µl	Elongation	72 °C	1000 bp/min	
Template	1 µl	Finale Elongation	72 °C	3 min	
Taq-Polymerase	0,1 µl	Pause	10 °C	∞	
H ₂ O	4,9 µl				

3.8.2. Kolonie PCR

Um Bakterienkolonien auf die erfolgreiche Integration eines Inserts zu überprüfen, wurde eine Kolonie PCR durchgeführt. Als Template wurde eine Bakterienkolonie von der Transformationsplatte gepickt und direkt im PCR-Ansatz gelöst. Die initiale Denaturierung wurde bei dieser PCR auf 5 min. erhöht (Tabelle 4).

Tabelle 4: Kolonie PCR mit Taq-Polymerase

Pipettierschema		PCR-Programm	T	Zeit	Zyklen
Pfu-Puffer	2 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	
dNTPs	2 µl	Denaturierung	95 °C	45 sec	
Primer forward (10 pmol)	1 µl	Annealing	T _A °C	45 sec	x 34
Primer reverse (10 pmol)	1 µl	Elongation	72 °C	1000 bp/min	
Taq-Polymerase	0,2 µl	Finale Elongation	72 °C	3 min	
H ₂ O	13,8 µl	Pause	10 °C	∞	
+ Bakterienkolonie					

3.8.3. Double Joint PCR

Um die Funktion einzelner Gene zu analysieren, wurden zunächst Deletionskonstrukte mittels DJ-PCR (Yu et al. 2004) erstellt, welche anschließend über homologe Rekombination in das Pilzgenom integriert werden. In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll genutzt, welches die zweite und dritte Teilreaktion in einer PCR zusammenfasst. Die Deletionskonstrukte bestehen jeweils aus einem etwa 1000 bp großen homologen 5´ und 3´ Bereich, welche einen Selektionsmarker (meist Hygromycin-Phosphotransferasegen (*hph*) oder Geneticin G418 (*nptII*)) flankieren. Dabei wurden die Primer so generiert, dass die 5´Flanke dem Promoterbereich und 3´Flanke dem Terminationsbereich des zu deletierenden Genes entspricht. Die Primer des Selektionsmarkers enthalten spezifische Überhänge, die zu den Überhängen der Flankenregionen komplementär sind. Dadurch können diese Überhänge in einem späteren Schritt korrekt fusionieren.

In der ersten PCR des Protokolls werden 5´ und 3´Flanke sowie der Selektionsmarker separat amplifiziert (Tabelle 5). Für die Amplifikation des Selektionsmarkers wurden nur 0,5 µl Plasmid als Template eingesetzt und der Ansatz entsprechend mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die einzelnen PCR Reaktionen wurde auf ein 1% iges TAE Gel aufgetragen und aus dem Gel eluiert. Mittels NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde die DNA-Konzentration bestimmt.

In der zweiten PCR wurden im ersten Teil der Reaktion die drei aufgereinigten Fragmente zusammengefügt. Bei diesem Reaktionsschritt wurden keine Primer benötigt, da die Fragmente aufgrund der spezifischen Überhänge basengenau paaren. Dabei wurden Selektionsmarker und Flanken im Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Im zweiten Reaktionsschritt wurde die komplette Deletionskassette mittels der *nested*-Primer amplifiziert (Tabelle 6). Anschließend wurde die DJ-PCR auf ein 1%iges TAE Gel

aufgetragen und die entsprechende Bande aus dem Gel eluiert. Aufgrund der *proof-reading* Aktivität wurde für alle PCR-Reaktionen die Phusion-Polymerase verwendet. Um ausreichend DNA (1-5 µg) für die Transformation in *C. graminicola* zu erreichen, wurden mehrere PCRs mit den *nested*-Primer durchgeführt, aufgereinigt und per NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemessen.

Tabelle 5: Amplifikation des Selektionsmarker und der Flanken

Pipettierschema		PCR-Programm	T	Zeit	Zyklus
HR-Puffer	10 µl	Vorheizen	98 °C	∞	
dNTPs	2 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Primer forward (10 pmol)	2 µl	Denaturierung	98 °C	30 sec	
Primer reverse (10 pmol)	2 µl	Annealing	T _A °C	30 sec	x 34
Template	2 µl	Elongation	72 °C	500 bp/min	
Phusion-Polymerase	0,5 µl	Finale Elongation	72 °C	3 min	
H ₂ O	31,5 µl	Pause	10 °C	∞	

Tabelle 6: DJ-PCR

Pipettierschema		PCR-Programm	T	Zeit	Zyklus
HR-Puffer	10 µl	Vorheizen	98 °C	∞	
dNTPs	2 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Selektionsmarker (120 ng)	X µl	Denaturierung	98 °C	30 sec	
5' Flanke (30 ng)	Y µl	Annealing	60 °C	30 sec	x 9
3' Flanke (30 ng)	Z µl	Elongation	72 °C	1 min	
Taq-Polymerase	0,5 µl	Pause	10 °C	∞	
Primer nested forward	2 µl	Denaturierung	98 °C	30 sec	
Primer nested reverse	2 µl	Annealing	59 °C	30 sec	x 34
H ₂ O	x µl	Elongation	72 °C	2 min	
		Finale Elongation	72 °C	5 min	
		Pause	10 °C	∞	

3.8.4. qPCR

Mittels qPCR wurde der Anteil an pilzlicher Biomasse von infiziertem Blattgewebe bestimmt. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach dem Protokoll von Weihmann et al. 2016.

3.8.5. DNA-Fällung

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde die DNA direkt aus dem PCR-Ansatz gefällt. Dieser wurde mit 3 Volumen 96%igem Ethanol und 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat versetzt. Anschließend wurde bei 13000 rpm (Sigma Zentrifuge 3-30KS, Rotor 335/H, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) für 30 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in H_2O_{bidest} gelöst.

3.9. Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Fragmentgröße wurde ein 1%iges TAE (≥ 500 bp) oder ein 2%iges TAE (≤ 500 bp) Gel verwendet (P13), welche in 1xTAE Puffer und einer Spannung von 100 V elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Allen Gelen wurde der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid zugesetzt, damit die DNA später unter UV-Licht sichtbar ist. Je nach Größe der Fragmente, wurden der 100 bp Marker oder 1 kb Marker (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) als Größenstandard aufgetragen.

Für die Gelelution wurden entsprechende DNA-Fragmente mittels Skalpell auf dem Gel ausgeschnitten und mit dem „NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit“ von der Firma Macherey und Nagel (Düren, Deutschland) aufgereinigt.

3.10. Untersuchung der Reversen Transkription

3.10.1. cDNA-Synthese

Die Synthese von RNA zu cDNA (complementary DNA) erfolgte mittels des „HMinus Kit First Strand cDNA Synthesis Kit“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Für die cDNA-Synthesereaktion wurden jeweils 200 ng isolierte und DNase- verdaute RNA eingesetzt (siehe 3.7.3.). Nach der Synthese wurde die cDNA sofort für weitere PCR-Analysen weiter verwendet.

3.10.2. Semiquantitative RT-PCR

Um die relative Menge an Transkripten einer spezifischen mRNA nachweisen zu können, behilft man sich der Reversen Transkriptions PCR (semiquantitative RT-PCR). Mit der reversen Transkriptase wurden geringe Mengen RNA in komplementäre Einzelstrang DNA umgeschrieben. Um die relative Menge an exprimierten Genen abzuleiten, wurde diese cDNA über PCR und spezifische Primer amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Proben in einem 2%igen TAE-Gel aufgetrennt. Als Größenstandard diente der „GeneRuler 100bp DNA Ladder“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland). Als Positivkontrolle wurde zum einen genomische DNA mitgeführt. Zum anderen wurde als konstitutiv exprimiertes Gen die Chitinsynthase II verwendet, welche als Standard publiziert ist (Horbach et al. 2009).

3.11. Sequenzierung

Die Sequenzanalysen erfolgten mit fluoreszenz-markierten ddNTPS nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et al. 1977. Die Sequenzierung wurde mit dem „ABI Prism377 Genetic Analyzer“ (Applied Biosystems, USA), durchgeführt. Ausgewertet wurden die Sequenzen mittels der Programme BioEdit und ClustalX. Die Sequenzierreaktion ist in Tabelle 7 dargestellt. Anschließend wurden die Proben wie in 3.8.5. beschrieben aufgereinigt. Jedoch wurde das Pellet nicht gelöst.

Tabelle 7: Sequenzieranalyse

Pipettierschema		PCR-Programm	T	Zeit	Zyklus
Ready-Reaktion Mix (5x)	2 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	
Primer (10 pmol)	2 µl	Denaturierung	94 °C	45 sec	
Plasmid-DNA (200-500 ng)	x µl	Annealing	T _A °C	45 sec	x 40
Big Dye Terminator (5x)	1 µl	Elongation	60 °C	4 min	
H ₂ O	Ad 10 µl	Pause	10 °C	∞	

3.12. Klonierung

3.12.1. Erzeugung zu klonierender DNA

Alle benötigten DNA-Fragmente wurden mittels PCR generiert. Deletionskassetten für die spätere Transformation in *C. graminicola* wurden mit Hilfe der DJ-PCR amplifiziert (3.8.3.).

Alle synthetisierten Fragmente wurden über Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgereinigt.

3.12.2. Ligation

Mit Hilfe des „GeneJET PCR Cloning Kit“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) erfolgte die Ligation der aufgereinigten DNA-Fragmente in den pJET1.2 Vektor. Ein Ligationsansatz enthielt 25 ng Vektor, 75 ng zu klonierende DNA, 0,5 µl T4 Ligase und 5 µl 2x Reaktionspuffer und wurde mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Anschließend erfolgte eine 20 minütige Inkubation bei Raumtemperatur.

3.12.3. Transformation in *E.coli*

5 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl chemisch kompetenter *E.coli* DH5α-Zellen (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gegeben und für 20 min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad und eine 2 minütige Inkubation auf Eis. Die Transformationsansätze wurden mit 200 µl flüssigem LB-Medium (M9) versetzt und für 1 h bei 37 °C und 200 rpm auf einem Schüttler (Orbitron, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Nach Regeneration der Zellen wurden die Bakterien auf LB-Agar (M8) mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (3.8.2.).

3.12.4. Klonierung mittels „Quick Change II XL Site Directed Mutagenesis Kit“

Für die Erzeugung gezielter Mutationen in doppelsträngigen Plasmiden wurde das „Quick Change II XL Site Directed Mutagenesis Kit“ von der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA) verwendet. Die Primer dieses PCR basierenden Verfahrens wurden nach den Angaben des Herstellers designet. Reaktionsansätze und PCR-Programm wurden ebenfalls nach Herstellerangaben angewandt (Tabelle 8). Für alle erzeugten Mutanten wurde die HP1-GFP Fusionskassette verwendet, welche als Selektionsmarker Geneticin (G418) enthält (siehe Abbildung 13A).

Tabelle 8: PCR-Reaktion des „Quick Change II XL Site Directed Mutagenesis Kit“

Pipettierschema		PCR-Programm	T	Zeit	Zyklus
HR-Puffer x Reaktionspuffer	5 µl	Vorheizen	95 °C	∞	
dsDNA Template (10 ng)	x µl	Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	
Primer forward (125 ng)	x µl	Denaturierung	95 °C	50 sec	
Primer reverse (125 ng)	x µl	Annealing	60 °C	30 sec	x 18
dNTP Mix	1 µl	Elongation	78 °C	1kb/min	
QuickSolution	3 µl	Finale Elongation	68 °C	7 min	
<i>Pfu Ultra</i> HF DNA Polymerase	2 µl	Pause	10 °C	∞	
ddH ₂ O	Ad 50 µl				

Um Template-DNA zu eliminieren, wurden die amplifizierte Produkte für 1 h bei 37 °C mit *DpnI* verdaut. Es erfolgte eine Transformation in *XL10 Gold* ultrakompetente Zellen. Dazu wurden 45 µl dieser Zellen in ein steriles 14 ml Röhrchen überführt, mit 2 µl β-ME-Mix versetzt und alle 2 min. gemischt. Dies geschah über einen Zeitraum von 10 min. Abweichend vom Protokoll wurden 5 µl des *DpnI*-Verdau zu den kompetenten Zellen gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad, mit anschließender Inkubation auf Eis für 2 min. 500 µl SOC-Medium (M10) wurden mit dem Transformationsansatz versetzt und für 1 h bei 37 °C und 250 rpm auf einem Schüttler (Orbitron, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Nach dem Ausplattieren auf festem LB-Agar (M8) mit entsprechendem Selektionsmarker wurden die Platten bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

3.13. Massenspektrometrie

3.13.1. DNA-Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurde genomische DNA nach dem Protokoll von Döbbeling et al. 1997 isoliert (siehe 3.7.1.). Die massenspektrometrische Quantifizierung der gesamten 5-MeC-Methylierung in *C. graminicola* erfolgte in Kooperation mit dem Labor von C. Ihling und A. Sinz vom Institut für Pharmazie (MLU, Halle).

3.13.2. Histon-Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie von Histonen, wurden diese nach dem Protokoll von Houben et al., 2003 isoliert (siehe 3.7.4.). Die Histon H3 Bande wurde ausgeschnitten und die

massenspektrometrische Quantifizierung des Histon H3 erfolgte in Kooperation mit dem Labor von A. Imhof aus München (LMU-Ludwig Maximilians Universität München).

3.14. Transformation in *Colletotrichum graminicola*

Die Transformation in *Colletotrichum graminicola* erfolgte nach dem Protokoll von Werner et al. 2007, welches sich im Wesentlichen nach dem Protokoll von Epstein et al. 1998 richtete.

3.14.1. Sporengewinnung

Für die Sporengewinnung wurden 300 ml Sporulationsmedium (M4) mit 100 µl *C. graminicola* Sporensuspension angeimpft und für 3 Tage auf einem Taumelschüttler (50 rpm, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) gestellt. Anschließend wurde das Medium für 5 weitere Tage ohne Bewegung und bei Raumtemperatur inkubiert. Am Tag der Transformation erfolgte mittels Filtration durch 2 Lagen Nessel Tuch (Miracloth, Merck Millipore, USA) das Ernten der Sporen. Durch etappenweises Zentrifugieren (2500 rpm, 10 min., 4 °C, Sigma Zentrifuge 3K15, Rotor 19776-H, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) des Filtrats wurden die Sporen pelletiert.

3.14.2. Protoplastierung

Das Sporenpellet wurde in 20 ml Protoplastierungspuffer (P11) aufgenommen und für 3 – 4 h bei 30 °C und 70 rpm (Schüttelinkubator, Multitron Standard, Infors HT, Bottmingen, Schweiz) inkubiert. Die Kontrolle der Protoplastierung erfolgte mittels Mikroskop. Zur Protoplastengewinnung wurde die Suspension für 10 min. zentrifugiert (1200 rpm, 4 °C, Sigma Zentrifuge 3K15, Rotor 19776-H, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml STC (L3) erneut für 10 min. zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde anschließend in 1 ml STC aufgenommen, aliquotiert (100-200 µl) und auf Eis gelagert.

3.14.3. Transformation

Für die Transformation wurden 1 – 5 µg DNA zu 100-200 µl Protoplasten gegeben und für 30 min. auf Eis inkubiert. Um die Stabilität des STC nicht zu gefährden, ist darauf zu achten, dass maximal 50 µl DNA auf 200 µl Protoplasten eingesetzt werden dürfen. Die Transformationsansätze wurden mit 1 ml eiskalter PEG-Lösung (L5) versetzt, durch leichtes Rollen gemischt und für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden

anschließend mit 3-4 ml flüssigem Regenerationsmedium (50 °C) (M6) versetzt, gerollt und auf festem Regenerationsmedium (M5) mit Selektionsmarker ausplattiert. Bei dieser Transformation wurden 2 Kontrollen ohne DNA mitgeführt. Die Negativ-Kontrolle wurde auf Medium mit Selektionsmarker ausplattiert, um die Effektivität des Selektionsmarker zu testen. Als Positiv-Kontrolle wurden Protoplasten auf Regenerationsmedium ohne Selektionsmarker gegeben, um die Vitalität zu testen. Diese Platten sollten nach 1-2 Tagen komplett mit Pilzmyzel bewachsen sein. Die Kultivierung der Transformationsplatten erfolgte bei Raumtemperatur. Nach 4 – 6 Tagen sollten Kolonien auf den Platten sichtbar werden. Diese wurden gepickt und auf OMA-Platten (M1) überführt. Um sicherzustellen, dass es sich um genetisch voneinander getrenntes Pilzmaterial handelt, wurden Einzelsporisolate angefertigt.

3.15. Southern Blot

3.15.1. Restriktionsverdau und Gelelektrophorese

Für die enzymatische Restriktion wurde zunächst DNA aus *C. graminicola* isoliert (3.7.1.) und die Konzentration bestimmt. Für den Verdau wurden je 5 µg Pilz-DNA eingesetzt und mit 5 U Restriktionsenzym nach Angaben des Herstellers über Nacht verdaut (Tabelle 9).

Tabelle 9: Pipettierschema des Restriktionsverdau

Reagenz	eingesetztes Volumen	Stammkonzentration
DNA	x µl	5 µg
Reaktionspuffer	5 µl	10 x
Restriktionsenzym	1 µl	5 U
H ₂ O	ad 50 µl	

Am nächsten Tag wurden die Verdauansätze mit 5x Stop-Puffer (P12) versetzt, auf ein 1%iges TAE Gel aufgetragen und über Nacht bei 18 V aufgetrennt. Am darauffolgenden Tag wurde das Gel unter UV – Licht dokumentiert.

3.15.2. Kapillartransfer

Damit die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgespalten wird, erfolgte eine 30 minütige Inkubation in Denaturierungspuffer (P7). Anschließend wurde das Gel kurz in Wasser gespült und dann für weitere 30 Minuten in Neutralisierungspuffer geschwenkt (P8). Nach diesem Schritt schloss sich der aufwärtsgerichtete Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) an

(Abbildung 1). Durch das aufgelagerte Filterpapier auf das Gel und der Membran entsteht aufgrund der Kapillarkräfte ein Flüssigkeitsstrom, der die denaturierten DNA-Fragmente auf die Membran überträgt. Alle Filterpapiere (Whatmann 3MM, Göttingen, Deutschland) und die Membran wurden vorher in Transferpuffer, 20 x SSC (P9), gewässert. Das Blotting des Gels erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde die DNA mittels UV-Stratalinker (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, San Diego, Kalifornien, USA) kovalent mit der Membran verknüpft.

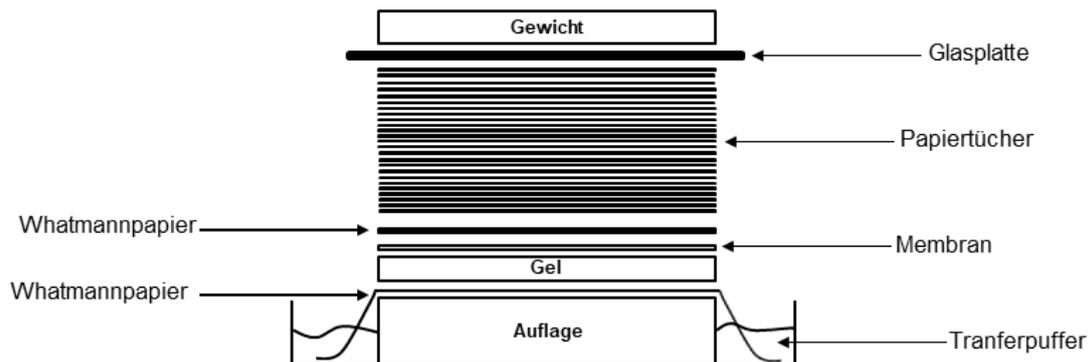


Abbildung 1: Aufbau des aufwärtsgerichteten Southern Blots (eigene Darstellung).

3.15.3. Herstellung und Markierung radioaktiv markierter Sonde

Die Sonde für die Hybridisierung wurde mittels Phusion-PCR amplifiziert, aus dem Gel eluiert und mittels „Deca Label DNA Labeling Kit“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) radioaktiv markiert. Dazu wurden 100 ng Sonden-DNA eingesetzt und mit α - ^{32}P -dATP markiert. Die weiteren Schritte der Markierung erfolgten nach dem Herstellerprotokoll. Bevor die Sonde auf die Membran gegeben wurde, erfolgte das Entfernen von nicht eingebauten α - ^{32}P -dATPs. Dazu wurde der komplette Sondenansatz auf eine ProbeQuant G50 Micro Säule gegeben (illustra Probe Quant G-50 Micro Columns, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) und für 2 min. bei 10000 rpm (Eppendorf Zentrifuge Mini Spin, Rotor F-45-12-11, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Anschließend wurde die Sonde bei 95 °C für 5 min. denaturiert.

3.15.4. Hybridisierung

Um unspezifische Bindungen auf der Membran abzudecken, erfolgte die Prähybridisierung mit Hybridisierungspuffer (High Efficiency Hybridisation System, Molecular Research Centre, Cincinnati, Ohio, USA) für 1 h bei 65 °C. Anschließend wurde die denaturierte Sonde in den Hybridisierungspuffer gegeben und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am

darauffolgenden Tag wurden überschüssige Sondenmoleküle mittels Waschpuffer (P10) von der Membran entfernt. Die Membran wurde anschließend in Frischhaltefolie gewickelt und mit einem Film in der Filmkassette über Nacht inkubiert. Der Film wurde am nächsten Tag mit dem Phosphorimager (FLA-3000, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) entwickelt.

3.16. Western Blot

Um Proteine gelelektrophoretisch aufzutrennen, verwendet man SDS-Proteingele. Die präparierten Histone (3.7.4.) wurden mit Roti-Load-Ladepuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, 5 min. bei 95 °C denaturiert und für 2 min. bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge Mini Spin, Rotor F-45-12-11, Hamburg, Deutschland) abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet. Je nach Bedarf wurden Fertiggele (NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel in NuPAGE® MES SDS RunningBuffer, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder selbstgegossene 15%ige Gele (in 1x ELPHO-Puffer (P4)) verwendet (Tabelle 10). Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA für etwa 1,5 – 2 Stunden, bis die Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

Tabelle 10: Pipettierschema für ein 15%iges SDS-Proteingel

Trenngel		Sammelgel	
Reagenz	eingesetztes Volumen	Reagenz	eingesetztes Volumen
H ₂ O	2,3 ml	H ₂ O	1,4 ml
30% Acrylamid	5 ml	30% Acrylamid	330 µl
1,5 M Tris 8,8	2,5 ml	1,5 M Tris 6,8	250 µl
10% SDS	100 µl	10% SDS	20 µl
APS	100 µl	APS	20 µl
TEMED	4 µl	TEMED	2 µl

Das Trenngel wurde mit Isopropanol (2:1) überschichtet, um eine gerade Abschlußkante für das Sammelgel zu erhalten.

Der Aufbau des Tank-Blots sah von der Kathode zur Anode wie folgt aus: 2 Schwämme, 2x Whatman-Papier, Proteingel, die Nitrozellulosemembran (Whatman® Protran® Nitrocellulose Transfer Membrane, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), 2x Whatman-Papier und 2 Schwämme. Alle Komponenten besaßen die Größe des Proteingels. Der Transfer erfolgte in Blotpuffer (P5) für 1:10 h bei 150 mA im Kühlraum. Nach dem Transfer wurde die

Membran für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler (50 rpm, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) mit 3% BSA (in 1x TBST gelöst (P6)) geblockt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (1:1000), welcher in 3% BSA verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf dem Taumelschüttler (50 rpm, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) inkubiert wurde. Die Membran wurde 3-mal für 15 min. mit 1xTBST (P6) bei Raumtemperatur gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (in 3% BSA gelöst 1:1000) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit 1xTBST (P6) erfolgte die Entwicklung der Membran. Dazu wurde das ECL-Western Kit (Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und entwickelt. Alternativ wurde zur Entwicklung der Membran 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.17. Immunozytologische Färbungen

3.17.1. Antikörperfärbung von Histonmodifikationen

Für die Antikörperfärbung wurden Konidien mittels einer Impföse von einer OMA-Platte (M1) abgekratzt, in 40 µl 4%iges Formaldehyd (gelöst in 1xPBS (L6)) überführt und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sporensuspension wurde auf einen polylysinieren Objektträger (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gegeben, ein Deckgläschen aufgelegt und zwischen Whatman-Papier gequetscht. Um die Konidien zu öffnen, wurde das Präparat mittels eines Bleistiftes angeschlagen. Der Objektträger wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Deckgläschen mit einer Rasierklinge abgesprengt. Der Objektträger wurde für 15 min. in 1xPBS (L6) auf dem Taumelschüttler (50 rpm, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau, Deutschland) inkubiert. Es schloss sich ein weiterer 30 minütiger Inkubationsschritt in 30 µl 3%igem BSA (in 1xPBS gelöst) bei 37 °C an. Dazu wurde das BSA auf Parafilm oder Plastikstreifen gegeben, der Objektträger top-down aufgelegt und in einer feuchten Kammer inkubiert. Dieser Schritt dient dem Blocken, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken. Danach wurde der primäre Antikörper (15 µl) in 3% BSA (1:100, siehe 8.12.) verdünnt und top-down auf die

Objektträger aufgetragen. Bei 4 °C erfolgte eine Inkubation über Nacht. Anschließend wurde das Präparat für 15 min. bei Raumtemperatur in 1xPBS gewaschen. Der sekundäre Antikörper (1:100), an dem ein Alexa-Farbstoff (Alexa 488 oder Alexa 555, siehe 8.12.) gekoppelt war, wurde in 1xPBS (L6) verdünnt und 15 µl top-down auf den Objektträger gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde das Präparate erneut für 15 min. in 1xPBS (L6) gewaschen, mit 20 µl DAPI (L4) versehen und mit Nagellack versiegelt.

3.17.2. 5-Methylcytosin-Färbung

Für die 5-Methylcytosinfärbung wurden Konidien entsprechend 3.17.1. präpariert. Nach einer kurzen Inkubation in flüssigem Stickstoff wurden 25 µl Denaturierungspuffer (P15) auf das Präparat gegeben. Es folgte eine Inkubation auf einer Heizplatte für 3 min. bei 80 °C. Das Präparat wurde danach sofort in eiskaltes 1xPBS getaucht und für 10 min. inkubiert. In einer feuchten Kammer erfolgte die Präinkubation der Präparate für 30 min. bei 37 °C mit 3% BSA gelöst in 1xPBS (L6). Über Nacht inkubierte der primäre Antikörper (1:100, (siehe 8.12.) verdünnt in 3% BSA (in 1xPBS (L6) gelöst) bei 4 °C. Es schloss sich ein 15 minütiger Waschschrift in 1xPBS (L6) an. Anschließend wurde das Präparat mit dem sekundären Antikörper (1:100, Alexa 488 oder Alexa 555, siehe 8.12.), welcher in 1xPBS (L6) verdünnt wurde, bei 37 °C für 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift von 15 min. in 1xPBS (L6) bei Raumtemperatur wurden 20 µl DAPI (L4) auf den Objektträger gegeben und mit Nagellack versiegelt.

3.18. Infektionsstudien und Mikroskopie

3.18.1. Einstellung der Konidienkonzentration

Von eine 10-14 Tage alten OMA-Platte (M1) wurde mit 10 µl H₂O_{dest} *C. graminicola*-Konidien unter sterilen Bedingungen abgeschwemmt und 100fach verdünnt. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte unter dem Mikroskop durch Auszählen der Konidien mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Laboroptik, Friedrichsdorf, Deutschland). Für die Inokulation wurde eine Suspension von 1x10⁶ Konidien/ml verwendet, welche in H₂O + 0,02% (v/v) Tween 20 aufgenommen wurde.

3.18.2. Blattsegmentassay

Für den Blattsegmentassay wurde vom 2. Folgeblatt einer 14 Tage alten Maispflanzen ein 8-10 cm langes Segmente auf Filterpapier (Rotilabo®-Rundfilter, Carl Roth GmbH,

Karlsruhe, Deutschland) mittels Klebeband fixiert. Die Inokulation der Blattsegmente erfolgte mit je 6 Tropfen à 10 µl der entsprechenden verdünnten Konidiensuspension. Die Inkubation der Blattsegmente erfolgte in quadratischen Petrischalen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) bei 23 °C im Dunkeln. Zusätzlich erfolgte eine Inkubation von Maisblattsegmente nur mit H₂O + 0,02% Tween 20. Zur Dokumentation des Schadbildes wurden bis zum siebten Tag nach der Inokulation die Symptome fotografiert.

Für die Probengewinnung zur genomweiten RNA-Sequenzierung, wurden jeweils 30 Tropfen mit den darin enthaltenen Konidien nach 48 h mit Hilfe eines Korkbohrers ausgestochen und bei -80 °C gelagert. Die Isolation der RNA erfolgte wie in 3.7.3. beschreiben.

3.18.3. Zwiebelinfektionen

Auf 1,5%igem Wasser-Agar (M7) wurden Zwiebelepidermen (1x1 cm) mit Hilfe von Lanzettadel und Pinzette fixiert. Die Inokulation erfolgte jeweils mit 10 µl einer Konidiensuspension (verdünnt in H₂O + 0,02% Tween 20). Die Zwiebelpräparate wurden bei 23 °C im Dunkel inkubiert und zum gewünschten Zeitpunkt (1-6 dpi) mikroskopiert.

3.18.4. Anfärben und Auszählen von Infektionsstrukturen

Um den Infektionsverlauf des Pilzes in infizierten Maisblättern zu verfolgen, wurde Blattgewebe angefärbt und ausgezählt. Für diese histologischen Untersuchungen wurde Anilinblau verwendet. Dieser Farbstoff färbt Pilzhyphen an, da diese aus dem β-1,3-Glucan, bestehen. Bevor die Proben angefärbt wurden, wurden Maisblattsegmente nach 1-6 dpi geerntet und in Entfärbelösung (L7) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nachdem die Blätter vollständig entfärbt waren, wurden die Blattsegmente in 0,025%iger Anilinblaulösung (L9) überführt und für 2-3 h inkubiert. Die angefärbten Blätter wurden in Wasser gespült und bis zur Mikroskopie in 50%igem sterilem Glycerol aufbewahrt. Für die Quantifizierung der Infektionsstrukturen wurden jeweils 100 Strukturen von drei verschiedenen Infektionsansätzen ausgezählt. Mittels T-Test wurden die Ergebnisse auf Signifikanz überprüft.

3.18.5. Lichtmikroskopie von infiziertem Blattmaterial (Semi-Dünnschnitte)

Für die Lichtmikroskopie (Hellfeld-Aufnahmen) wurden infizierte Blattsegmente für 4 Stunden mit 3% Glutaraldehyd fixiert (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), mit 0,1 M Natriumcacodylatpuffer pH 7,2 gewaschen und für 1 Stunde mit 1% Osmiumtetroxid nachfixiert in SCB (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend wurden die

Präparate in einer abgestuften Ethanol-Reihe (10, 30, 50, 70, 90 und 2 mal 100% für je 30 min) dehydriert und in Epoxidharz gemäß nach Spurr 1969 eingebettet.

Die Semi-Dünnschnitte (1 μm) wurden mit 0,1% wässrigem Toluidinblau gefärbt. Die Bilder wurden mit einem Axioskop 20 Lichtmikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) mit einer AxioCam MRc Kamera (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) aufgenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Chromatinorganisation in Interphasekernen von *Colletotrichum graminicola*

Die Organisation des Heterochromatins in Interphasekernen kann mittels DAPI- oder Hoechst Färbung analysiert werden. Dabei können drei verschiedene Typen von Heterochromatinorganisation unterschieden werden. Der diffuse Typ, der Gradiententyp und der Chromozentrentyp (Fukui & Nakayama 1996). Häufig ist Heterochromatin in Interphasenkernen nach DAPI Färbungen als stark angefärbte Chromozentren zu erkennen, während das schwächer anfärbbare Euchromatin uniform im Zellkern verteilt ist (Abbildung 2). Die Interphasekerne von *N. crassa* weisen eine eher diffuse Verteilung von Heterochromatin auf. Meist sind nur ein bis zwei Chromozentrenbereiche sichtbar. Im Gegensatz dazu ist bei *C. graminicola* das Chromatin im Interphasekern in Chromozentren organisiert und Heterochromatin ist deutlich sichtbar (Abbildung 2). Die Bildung gut definierter heterochromatischer Chromozentren in Interphasekernen bei *C. graminicola* stellt einen wichtigen experimentellen Vorteil für epigenetische Analysen dar.

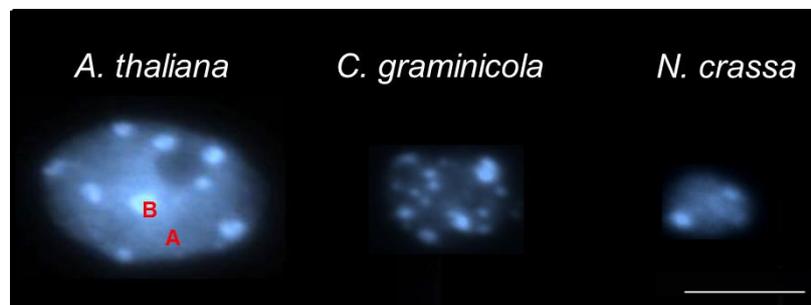


Abbildung 2: Interphasechromatin in verschiedenen Organismen. *A. thaliana* und *C. graminicola* weisen eine Chromozentren-Organisation des Chromatins auf, welches in (A) Eu- und (B) Heterochromatin unterteilt ist. Maßstab = 5 µm.

Um einen Überblick über die Chromatinorganisation in Interphasekernen bei Pilzen zu erhalten, wurden insgesamt 19 verschiedene Pilzarten analysiert. Die untersuchten Arten umfassten unter anderem Ascomyceten der Klassen Sordariomycetes, Leotiomycetes, Dothideomycetes, Eurotiomycetes und Saccharomycotina, sowie dem Basidiomycet *Ustilago maydis*. Zusätzlich wurde der Oomycet *Phytophthora infestans* auf seine Chromatinorganisation in Interphasekernen analysiert (Anhang 8.1.). Die DAPI Färbungen der Interphasekerne zeigen nur bei *C. graminicola* und *L. maculans* eine Chromozentren-

Organisation des Heterochromatins. In den Zellkernen von *C. graminicola* sind mehr als 10 deutlich abgegrenzte Chromozentren zu erkennen, welche mit der Chromosomenzahl von 13 gut korreliert. *L. maculans* hat 16 Chromosomen und in den DAPI Färbungen werden zwischen 12 und 16 Chromozentren gefunden (Abbildung 3). In den Zellkernen von *C. higginsianum*, *N. crassa*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum* und *B. cinerea* sind die Chromozentren weniger deutlich ausgebildet (Abbildung 3). Interphasekerne von *R. oryzae* und *V. albo-atrum* weisen eine diffuse Verteilung von Heterochromatin auf. Große intensiv gefärbte Chromatinbereiche in den Interphasekernen von *Y. lipolytica* weisen auf eine Gradiententyp-Organisation des Heterochromatins hin (Abbildung 3).

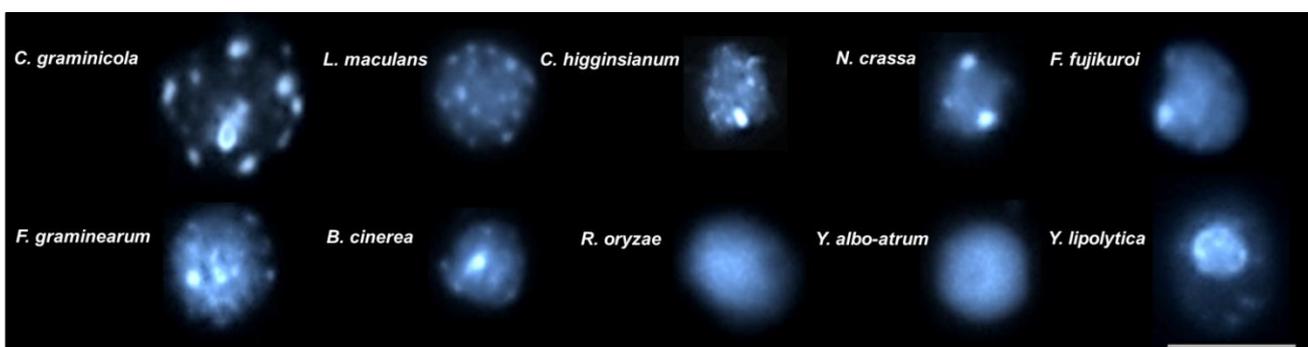


Abbildung 3: Organisation von Heterochromatin in Interphasekernen verschiedener Ascomyceten. *C. graminicola*, *L. maculans*, *C. higginsianum*, *N. crassa*, *F. fujikuroi*, *F. graminearum* und *B. cinerea* weisen eine Chromozentren-Organisation auf. In Interphasekernen von *R. oryzae* und *Y. albo-atrum* wird eine diffuse Verteilung von Heterochromatin beobachtet, während *Y. lipolytica* eine Gradiententyp-Organisation besitzt. Interphasekerne wurden mit DAPI angefärbt. Maßstab = 5 µm.

Aufgrund der Chromozentren-Organisation des Interphasekerns ist bei *C. graminicola* die differentielle Modifizierung der Histone im Eu- und Heterochromatin besonders gut zytologisch analysierbar. Mittels spezifischer Antikörper wurden bei *C. graminicola* insgesamt 28 verschiedene Modifikationen für eu- und heterochromatische Bereiche am Histone H3 und H4 analysiert (Abbildung 4). H3K9me3, H3K27me1, H3K27me2 und H3K64me3 sind Histonmodifikationen, die das perizentrische Heterochromatin markieren. H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3, H3K27me3, H3K36me1, H3K36me2 und H3K36me3, sowie die Acetylierungsmodifizierungen H3K9ac, H3K14ac, H3K18ac, H3K23ac, H3K27ac und H3K64ac sind im Euchromatin lokalisiert. Histonmodifizierungen am Histon H4 zeigen, dass H4K5ac, H4K8ac, H4K12ac, H4K16ac, sowie H4K20me2 und H4K20me3 euchromatische Bereiche markieren, während H4K20me1 im Heterochromatin zu finden ist.

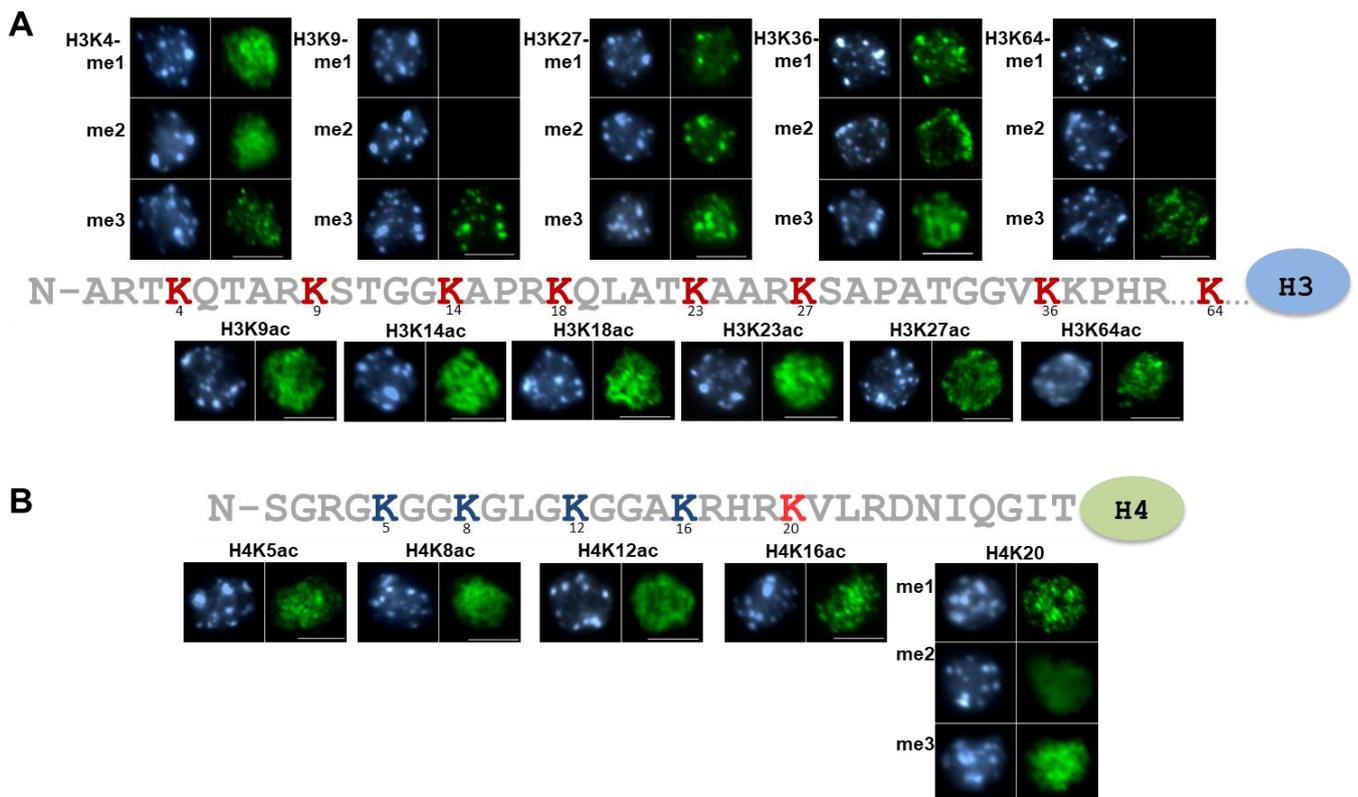


Abbildung 4: Immunozytologische Analyse verschiedener Histonmodifikationen in Interphasekernen von *C. graminicola*. Insgesamt wurden 28 verschiedene Modifikationen für eu- und heterochromatische Bereiche am **(A)** Histon H3 und **(B)** Histon H4 untersucht. Maßstab = 5µm.

Eine H3K9me3 Färbung in Interphasekernen von *C. graminicola* ist in den Chromozentren deutlich sichtbar und stimmt mit der DAPI Färbung überein, während H3K9ac in euchromatischen Bereichen detektiert wird (Abbildung 5A+B). Auch die anderen analysierten Pilzarten weisen klare im Heterochromatin lokalisierte Foci für H3K9me3 auf (Abbildung 5A und Anhang 8.1.). Eine Ausnahme bildet *S. cerevisiae*. In diesem Organismus ist immunozytologisch keine Trimethylierung von H3K9 nachweisbar (Anhang 8.1.).

In den Interphasekernen von *C. graminicola* wird nur eine Trimethylierung des Lysin 9 im Histon H3 detektiert. H3K9me1 und H3K9me2 konnten immunozytologisch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 5A). In Western Blot Analysen konnte ebenfalls nur H3K9me3 nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der Immunozytologie bestätigt (Abbildung 5C). Massenspektrometrische Analysen vom Histon H3 zeigen bei *C. graminicola* eine sehr geringe Menge an H3K9me1 und H3K9me2. Insgesamt 18,1% von H3 zeigen eine H3K9 Trimethylierung (Abbildung 5D). In der nahe verwandten *Colletotrichum*-Art *C. higginsianum*, wurde auch nur Trimethylierung von H3K9 immunozytologisch nachgewiesen (Anhang 8.1.). Weitere analysierte Ascomyceten, wie

Fusarium fujikuroi und *Neurospora crassa* zeigen ebenfalls keine H3K9 Mono- und Dimethylierung (Abbildung 5A). Interessanterweise können in dem Oomyceten *Phytophthora infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei der Kartoffel, alle drei Stufen von H3K9 Methylierung detektiert werden (Abbildung 5A). In allen analysierten Pilzen wird H3K9ac im Euchromatin nachgewiesen (Anhang 8.1.).

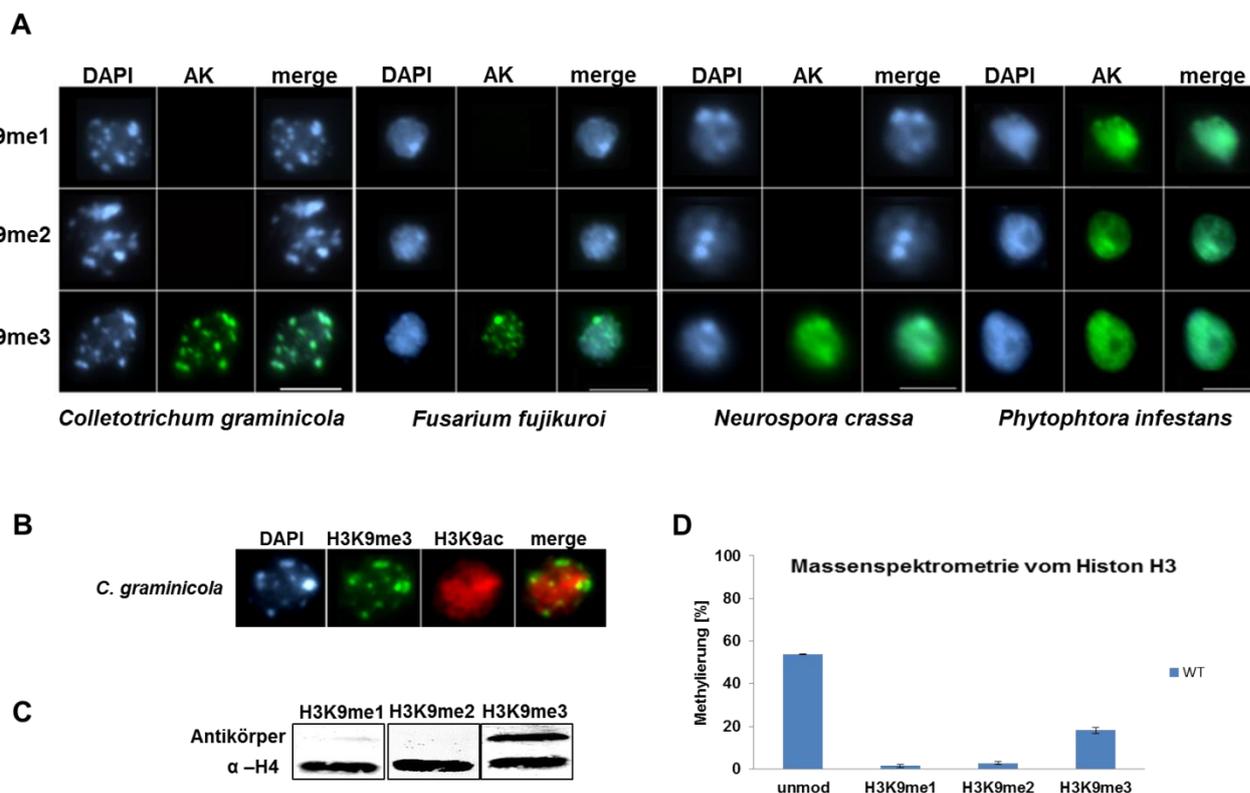


Abbildung 5: Verteilung von Heterochromatin und H3K9me3 Methylierung in Interphasekernen von *C. graminicola* und verschiedenen Pilzen. (A) Ascomyceten weisen immunozytologisch keine Mono- und Dimethylierung von H3K9 auf. Beim Oomyceten *P. infestans* sind alle Stufen von H3K9 Methylierung detektierbar. **(B)** H3K9me3 und H3K9ac Doppelfärbung eines Interphasekerns von *C. graminicola*. **(C)** Western Blot und **(D)** Massenspektrometrie (in Kooperation mit A. Imhof) zeigt eine H3K9me3 bei *C. graminicola*. Maßstab = 5 μ m.

Die Chromozentren-Organisation von Heterochromatin in Interphasekernen ermöglicht bei *C. graminicola* die differentielle Analyse von Histonmodifizierungen im Eu- und Heterochromatin. Die übersichtliche, gut analysierbare Chromatinorganisation von *C. graminicola* ist somit ein wesentlicher experimenteller Vorzug für die funktionelle Analyse von Faktoren, die in die Bildung von Heterochromatin involviert sind.

4.2. Epigenetische Faktoren für den Aufbau von Heterochromatin in *C. graminicola*

Um epigenetische Faktoren zu identifizieren, die die Bildung von Heterochromatin kontrollieren, wurden vergleichende Analysen der genomischen Sequenzen von *C. graminicola* mittels BLAST durchgeführt. Es konnten 13 homologe Gene identifiziert werden, die bereits aus anderen Organismen, wie *N. crassa* oder *D. melanogaster* als epigenetischer Faktor bekannt sind (Tabelle 11). Bei *C. graminicola* wurden Proteine identifiziert, die eine putative SET- Domäne enthalten. Der prominenteste Vertreter dieser Klasse ist SU(VAR)3-9, das bei *N. crassa* und *C. graminicola* dem DIM5 Protein entspricht. Die Histonmethyltransferase E(Z), die bei *Drosophila* die Methylierung am Lysin 27 katalysiert, wurde auch bei *C.graminicola* gefunden (Sequenzalignement Anhang 8.2.). Chromo Domänen Proteine, wie das Heterochromatin Protein 1 (HP1) oder Polycomb wurden erstmals in *Drosophila* beschrieben. Bei *C. graminicola* existieren 7 Chromo Domänen-Proteine. Das Protein GLRG_05406 ist homolog zum HP1 von *Drosophila* und *N. crassa*. Zusätzlich wurden Sequenzhomologien zu DIM2, der DNA-Methyltransferase (CgDIM2-1) von *N. crassa* und RID (CgDIM2-2), einem Protein, welches in *N. crassa* an RIP (*repeat induced point mutation*) beteiligt ist, gefunden.

Tabelle 11: Epigenetische Kontrollfaktoren für den Aufbau von Heterochromatin bei *C. graminicola*.

Protein	Putative Funktion
DIM7	Cofaktor für Histonmethyltransferase DIM5
DIM5	H3K9 Histonmethyltransferase
DIM2-1	DNA-Methyltransferase
DIM2-2	DNA-Methyltransferase (RID Homolog)
HP1	Heterochromatin Protein 1
E(Z)	H3K27 Histonmethyltransferase
LSD1	Histondemethylase
GLRG_03725	SET-Domän Protein
GLRG_07715	SET-Domän Protein
GLRG_09836	nicht charakterisiertes Protein
GLRG_08077	Chromo Domän Protein
GLRG_11497	Chromo Domän Protein
JIL1-1	putative Serin/Threonin Phosphatase
JIL1-2	putative Serin/Threonin Phosphatase

Für die funktionelle Charakterisierung der gefundenen epigenetischen Kontrollfaktoren wurden mittels homologer Rekombination Knockout-Mutanten erzeugt (Tabelle 11). Zunächst erfolgte eine Fokussierung auf die Schlüsselfaktoren der Heterochromatinbildung, wie den H3K9 und H3K27 KMTasen CgDIM5 und CgE(Z), den DNA-Methyltransferasen CgDIM2-1, CgDIM2-2, sowie der Doppelmutante CgDIM2-1CgDIM2-2, dem Heterochromatin Protein 1 (CgHP1) und CgDIM7, einem Cofaktor von DIM5.

4.2.1. Die CgDIM5 Histonmethyltransferase kontrolliert H3K9me3 bei *C. graminicola*

Die Histonmethyltransferase CgDIM5 ist ein 338 Aminosäure großes SET- Domänen Protein. Im N-terminalen Bereich befindet sich die pre-SET Domäne und am C-terminalen Ende des Proteins die post-SET Domäne. Beide Domänen werden für die enzymatische Aktivität und Substraterkennung des Proteins benötigt (Abbildung 6A). Über homologe Rekombination wurden fünf unabhängige Knockout-Mutanten erzeugt (Mickel 2010). Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass in diesen Deletionsmutanten kein Transkript für *CgDIM5* synthetisiert wird (Abbildung 6B). Wachstumsanalysen ergaben, dass die $\Delta dim5$ Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp ein erheblich reduziertes Wachstum aufweisen (Mickel 2010).

Bei Interphasekernen aus Konidien und Hyphen von *C. graminicola* wird nur H3K9 Trimethylierung im Heterochromatin nachgewiesen. Unter der Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen diese Modifikation wurde in $\Delta dim5$ H3K9me3 immunozytologisch, durch Western Blot Analysen und mittels Massenspektrometrie analysiert (Abbildung 6C-E). Im Vergleich zum Wildtyp, in dem ein starkes Signal im Chromozentren-Heterochromatin detektiert werden konnte, ist in $\Delta dim5$ keine H3K9 Trimethylierung immunozytologisch nachweisbar (Abbildung 6C). Die Quantifizierung mittels Western Blot bestätigt den Verlust von H3K9me3. Als Kontrolle diente das Histon H4 (Abbildung 6D). Auch in der Massenspektrometrie sind in der Deletionsmutante nur sehr geringe Mengen (0,26%) trimethyliertes Lysin 9 zu messen, während im Wildtyp 18,1% H3K9me3 Methylierung nachweisbar ist (Abbildung 6E).

Bei *C. graminicola* wird 5-Methylcytosin immunozytologisch primär in heterochromatischen Chromozentren nachgewiesen (Abbildung 6F). Ein Verlust von 5-Methylcytosin in $\Delta dim5$ verdeutlicht, dass die DNA-Methylierung von der H3K9-Trimethylierung abhängig ist. In der Massenspektrometrie wurden diese Ergebnisse bestätigt. Im Wildtyp sind 1,16% aller

Cytosine methyliert, während in der $\Delta dim5$ Deletionsmutante nur noch 0,06% detektiert werden.

Der Knockout von CgDIM5 belegt, dass dieses Protein die einzige H3K9me3 KMTase bei *C. graminicola* ist. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen auch, dass DIM5-abhängiges H3K9me3 essentiell für die Etablierung der DNA-Methylierung im perizentrischen Heterochromatin ist.

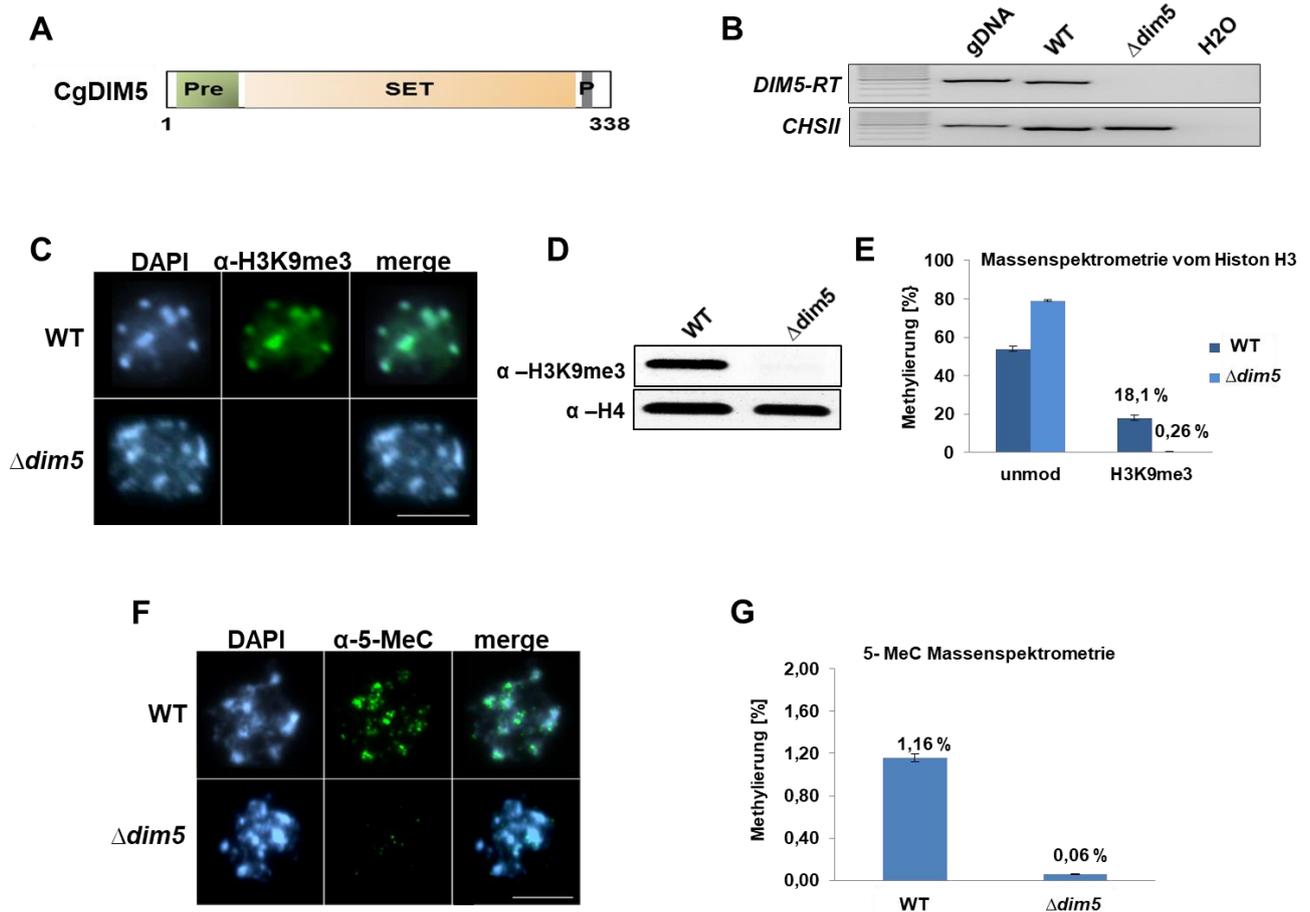


Abbildung 6: CgDIM5 kontrolliert die H3K9 Trimethylierung im Heterochromatin. (A) Domänenstruktur des CgDIM5 Proteins, **Pre** pre-SET-Domäne, **SET** SET-Domäne, **P** post-SET-Domäne (B) Bei der $\Delta dim5$ Knockout-Mutante kann keine Expression des Gens mehr nachgewiesen werden (semiquantitative RT-PCR). Die Chitinsynthase II (CHSII) wird bei *C. graminicola* konstitutiv exprimiert und dient als Kontrolle. Immunozytologische Färbung (C), Western Blot Analysen (D), sowie Massenspektrometrie (in Kooperation mit A. Imhof) (E) zeigen in der Deletionsmutante einen Verlust von H3K9me3. Außerdem konnte kein H3K9me1 und H3K9me2 detektiert werden. Deletion von CgDIM5 führt zum Verlust der DNA-Methylierung. (F) Immunozytologie und (G) Massenspektrometrie in Kooperation mit Ch. Ihling und A. Sinz. Maßstab = 5 μ m.

4.2.2. Die DNA-Methylierung wird bei *C. graminicola* primär durch CgDIM2-1 kontrolliert

Durch Sequenzvergleiche wurden bei *C. graminicola* zwei putative DNA-Methyltransferasen (DIM2-1 und DIM2-2) identifiziert, die eine Homologie zu den DNA-Methyltransferasen DIM2 und RID von *N. crassa* aufweisen (Sequenzalignements Anhang 8.2.) (Freitag et al. 2002). Beide Proteine besitzen eine C-5 Cytosin-spezifische DNA-Methylase-Domäne, die die Übertragung der Methylgruppe auf die Cytosine der DNA katalysiert. Zusätzlich zu der DNA-Methylase-Domäne weist CgDIM2-1 noch zwei BAH (*bromo-adjacent homology*) Domänen auf (Abbildung 7A). Diese Domäne wirkt als Protein-Protein-Interaktionsmodul im Gensilencing und spielt eine wichtige Rolle in der Verknüpfung zwischen DNA Methylierung, Replikation und transkriptioneller Regulation (Callebaut et al. 1999). Für beide DNA-Methyltransferasen wurden die Einzel-Deletionsmutanten $\Delta dim2-1$ und $\Delta dim2-2$, sowie die $\Delta dim2-1\Delta dim2-2$ Doppelmutante erzeugt (Mickel 2010). In den Knockout-Mutanten können keine Transkripte der entsprechenden Gene nachgewiesen werden (Abbildung 7B). Mickel 2010 konnte mittels Wachstumsversuchen zeigen, dass alle generierten Mutanten ein normales Wachstum gleich dem Wildtyp aufweisen.

Immunozytologische Färbungen mit einem 5-Methylcytosin Antikörper zeigen, dass in $\Delta dim2-1$ und der Doppelmutante $\Delta dim2-1\Delta dim2-2$ keine DNA-Methylierung mehr nachweisbar ist (Abbildung 7D). In der Massenspektrometrie sind im Wildtyp 1,16% der Cytosine methyliert, während in $\Delta dim2-1$ und der Doppelmutante nur noch 0,14% bzw. 0,07% Cytosin-Methylierung gemessen wird (Abbildung 7E). $\Delta dim2-2$ weist keine signifikanten Veränderungen in der DNA-Methylierung auf (Abbildung 7D und 7E).

Bei *C. graminicola* ist die H3K9 Trimethylierung essentiell für die DNA-Methylierung. Immunozytologische Färbungen zeigen, dass ein Verlust der DNA-Methylierung jedoch keinen Einfluss auf H3K9me3 hat. Im Wildtyp und allen drei Deletionslinien ist eine typische Verteilung von H3K9me3 im Chromozentren-Heterochromatin zu beobachten (Abbildung 7C).

Durch die Deletionsanalysen der putativen DNA-Methyltransferasen konnte gezeigt werden, dass CgDIM2-1 essentiell für die Etablierung der DNA-Methylierung in Interphasekernen von *C. graminicola* ist.

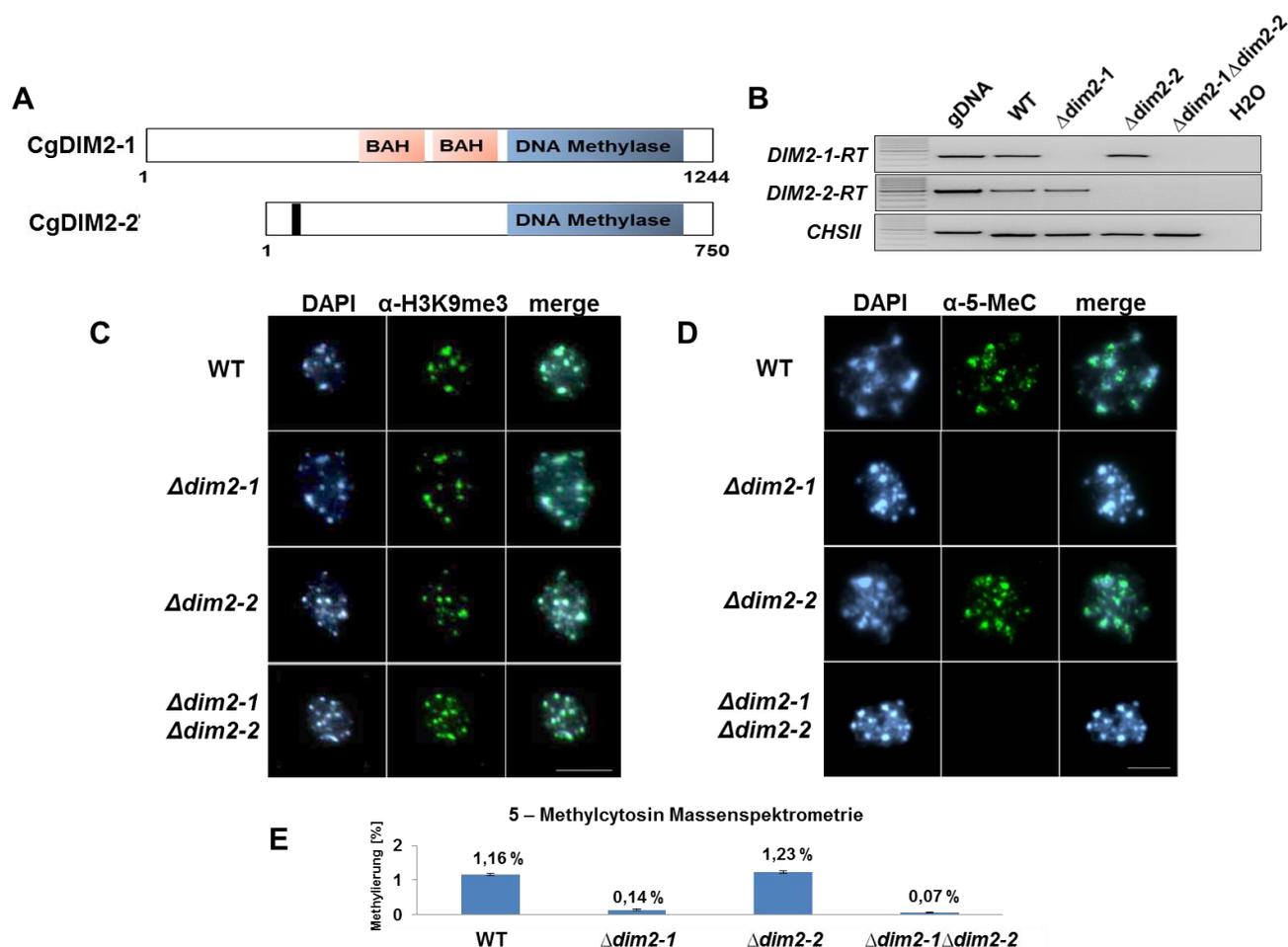


Abbildung 7: Kontrolle heterochromatischer DNA-Methylierung durch CgDIM2-1. (A) Domänenstruktur der beiden DNA-Methyltransferasen CgDIM2-1 und CgDIM2-2 von *C. graminicola*, (BAH bromo-adjacent homology). (B) Bei $\Delta dim2$ Knockout-Mutanten ist kein Transkript nachweisbar (semiquantitative RT-PCR). (C) Die H3K9 Trimethylierung ist in allen DNA-Methyltransferase Mutanten unverändert. (D) Die Deletion von CgDIM2-1 führt zum Verlust der DNA-Methylierung, während diese bei $\Delta dim2-2$ unbeeinflusst ist. (E) Massenspektrometrische Daten zeigen nur noch einen sehr geringen Mengen an 5-Methylcytosin bei $\Delta dim2-1$ und $\Delta dim2-1 \Delta dim2-2$. Massenspektrometrie in Kooperation mit Ch. Ihling und A. Sinz. Maßstab = 5 μ m.

4.2.3. Die Histonmethyltransferase CgE(Z) katalysiert die H3K27 Methylierung bei *C. graminicola*

In Interphasenkernen von *C. graminicola* ist H3K27me1 und H3K27me2 in den heterochromatischen Chromozentren angereichert. H3K27me3 wird vorwiegend in euchromatischen Bereichen gefunden (Abbildung 8C). Bei *C. graminicola* wurde ein Homolog zu E(Z) - Enhancer-of-zeste von *Drosophila* identifiziert. Die Histonmethyltransferase CgE(Z) besitzt, wie CgDIM5 eine SET-Domäne, die für die Methylierung von Lysinresten an Histonen verantwortlich ist (Abbildung 8A). Zusätzlich enthält CgE(Z) eine 53 AA große SANT (Swi3/ Ada2/ N-Cor/ TFIIB) Domäne (Abbildung 8A und Alignment Anhang 8.2.). Diese Domäne ist in den Untereinheiten von vielen

Chromatin-Remodelling-Komplexen zu finden (Aasland et al. 1996). Nach erfolgreicher Deletion des Gens (GLRG_00711) über homologe Rekombination (Voigt 2011) ist in der Mutante kein spezifisches Transkript mehr nachzuweisen (Abbildung 8B). Das Wachstum und die Morphologie sind bei diesen Deletionsmutanten unverändert (Voigt 2011).

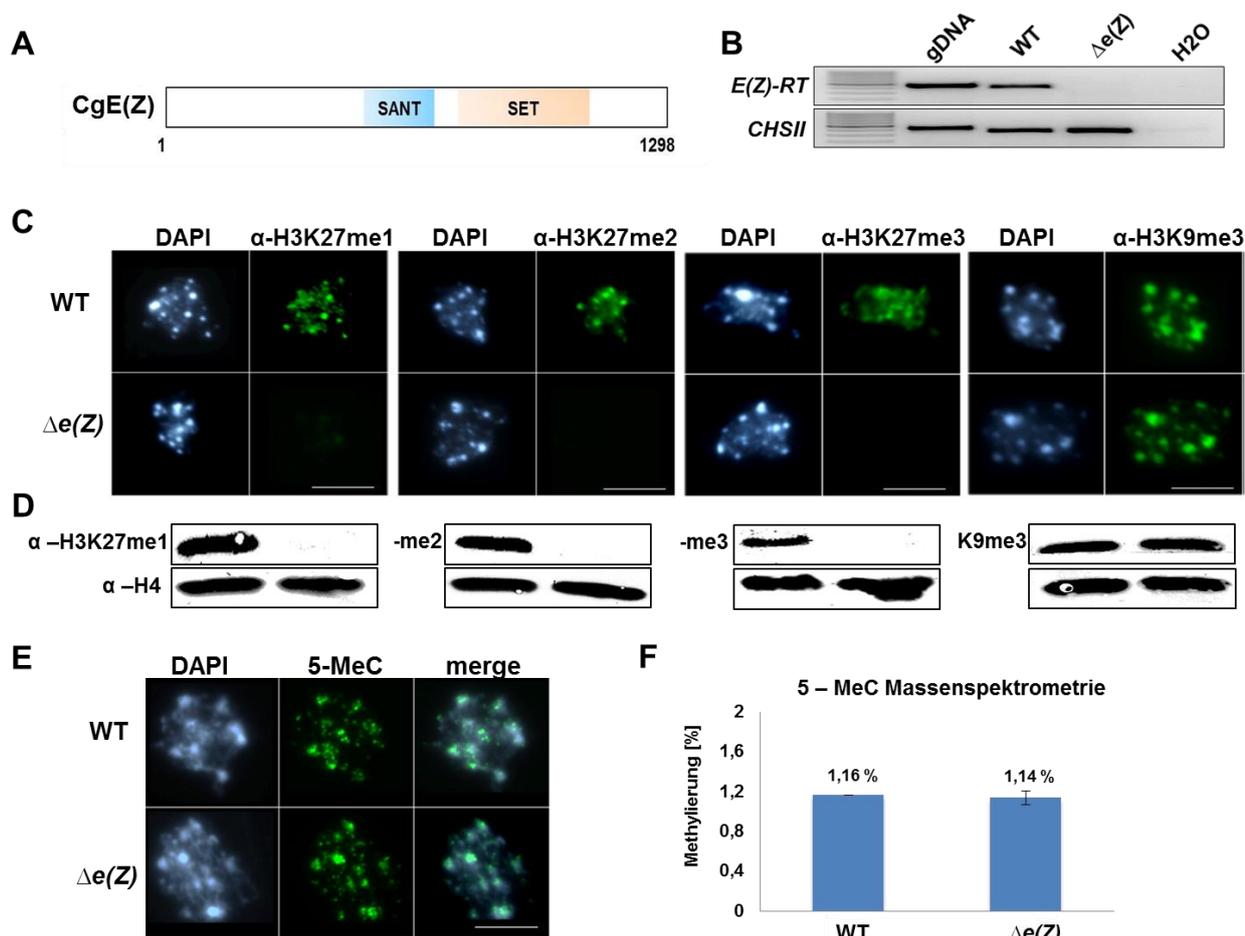


Abbildung 8: CgE(Z) reguliert die komplette H3K27 Methylierung bei *C. graminicola*. (A) Domänenstruktur der H3K27 Histonmethyltransferase CgE(Z) von *C. graminicola*. SANT SANT-Domäne, SET SET-Domäne. (B) Bei $\Delta e(Z)$ wird keine Expression des Gens mehr nachgewiesen (semiquantitative RT-PCR). (C) Immunofluoreszenz-Färbungen und (D) Western Blot Analysen zeigen in der Deletionsmutante von CgE(Z) einen Verlust der H3K27 Mono-, Di-, und Trimethylierung. Immunofärbung (E) und Massenspektrometrie (F) weisen keine Veränderung von 5-Methylcytosin bei $\Delta e(Z)$ auf. Massenspektrometrie in Kooperation mit Ch. Ihling und A. Sinz. Maßstab = 5 μ m.

CgE(Z) katalysiert alle drei Methylierungsstufen am Lysin 27 des Histons H3 und in der Deletionsmutante $\Delta e(Z)$ wird keine Mono- Di- und Trimethylierung mittels Immunofluoreszenz und Western Blot Analyse mehr nachgewiesen (Abbildung 8C und 8D). Der Verlust von CgE(Z) besitzt keinen Einfluss auf H3K9me3. Sowohl in der Immunofluoreszenz, als auch im Western Blot ist die H3K9 Trimethylierung unverändert (Abbildung 8C und 8D).

Die Immunozytologie und die Massenspektrometrie der Nullmutante verdeutlichen, dass die DNA-Methylierung ebenfalls nicht beeinflusst wird. In $\Delta e(Z)$ werden wie im Wildtyp etwa 1% Cytosinmethylierung gemessen (Abbildung 8E und 8F).

CgE(Z) ist die einzige H3K27 Histonmethyltransferase bei *C. graminicola*, da eine Deletion des Gens zum kompletten Verlust von H3K27me1, H3K27me2 und H3K27me3 führt.

4.2.4. Das Heterochromatin Protein 1 ist essentiell für die Etablierung von DNA-Methylierung

Bei dem Ascomyceten *C. graminicola* wird ein Chromo Domänen Protein gefunden, welches zum HP1 Protein von *Drosophila* homolog ist. Das 273 Aminosäuren großes Protein enthält zwei konservierte Domänen, die über eine Hinge Region miteinander verbunden sind. Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich die Chromo Domäne (CD). Eine weitere wichtige Domäne von CgHP1 ist die C-terminale Chromo Shadow Domäne (CSD) (Abbildung 9A). Zusätzlich zu den beiden Domänen konnte bei *C. graminicola* ein AT-Hook Motiv identifiziert werden (Sequenzalignment Anhang 8.2.). AT-Hook Motive sind kurze, bei *C. graminicola* 12 AA umfassende, putative DNA-bindende Domänen, die sich vorzugsweise an AT-reiche Regionen anlagern (Meijer & van Dijk 1996). Das auf dem 2. Chromosom lokalisierte Gen *CgHP1* (GLRG_05406) wurde über homologe Rekombination erfolgreich deletiert (Voigt 2011) und in der Knockout-Mutante ist kein Transkript nachweisbar (Abbildung 9B). Wachstumsversuche von Voigt 2011 belegen, dass die $\Delta hp1$ Deletionsmutante ein reduziertes Wachstum auf OMA-Medium (Haferflockenmedium) zeigt. Des Weiteren wurde eine schnellere Bildung von orangefarbenen Sporenlagern beobachtet (Voigt 2011).

Der Verlust von *CgHP1* hat keinen Effekt auf die H3K9 Trimethylierung. Immunozytologie von $\Delta hp1$ und die Western Blot Analysen belegen, dass H3K9me3 unverändert ist. In der Massenspektrometrie ist eine schwache Reduktion von H3K9me3 in der Deletionsmutante zu beobachten. Im Wildtyp sind 18,1% H3K9 trimethyliert, wo hingegen bei der Mutante nur 11,9% trimethyliert sind. Diese Differenz von 6,2% ist jedoch in den Färbungen und Western Analysen nicht detektierbar (Abbildung 9C-E).

Im Gegensatz zu H3K9me3 ist die DNA-Methylierung in der Deletionsmutante verändert. In immunozytologischen Färbungen konnte bei $\Delta hp1$ keine 5-Methylcytosinfärbung mehr

detektiert werden (Abbildung 9F). Dieses Ergebnis wird durch die DNA-Massenspektrometrie bestätigt. Im Wildtyp sind 1,16% aller Cytosine methyliert. Im Vergleich dazu werden in der Deletionsmutante lediglich 0,1% methylierte Cytosine gemessen (Abbildung 9G).

Der Knockout von HP1 zeigt somit, dass dieses Protein für die DNA-Methylierung bei *C. graminicola* essentiell ist.

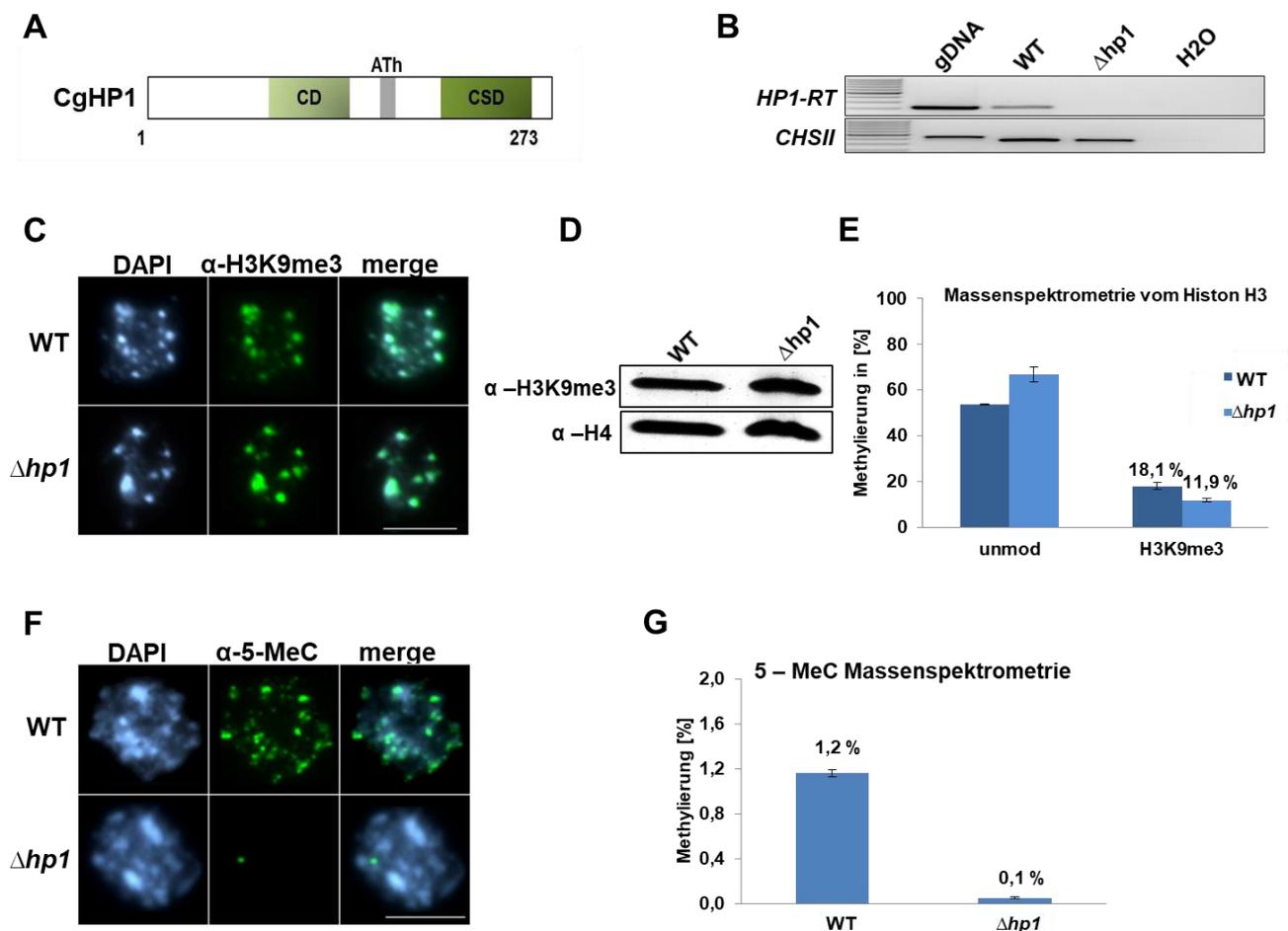


Abbildung 9: Das Heterochromatin Protein 1 ist für die DNA-Methylierung essentiell. (A) Domänenstruktur von CgHP1 bei *C. graminicola*. (B) Bei $\Delta hp1$ kann keine Expression des Gens mehr nachgewiesen werden (semiquantitative RT-PCR). (C) Immunozytologische Färbungen und (D) Western Blot Analysen zeigen bei der Deletionsmutante $\Delta hp1$ keinen Verlust von H3K9me3. (E) In der Massenspektrometrie ist eine minimale Reduktion an H3K9me3 zu beobachten. Immunofärbung (F) und Massenspektrometrie (G) zeigen einen Verlust der DNA-Methylierung bei $\Delta hp1$. Massenspektrometrie in Kooperation mit A. Imhof (Histon) und Ch. Ihling (DNA). Maßstab = 5 μ m.

4.2.5. CgDIM7 – ein epigenetischer Faktor, der DIM5-abhängiges H3K9me3 kontrolliert

DIM-7 ist ein pilzspezifisches Protein, welches zuerst bei *N. crassa* gefunden wurde (Lewis et al. 2010). Bei *C. graminicola* weist DIM7 im N-terminalen Bereich eine DNMT1-RFD Domäne auf (Abbildung 10A und Sequenzalignment Anhang 8.2.). Diese 122 aa große Domäne wird auch in der Cytosin spezifischen DNA-Methyltransferase DNMT1 gefunden. In der Maus wurde gezeigt, dass DNMT1 an HDAC2 und DMAP1 (*for DNMT1 associated protein*) bindet. Über diese Interaktion wird transkriptionelle Repression vermittelt (Rountree et al. 2000).

Mittels homologer Rekombination konnten 4 Deletionsmutanten erzeugt werden, in denen kein Transkript für *CgDIM7* mehr nachweisbar ist (Abbildung 10B). Die Deletion von *CgDIM7* beeinflusst die H3K9 Trimethylierung und die DNA-Methylierung, da für beide Modifikationen keine Färbung mehr detektiert wird (Abbildung 10C und 10E). Nur in den Western Blots für H3K9me3 wird ein schwaches Signal in $\Delta dim7$ beobachtet (Abbildung 10D).

Wachstumsversuche auf verschiedenen Medien, wie PDA (Kartoffeldextroseagar), OMA (Haferflockenmedium) oder Minimalmedium, zeigen, dass die Deletionsmutante ein reduziertes Wachstum aufweist. 9 Tage nach Versuchsbeginn ist der Wildtyp auf PDA-Medium bereits 4 cm gewachsen, während bei $\Delta dim7$ erst 2 cm Pilzmyzel nachweisbar ist. Auch auf Minimalmedium ist das Wachstum im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Auf OMA-Medium scheint der Effekt nur minimal zu sein, da auf diesem Medium nur ein Unterschied von 0,3 cm gemessen wurde (Abbildung 10F und 10H). $\Delta dim7$ weist nicht nur ein langsames Wachstum als der Wildtyp auf, sondern zeigt auch ein verändertes Myzelwachstum. Die Hyphen der Mutante sind auf PDA-Medium deutlich verzweigter als beim Wildtyp (Abbildung 10G).

Diese Ergebnisse zeigen, dass CgDIM7 für die H3K9 Trimethylierung benötigt wird, um später auch DNA-Methylierung zu vermitteln. Des Weiteren ist CgDIM7 für ein normales Myzelwachstum des Pilzes wichtig.

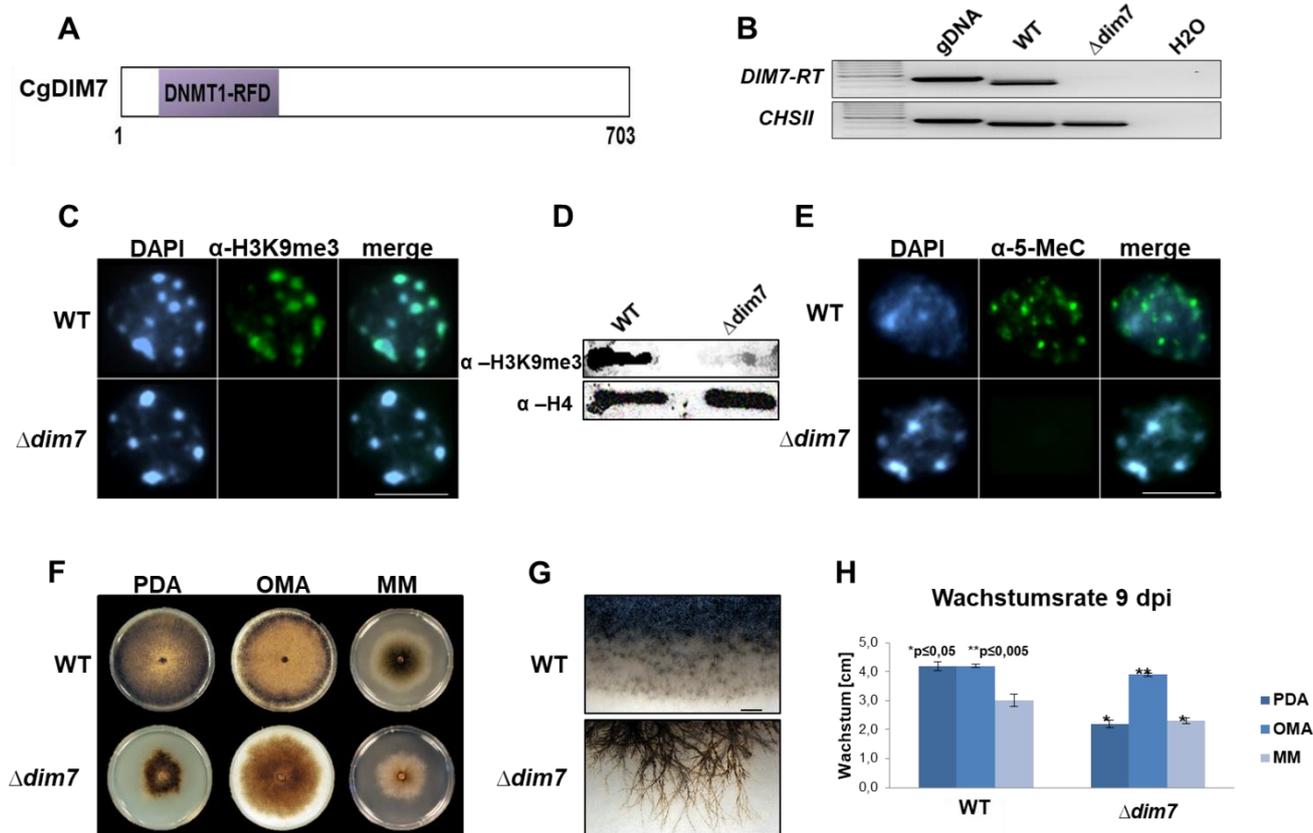


Abbildung 10: CgDIM7 beeinflusst die H3K9 Trimethylierung durch CgDIM5. (A) Domänenstruktur von CgDIM7 bei *C. graminicola*. (B) Bei $\Delta dim7$ kann keine Expression des Gens mehr nachgewiesen werden (semiquantitative RT-PCR). (C) Immunozytologische Färbungen und (D) Western Blot Analysen zeigen bei der Deletionsmutante $\Delta dim7$ einen Verlust von H3K9me3. (E) 5-Methylcytosinfärbungen zeigen einen Verlust der DNA-Methylierung bei $\Delta dim7$. Maßstab = 5 μ m. (F) $\Delta dim7$ weist ein reduziertes Wachstum auf verschiedenen Medien auf (9dpi). (G) $\Delta dim7$ zeigt auf PDA ein verzweigteres Myzelwachstum als der Wildtyp auf. Maßstab = 1 mm. (H) Quantifizierung des Wachstumstests. Signifikanz - t-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

4.2.6. Einfluss der Mutanten für epigenetische Kontrollfaktoren auf die Pathogenität

Mit Hilfe von Blattsegmentassays wurde untersucht, ob die verschiedenen Mutanten mit Mutationen in epigenetischen Kontrollfaktoren einen Einfluss auf die Virulenz von *C. graminicola* zeigen. Dazu wurde jeweils das dritte Blatt einer 14 Tage alten Maispflanze des Kultivars „Mikado“ mit je 10 μ l einer Sporenkonzentration von 1×10^6 Sporen/ml inokuliert. 4 Tage nach Inokulation mit dem Wildtyp sind die Symptome einer Pilzinfektion in Form von nekrotischen Blattflecken sichtbar (Abbildung 11). Die Mutanten $\Delta dim5$ und $\Delta e(Z)$ sind noch in der Lage die Maispflanzen voll zu infizieren. Genau wie beim Wildtyp sind kräftige dunkle Läsionen an den Inokulationsstellen zu beobachten (Abbildung 11). Auch die Deletionsmutanten der DNA-Methyltransferasen $\Delta dim2-1$ und $\Delta dim2-2$, sowie die Doppelmutante $\Delta dim2-1 \Delta dim2-2$ haben keinen Einfluss auf die Virulenz (Abbildung 11). $\Delta dim7$ ist ebenfalls noch pathogen, jedoch zeigt diese Mutante 4 Tage nach der Inokulation

schwächere Symptome als der Wildtyp. Betrachtet man die Keimung und Appressorienbildung, scheint es zwischen Mutante und Wildtyp keine Unterschiede zu geben. Im Gegensatz dazu wird deutlich sichtbar, dass die Penetration und damit auch die Bildung der Primär- und Sekundärhyphen bei $\Delta dim7$ reduziert sind. 4 Tage nach der Inokulation sind bei der Deletionsmutante erst 46,7% sekundärer Hyphen zu beobachten, während im Wildtyp bereits 93,1% nekrotrophe Sekundärhyphen ausgebildet sind (Anhang 8.8.).

Im Vergleich zu den anderen Mutanten stellt $\Delta hp1$ eine Ausnahme im Infektionsverhalten dar. 4 Tage nach der Inokulation können keine Symptome beobachtet werden (Abbildung 11). Auch zu einem späteren Zeitpunkt (6-8 dpi) werden keine nekrotischen Blattflecken gebildet (nicht gezeigt). Somit beeinflusst die Deletion des *CgHP1* Gens die Pathogenität des Pilzes.

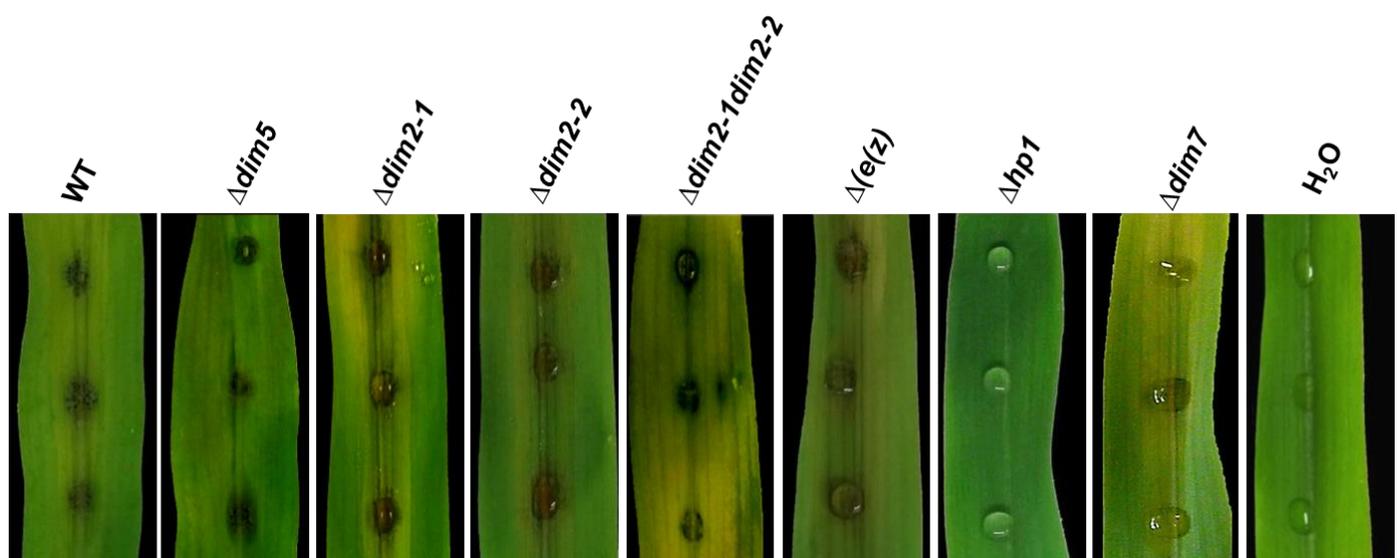


Abbildung 11: Pathogenitätsassay der Deletionsmutanten epigenetischer Kontrollfaktoren. Dokumentation der Symptome 4 Tage nach der Inokulation auf dem Maiskultivar „Mikado“. Die Sporenkonzentration beträgt 1×10^6 Sporen/ml (Bilder $\Delta dim5$, $\Delta dim2-1$, $\Delta dim2-2$, $\Delta dim2-1\Delta dim2-2$ und $\Delta hp1$ von A. Mickel bereitgestellt).

4.3. Pathogenitätsdefekte der $\Delta hp1$ Mutante

Die Deletion des HP1 Proteins bei *C. graminicola* führt zum Verlust der Pathogenität. Werden die Maisblätter vor der Inokulation mit Sporen verwundet, besitzt $\Delta hp1$ jedoch die Fähigkeit, sich in der Pflanze zu etablieren und Symptome auf der Blattoberfläche zu bilden (Abbildung 12).

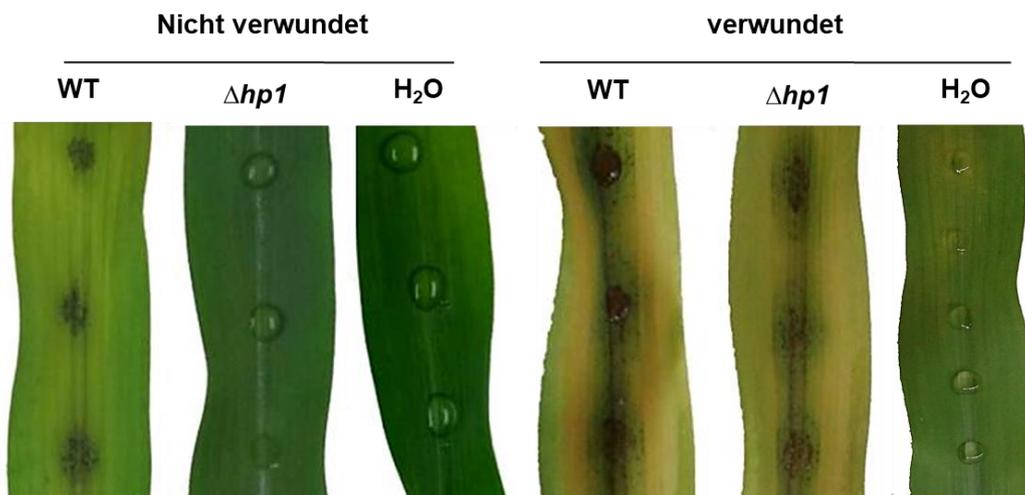


Abbildung 12: Infektion von $\Delta hp1$ auf verwundeten Maisblättern. $\Delta hp1$ kann unverwundete Maisblätter nicht infizieren. Werden die Maisblätter vor der Inokulation verwundet, erfolgt eine Infektion vergleichbar wie beim Wildtyp. Aufnahmen 4 Tage nach der Inokulation (4dpi). Kultivar: Mikado. Bilder von A. Mickel.

Mikroskopische Analysen belegen, dass sich der Wildtyp bereits 4 Tage nach der Inokulation in der nekrotrophen Phase seines Lebenszyklus befindet. Nach der Keimung wurden Appressorien gebildet. Diese penetrierten die Pflanzenepidermis und biotrophe Primärhyphen und nekrotrophe Sekundärhyphen wurden ausgebildet. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich $\Delta hp1$ noch in der biotrophen Phase. Die Mutante bildet normale Appressorien aus und ist in der Lage, die Pflanze zu penetrieren. Jedoch wird bei $\Delta hp1$ ein Entwicklungsarrest in der frühen biotrophen Phase beobachtet. Mikroskopische Analysen zeigen, dass nach der Penetration der Epidermiszellen meist nur das Infektionsvesikel ausgebildet wird und sich nur selten Primärhyphen entwickeln. Es wurden nur selten nekrotrophen Sekundärhyphen gefunden (Abbildung 13A).

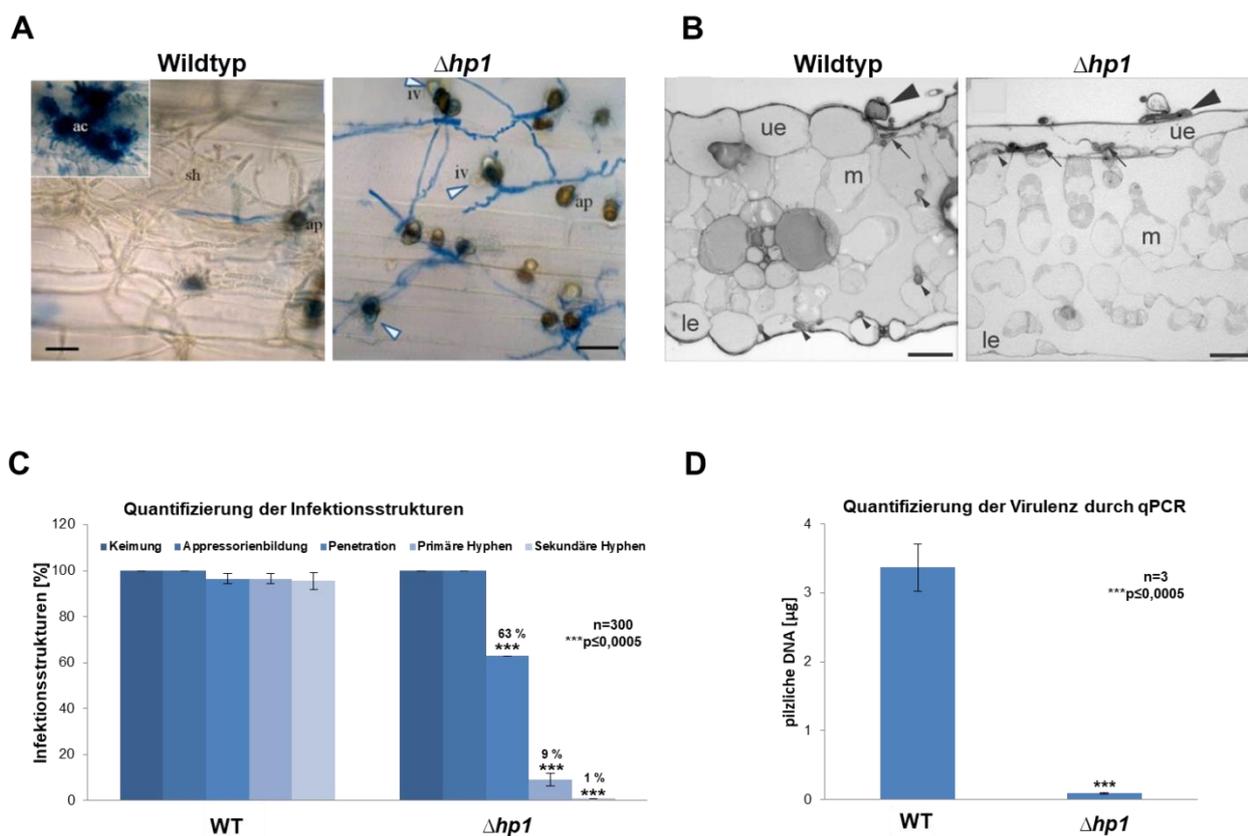


Abbildung 13: Pathogenitätsdefekte von $\Delta hp1$ Mutanten. (A) Mikroskopische Aufnahmen 4 Tage nach Inokulation. Maßstab = 10 μm . Bild von A. Mickel (B) Lichtmikroskopische Analyse von infizierten Blattdünnschnitten. Aufnahmen von G. Hause. Maßstab = 20 μm . (C) Quantifizierung der Infektionsstrukturen. (D) Bestimmung der pilzlichen Biomasse mittels qPCR von infiziertem Blattmaterial 4 Tage nach der Inokulation. **ac** Acervuli, **iv** Infektionsvesikel, **sh** Sekundärhyphe, **ap** Appressorium, **eu** obere Epidermis, **le** untere Epidermis, **m** Mesophyllzellen, \rightarrow primäre Infektionsstrukturen, \blacktriangleright sekundäre Hyphen. Länglicher \blacktriangleright Keimschlauch und Appressorium auf Blattoberfläche. Signifikanz - t-Test: *p≤0,05, **≤0,005, ***≤0,0005.

Die Analyse von Blattdünnschnitten verdeutlicht, dass $\Delta hp1$ die obere Epidermis penetrieren und biotrophe Hyphen ausbilden kann. Eine weitere Ausbreitung durch Sekundärhyphen im gesamten Blatt wird jedoch nicht beobachtet. Im Wildtyp sind zum gleichen Zeitpunkt nekrotrophe Hyphen in allen Blattschichten, wie Mesophyllzellen und der unteren Epidermis nachweisbar (Abbildung 13B). Diese Beobachtungen werden durch die Auszählung der Infektionsstrukturen bestätigt. Wildtyp und $\Delta hp1$ zeigen 4 Tage nach der Inokulation eine nahezu 100%ige Keimung und Appressorienbildung. Im Vergleich zum Wildtyp weist die Deletionsmutante bereits eine verringerte Penetration auf. Beim Wildtyp konnten 96% der Appressorien die Pflanze penetrieren, während bei $\Delta hp1$ nur 63% der Appressorien penetrierten. Dieser Penetrationsdefekt hat ebenfalls zur Folge, dass $\Delta hp1$ deutlich weniger primäre Hyphen (9%) ausgebildet. Bei der Quantifizierung der Infektionsstrukturen konnten nur 1% Sekundärhyphen bei der Deletionsmutante $\Delta hp1$ beobachtet werden (Abbildung 13C). Mittels qPCR Analysen wurde zusätzlich die

Myzelmenge von infiziertem Blattmaterial bestimmt. Diese Daten zeigen ebenfalls eine signifikant verringerte Menge an pilzlicher DNA im Blattgewebe bei $\Delta hp1$ (Abbildung 13D). Der Virulenzdefekt von $\Delta hp1$ ist somit auf eine verringerte Penetration und einen Wachstumsdefekt in der frühen biotrophen Phase zurückzuführen.

4.4. Komplementationsanalysen der Deletionsmutante $\Delta hp1$

Mittels genetischer Komplementation wurde versucht, bei $\Delta hp1$ die Wildtypsituation wieder herzustellen, um somit zu überprüfen, ob die infektionsdefekten Phänotypen gerettet werden können. Dazu wurde an die Stelle der bereits vorhandenen Hygromycin-Deletionskassette eine neue Transformationskassette mit dem Wildtyp HP1-Gen über homologe Rekombination in das Genom von $\Delta hp1$ zurück integriert. Diese Transformationskassette besteht aus den beiden ca. 1000 bp großen 5' und 3' Bereichen, sowie den gesamten offenen Leserahmen (ORF) des *CgHP1* Gens. Nach dem Stop-Codon des Gens wurde der Selektionsmarker Geneticin (G418) angefügt. Somit können erhaltene Komplementationsmutanten ($\Delta hp1:HP1$) von den $\Delta hp1$ Mutanten selektiert werden, da diese Hygromycin als Selektionsmarker enthalten (Abbildung 14A). Nach erfolgreicher Transformation des Konstruktes in $\Delta hp1$ konnte mittels Southern Blot eine Mutante positive bestätigt werden (Anhang 8.10.).

Eine Deletion von *CgHP1* geht mit einem reduzierten Wachstum einher (Voigt 2011). Die Komplementationsanalysen zeigen, dass der Wachstumsdefekt auf PDA-Medium gerettet werden kann. $\Delta hp1:HP1$ weist ein Wachstum gleich dem Wildtyp auf (Abbildung 14B). Des Weiteren belegen Infektionsstudien auf dem Maiskultivar „Mikado“, dass die Komplementationsmutante $\Delta hp1:HP1$ wieder pathogen ist. 4 Tage nach der Infektion sind, wie beim Wildtyp braunen Läsionen an den Inokulationsstellen zu beobachten. Im Vergleich dazu zeigt $\Delta hp1$ keine Symptome (Abbildung 14C).

Die Deletion des Heterochromatin Protein 1 führt bei *C. graminicola* zum Verlust DNA-Methylierung (Abbildung 9F und G). Bei $\Delta hp1:HP1$ wird immunozytologisch wieder 5-Methylcytosin detektiert. Die Färbung in den heterochromatischen Chromozentren ist mit dem Wildtyp identisch (Abbildung 14D).

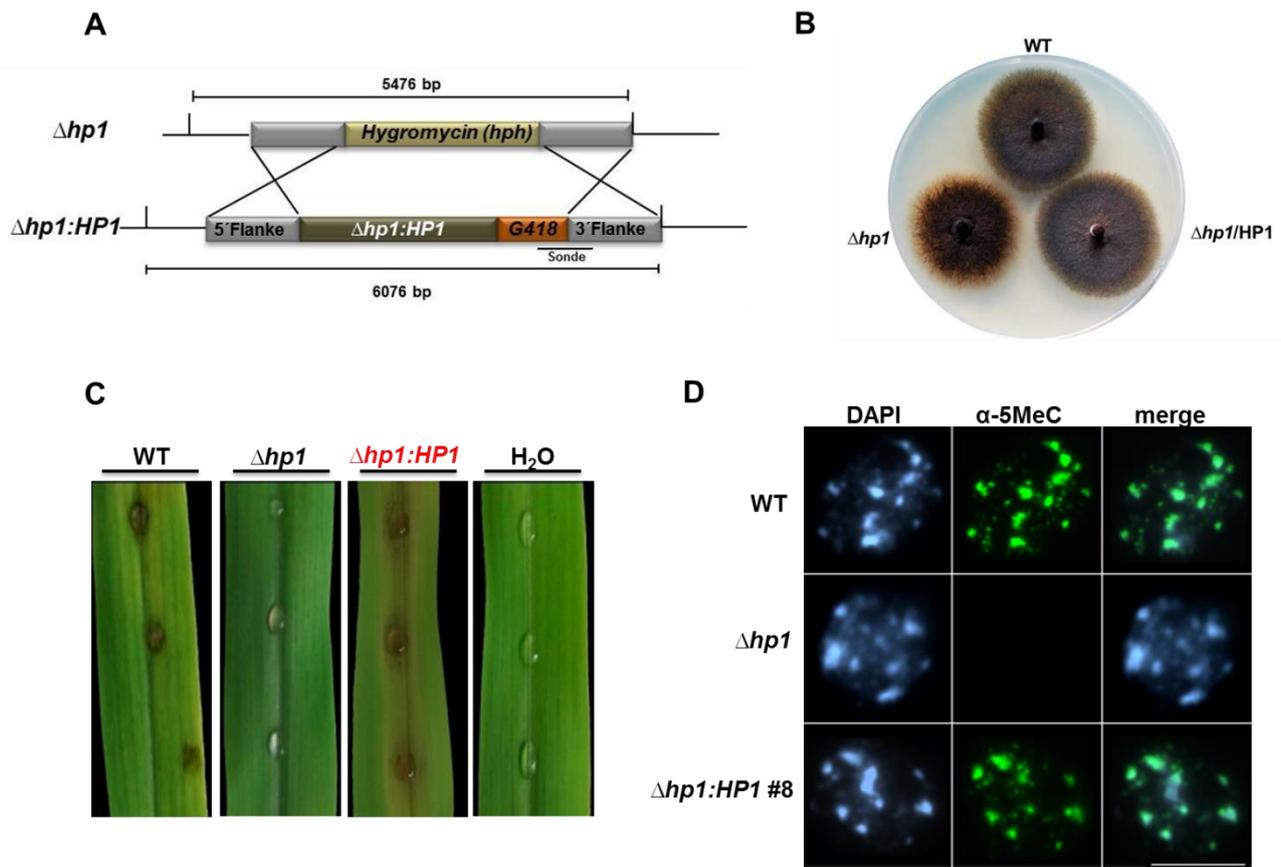


Abbildung 14: Komplementation der Deletionsmutante $\Delta hp1$. (A) Die Komplementation von $\Delta hp1$ erfolgte über homologe Rekombination. Die Hygromycin-Deletionsmutante wird durch eine CgHP1-G418 Kasette ausgetauscht. (B) und (C) Der Wachstums- und Pathogenitätsdefekt konnten bei der $\Delta hp1:HP1$ Mutante komplementiert werden. Im Vergleich dazu ist $\Delta hp1$ apathogen. Dokumentation der Symptome 4 Tage nach Inokulation auf dem Maiskultivar „Mikado“. Bilder von I. Gase. (D) Der Verlust der DNA-Methylierung wird bei den $\Delta hp1:HP1$ Mutanten komplementiert. Als Kontrolle diente die $\Delta hp1$ Knockout-Mutante, bei der keine DNA-Methylierung in den Chromozentren gefunden wird. *hph*-Hygromycin Phosphotransferase (Selektionsmarker). Maßstab = 5 μ m.

4.5. Das HP1-GFP Fusionskonstrukt ist in heterochromatischen Chromozentren lokalisiert

Für Lokalisierungs- und Expressionsstudien erfolgte ein Austausch des CgHP1 Protein mit einem HP1-GFP Fusionsprotein (Abbildung 15A). Das am C- Terminus mit eGFP fusionierte Protein unterliegt der Kontrolle des endogenen Promoters des HP1 Gens. Nach erfolgreicher Transformation dieses Konstruktes in den Wildtyp von *C. graminicola* wurden drei unabhängige HP1-GFP Linien, sowie eine ektopische Integration mittels Southern Blots bestätigt (Anhang 8.10.). Infektionsassays belegen, dass Pilze mit dem HP1-GFP Fusionsprotein pathogen sind und somit Wildtypfunktion besitzen. Auch die Mutante mit ektopischer Integration des HP1-GFP Konstrukts verursacht nekrotrophe Läsionen

(Abbildung 15F). HP1-GFP ist bevorzugt in den Chromozentren der Interphasekerne lokalisiert. Jedoch ist auch eine schwache diffuse Verteilung des Proteins außerhalb der Chromozentren zu beobachten. Dies lässt vermuten, dass HP1 außerhalb der heterochromatischen Chromozentren zahlreiche Bindungsstellen im Genom besitzt. (Abbildung 15B).

Das HP1-GFP Fusionsprotein wird während des gesamten Entwicklungszyklus des Ascomyceten exprimiert. In Infektionsstudien mit Zwiebelepidermen wurde das Protein in ungekeimten und keimten Konidien, in Keimschläuchen, Appressorien, sowie in biotrophen und nekrotrophen Infektionshyphen nachgewiesen. Mit der Bildung neuer Sporen in den Acervuli ist der Entwicklungszyklus von *C. graminicola* abgeschlossen. In diesen Strukturen erfolgt ebenfalls eine Expression des HP1-GFP (Abbildung 15B-E). Die präferentielle heterochromatische Assoziation des Fusionsproteins, welche in Interphasekernen von Konidien beobachtet wurde (Abbildung 15B), bleibt im gesamten Verlauf des Entwicklungszyklus unverändert.

Die Analysen zeigen, dass das fusionierte eGFP keinen Einfluss auf die Entwicklung und Virulenz von *C. graminicola* besitzt. Aufgrund einer Expression des Proteins während des gesamten Infektionszyklus kann CgHP1-GFP für weitere detailliertere genetische Studien verwendet werden.

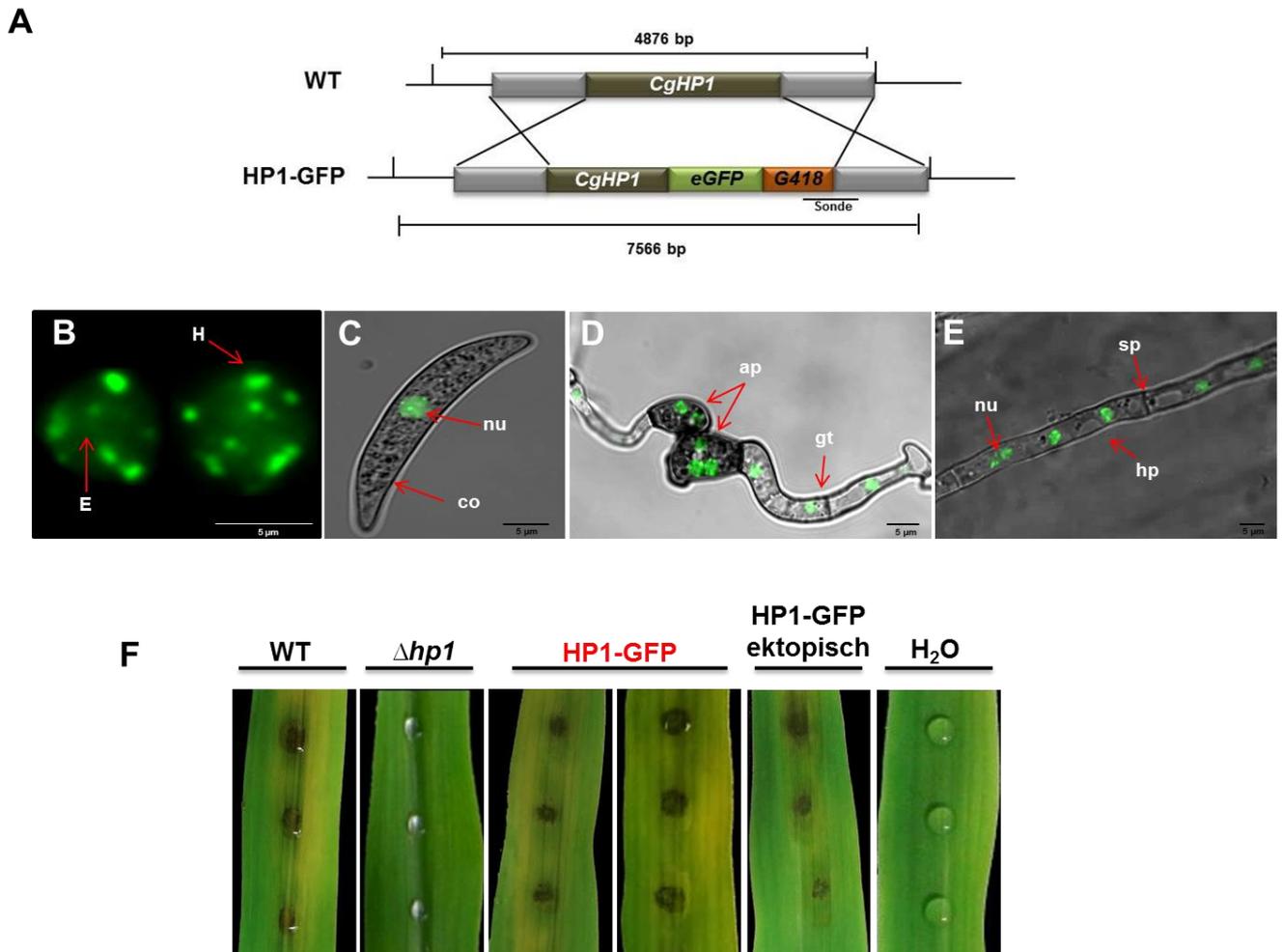


Abbildung 15: HP1-GFP ist mit den heterochromatischen Chromozentren assoziiert. (A) Deletionsstrategie zur Erzeugung eines CgHP1-GFP Stammes über homologe Rekombination. **(B)** HP1-GFP ist primär in heterochromatischen Bereichen des Interphasekerns lokalisiert (LSM-Aufnahmen). Die Expression des HP1-GFPs erfolgt in den Konidien **(C)**, in melanisierten Appressorien **(D)**, sowie in Hyphen **(E)**. **(F)** Das fusionierte GFP an HP1 hat keinen Einfluss auf die Pathogenität. Dokumentation der Symptome 4 Tage nach Inokulation auf dem Maiskultivar „Mikado“. Bilder von I. Gase. **H** Heterochromatin, **E** Euchromatin, **co** Konidie, **nu** Nukleus, **ap** Appressorium, **hp** Hyphe, **gt** Keimschlauch, **sp** Septe, **Ekt.** Mutante mit ektopischer Integration des Konstruktes.

4.6. Genetische Analyse des HP1 Proteins von *C. graminicola*

Die einzelnen Domänen des HP1 Proteins besitzen unterschiedliche Funktionen beim Aufbau von Heterochromatin. Dies erfolgt über differenzielle Interaktion mit H3K9me3 und verschiedenen Proteinen (Jacobs et al. 2001; Yamamoto & Sonoda 2003). Das HP1 Protein ist essentiell für die Pathogenität von *C. graminicola*. Welche Rolle die Chromo und Chromo Shadow Domäne bei der Regulation der Virulenz spielen, soll durch die genetische Analyse des HP1 Proteins geklärt werden. Auch ist es von großem Interesse die regulatorischen Funktionen der einzelnen Domänen des HP1 Proteins bei *C. graminicola* aufzuklären. Für diese Analysen wurden verschiedene HP1-GFP Stämme mittels *Site Directed Mutagenesis* generiert, die unter der Kontrolle des endogenen Promoters von HP1 stehen. Es wurden zahlreiche Stämme erzeugt, bei denen eine Deletion der Chromo Domäne (Δ CD) und der Chromo Shadow Domäne (Δ CSD) erfolgte (Abbildung 16A). Auch wurden Regionen, wie das AT-Hook Motiv (Δ ATh), die Hinge Region (Δ Hinge), sowie der N- und der C- Terminus (Δ N-Ter und Δ C-Ter) des HP1 Proteins deletiert (Abbildung 16A). Zudem wurden Doppelmutanten erzeugt, bei denen beispielsweise die Chromo und Chromo Shadow Domäne (Δ CD+ Δ CSD) entfernt wurden. In weiteren Studien wurden HP1-GFP Fusionsproteine untersucht, bei denen ein Aminosäureaustausch erfolgte. Die Substitutionen von Valin 87 zu Methionin (V87M), Tyrosin 85 nach Alanin (Y85A) oder Tryptophan 107 nach Leucin (W107L) in der Chromo Domäne sollten die Funktion dieser Domäne beeinflussen (Abbildung 16A) (Jacobs et al. 2001; Jacobs et al. 2002; Lewis et al. 2010). Auch in der Chromo Shadow Domäne wurden Aminosäuren, wie L251E (Leucin nach Glutaminsäure) oder Y254E (Tyrosin nach Glutaminsäure) substituiert (Abbildung 16A). Diese Mutationen sollten ebenfalls die Funktion der Chromo Shadow Domäne beeinflussen und somit die Interaktion mit möglichen Bindungspartnern verändern (Brasher et al. 2000; Honda & Selker 2008). Insgesamt wurden 14 verschiedene HP1-GFP Mutantenlinien erzeugt und funktionell analysiert.

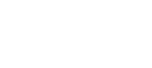
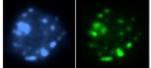
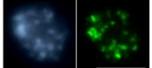
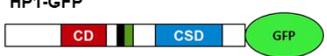
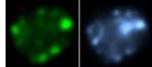
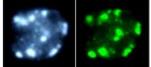
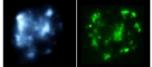
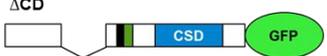
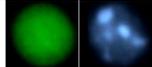
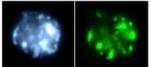
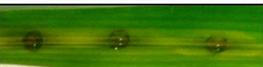
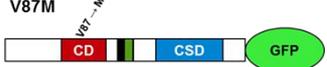
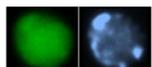
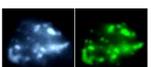
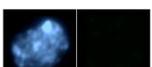
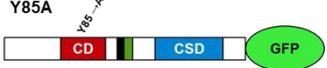
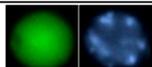
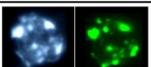
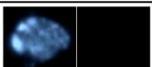
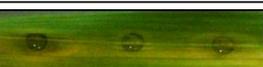
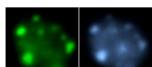
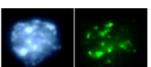
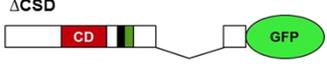
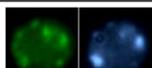
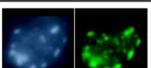
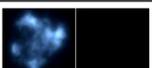
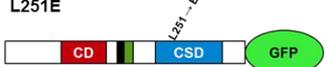
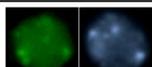
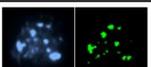
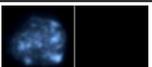
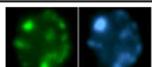
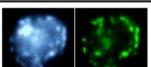
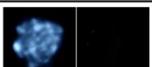
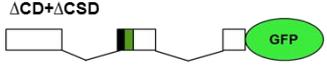
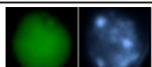
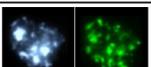
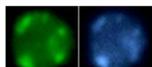
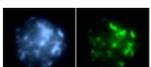
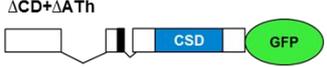
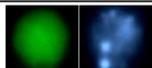
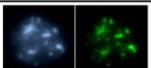
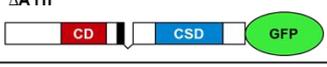
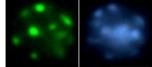
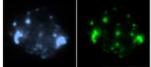
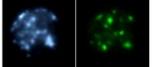
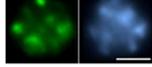
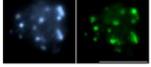
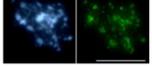
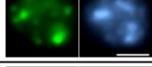
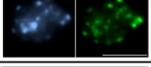
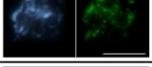
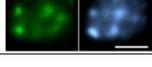
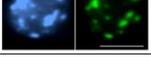
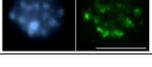
A	B	C	D	E
Konstrukt	Kern-lokalisierung	H3K9me3	DNA Methylierung	Virulenz
WT 				
HP1-GFP 				
Δ CD 				
V87M 				
Y85A 				
W107L 				
Δ CSD 				
L251E 				
Y254E 				
Δ CD+ Δ CSD 				
Δ CSD+ Δ C-Ter 				
Δ CD+ Δ ATh 				
Δ ATh 				
Δ Hinge 				
Δ N-Ter 				
Δ C-Ter 				

Abbildung 16: Genetische Analyse des HP1 Proteins von *C. graminicola*. (A) Mittels *Site Directed Mutagenesis* wurden in das HP1-GFP Protein Deletionen und Punktmutationen eingefügt. (B) Veränderungen der Chromo Domäne beeinflussen die heterochromatische Lokalisation in den Chromozentren. (C) H3K9me3 ist in allen Mutanten unverändert. (D) Mutationen der Chromo und Chromo Shadow Domäne führen zum Verlust der DNA-Methylierung. (E) Die Chromo Shadow Domäne ist essentiell für die Virulenz von *C. graminicola*. **Schwarzer Rahmen** - reduzierte Virulenz, **roter Rahmen** - apathogen. **CD** Chromo Domäne, **CSD** Chromo Shadow Domäne, **ATh** AT-Hook. Maßstab =5 μ m.

4.6.1. Die Chromo Domäne ist essentiell für die Chromozentrenassoziation des HP1 Proteins

HP1-GFP ist im Wildtyp präferentiell mit den heterochromatischen Chromozentren assoziiert. Jedoch zeigt das Protein auch eine schwach diffuse Bindung zu euchromatischen Bereichen. Die Deletion der gesamten Chromo Domäne (Δ CD) bewirkt einen Ausfall der präferentiellen Bindung von Chromozentren (Abbildung 16B). Jedoch ist eine komplette Deletion dieser Domäne für eine veränderte Lokalisierung des Proteins nicht erforderlich. Schon der Austausch einzelner Aminosäuren im N-terminalen Bereich der Chromo Domäne bewirkt den gleichen Phänotyp. Bei den Punktmutanten Y85A und V87M ist HP1-GFP ebenfalls nicht präferentiell in heterochromatischen Bereichen gebunden (Abbildung 16A). W107L führt nicht zu einem Ausfall der Chromozentrenbindung (Abbildung 16B). Auch in der Doppelmutante Δ CD+ Δ ATh ist HP1-GFP diffus im Kern lokalisiert.

Die Mutanten der Chromo Shadow Domäne (Δ CSD, L251E und Y254E) weisen, wie der Wildtyp eine präferentielle Bindung im Chromozentren-Heterochromatin auf (Abbildung 16B und 17). Dennoch ist eine veränderte Lokalisation zu beobachten. Bei Δ CSD ist HP1-GFP uniformer über den gesamten Kern verteilt und es sind wesentlich weniger Chromozentren im Vergleich zu HP1-GFP Wildtyp sichtbar. Statt der 8-10 Chromozentren im Wildtyp, werden bei Δ CSD nur noch drei bis vier beobachtet. Deletiert man beide Domänen, Δ CD+ Δ CSD von CgHP1, so ist nur noch eine diffuse Lokalisierung des Proteins vorhanden (Abbildung 17).

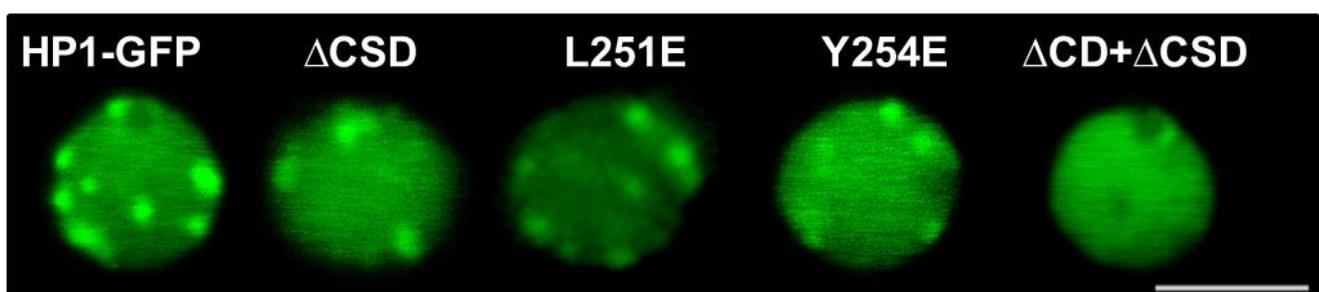


Abbildung 17: HP1-GFP Lokalisation in den Chromo Shadow Domänen Mutanten. HP1-GFP ist im Wildtyp präferentiell im Chromozentren-Heterochromatin lokalisiert. Bei den Chromo Shadow Domänen Mutanten kommt es zu einer vermehrten Anreicherung des HP1-GFPs in euchromatischen Bereichen. Vergrößerte Darstellung der Zellkerne. Maßstab = 5 μ m

Stämme mit Deletionen des N-Terminus (Δ N-Ter), C-Terminus (Δ C-Ter), der Hinge Region und des AT-Hook Motivs weisen keine veränderte Lokalisation von HP1-GFP auf. Das Fusionsprotein ist weiterhin in den Chromozentren des Interphasekerns assoziiert

(Abbildung 16B). Die Doppelmutante $\Delta\text{CSD}+\Delta\text{C}$ -Ter weist eine veränderte Lokalisation des HP1-GFP auf, die mit der Verteilung der ΔCSD Deletionsmutante vergleichbar ist. Das Protein wird weiterhin in den Chromozentren detektiert. Es wird jedoch eine stärkere Bindung in euchromatischen Bereichen beobachtet (Abbildung 16B).

4.6.2. Mutationen der Chromo und Chromo Shadow Domäne beeinflussen die DNA-Methylierung

Die Deletion einer Domäne, oder das Einfügen von Punktmutationen, können epigenetische Modifikationen, wie Histonmodifizierungen oder DNA-Methylierung, beeinflussen. Für die Heterochromatisierung ist die H3K9 Trimethylierung eine essentielle Histonmodifizierung. In immunozytologischen Färbungen wird H3K9me3 in den heterochromatischen Chromozentren der Interphasekerne nachgewiesen (Abbildung 16C). Western Blot Analysen bekräftigen diese Ergebnisse. Somit ist in allen erzeugten HP1-GFP Fusionsproteinen die H3K9 Trimethylierung unverändert, da diese Modifikation durch die Histonmethyltransferase DIM5 katalysiert wird (Western Blots Anhang 8.5.).

Im Gegensatz dazu führt die Deletion der Chromo (ΔCD) und Chromo Shadow Domäne (ΔCSD) zum Verlust der DNA-Methylierung. In diesen Mutanten ist keine 5-Methylcytosinfärbung in den Interphasekernen mehr nachweisbar. Der Austausch von Aminosäuren Y85A, V87M, W107L, L251E und Y254A bewirkt ebenfalls ein Fehlen der DNA-Methylierung. $\Delta\text{CD}+\Delta\text{CSD}$ bekräftigt diese Ergebnisse (Abbildung 16D). Bei allen 4 Einzeldelentionsmutanten (ΔN -Ter, ΔHinge , ΔATh und ΔC -Ter) ist 5-MeC unverändert. Die beiden Doppelmutanten $\Delta\text{CD}+\Delta\text{ATh}$ und $\Delta\text{CSD}+\Delta\text{C}$ -Ter zeigen erwartungsgemäß einen Verlust der DNA-Methylierung. Diese Untersuchungen zeigen, dass Veränderungen in der Chromo und Chromo Shadow Domäne keinen Einfluss auf H3K9me3 nehmen, jedoch zum Verlust der DNA-Methylierung führen.

4.6.3. Die Chromo Shadow Domäne von HP1 ist essentiell für die Virulenz von *C. graminicola*

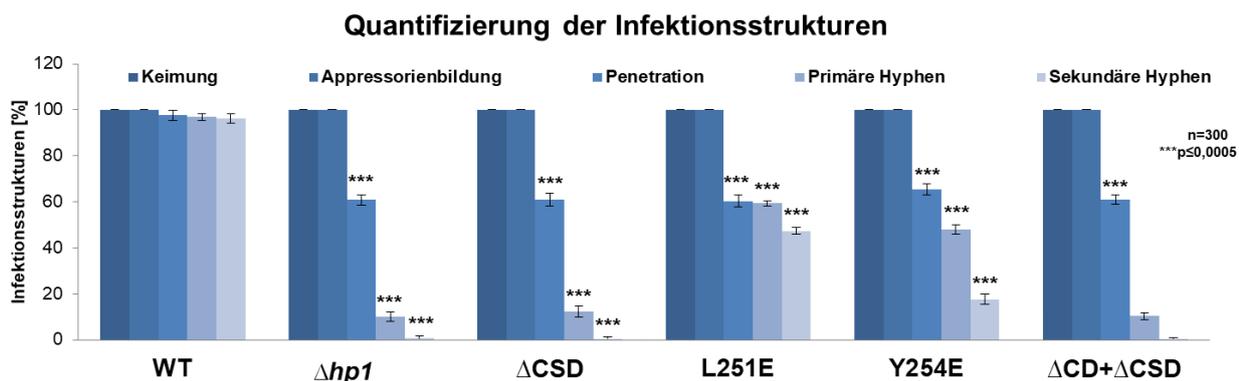
Blattinfektionsassays zeigen, dass die Chromo Domäne keinen Einfluss auf die Kontrolle der Pathogenität hat. Sowohl die Punktmutanten (Y85A, V87M, W107L), als auch die

Deletionsmutante ΔCD zeigen Wildtypvirulenz. Im Gegensatz dazu bewirkt die Deletion der Chromo Shadow Domäne einen Pathogenitätsdefekt, der dem von $\Delta hp1$ entspricht. Im Vergleich zum Wildtyp weist ΔCSD 4 Tage nach der Inokulation keine Blattnekrosen an den Inokulationsstellen auf (Abbildung 16E). $\Delta CD+\Delta CSD$ zeigt ebenfalls einen Phänotyp wie $\Delta hp1$.

Alle generierten Mutanten der Chromo Shadow Domäne haben im Vergleich zum Wildtyp eine um 40% verminderte Penetration (Abbildung 18A). Die Quantifizierung der Infektionsstrukturen belegen außerdem eine stark verringerte Bildung von Primärhyphen. Dieser Wert liegt mit 12,3% bei ΔCSD und 10,3% bei $\Delta CD+\Delta CSD$ im selben Bereich wie bei $\Delta hp1$ (Abbildung 18A). Diese Ergebnisse werden durch die quantitative Bestimmung der Biomasse bestätigt. Im Vergleich zum Wildtyp ist der Anteil an pilzlicher DNA in ΔCSD und $\Delta CD+\Delta CSD$ reduziert (Abbildung 18B). Nur der komplette Verlust der Chromo Shadow Domäne ist apathogen, da bei den Punktmutanten L251E und Y254E noch Läsionen zu beobachten sind. Diese sind im Vergleich zum Wildtyp jedoch schwächer ausgeprägt. Makroskopisch erscheint die Intensität der Läsion bei L251E stärker, als bei Y254E (Abbildung 16E). Dies spiegelt auch die Quantifizierung der Infektionsstrukturen wieder. 4 Tage nach der Inokulation sind bei L251E 60% Primärhyphen zu beobachten, während Y254E nur 48% Primärhyphen aufweist. Zudem können beide Mutanten auch nekrotrophe Sekundärhyphen ausbilden. Auch hier wird sichtbar, dass L251E mit 47,3% besser die Pflanze infizieren kann als Y254E mit nur 17,7% (Abbildung 18A). Die qPCR Daten zeigen ebenfalls, dass beide Punktmutanten im Vergleich zu ΔCSD oder $\Delta hp1$ deutlich mehr Biomasse auf infiziertem Blattmaterial bilden. Auch hier wird der Unterschied zwischen L251E mit ca. 0,5 μ g DNA und Y254E mit 0,3 μ g pilzlicher DNA deutlich (Abbildung 18B).

Die Deletionsmutanten ΔN -Ter, ΔC -Ter, $\Delta Hinge$, ΔATh und $\Delta CD+\Delta ATh$ zeigen keinen Einfluss auf die Pathogenität. Die Doppelmutante $\Delta CSD+\Delta C$ -Ter beeinflusst die Virulenz von *C. graminicola*, da in dieser Mutante die entscheidende Chromo Shadow Domäne deletiert ist (Abbildung 16E). Somit wird erneut bestätigt, dass die Chromo Shadow Domäne essentiell für die Pathogenität von *C. graminicola* auf dem Kultivar Mikado ist (Quantifizierung von $\Delta CSD+\Delta C$ -Ter (siehe Anhang 8.7.).

A



B

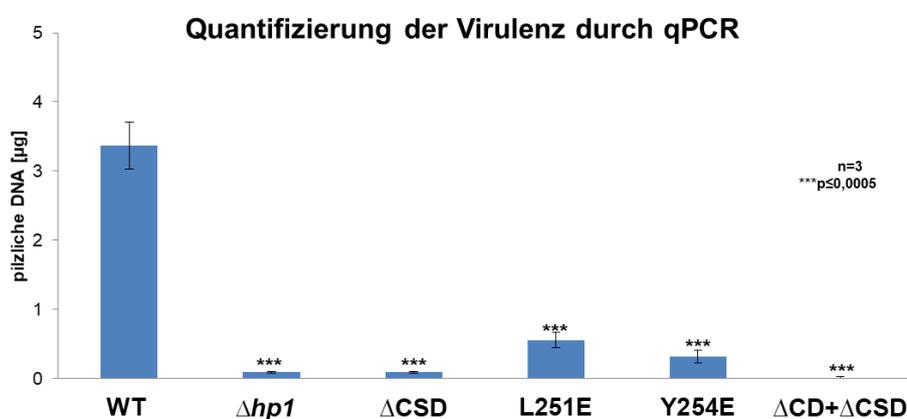


Abbildung 18: Die Chromo Shadow Domäne ist für die signifikant reduzierte Virulenz von *C. graminicola* bedeutend. (A) Quantifizierung der Infektionsstrukturen (4 dpi). (B) Quantifizierung der Virulenz mittels qPCR von infiziertem Blattmaterial 4 Tage nach der Inokulation. Signifikanz - t-Test: * $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,005$, * $\leq 0,0005$.**

4.6.4. HP1-GFP Mutanten beeinflussen das Wachstum von *C. graminicola* nicht

Wachstumsversuche alle erzeugten HP1-GFP Mutanten auf verschiedenen Medien weisen keine Beeinträchtigung in der Myzelbildung auf. Über einen Zeitraum von 9 Tagen wuchsen alle Pilze ca. 4 cm auf PDA. Auf OMA ist ein durchschnittliches Wachstum der meisten Mutanten von 3,5 cm zu beobachten. Lediglich Y85A weist mit 2,7 cm ein verringertes Wachstum um 0,7 cm im Vergleich zum Wildtyp auf. Die Deletion der Chromo Domäne (ΔCD) ist auf OMA um 0,3 cm reduziert. Auf Minimalmedium weisen V87M und W107L ein etwas besseres Wachstum auf. Alle anderen Mutanten und der Wildtyp bewuchsen im Durchschnitt die Kulturplatten um 1,8 cm (Abbildung 19).

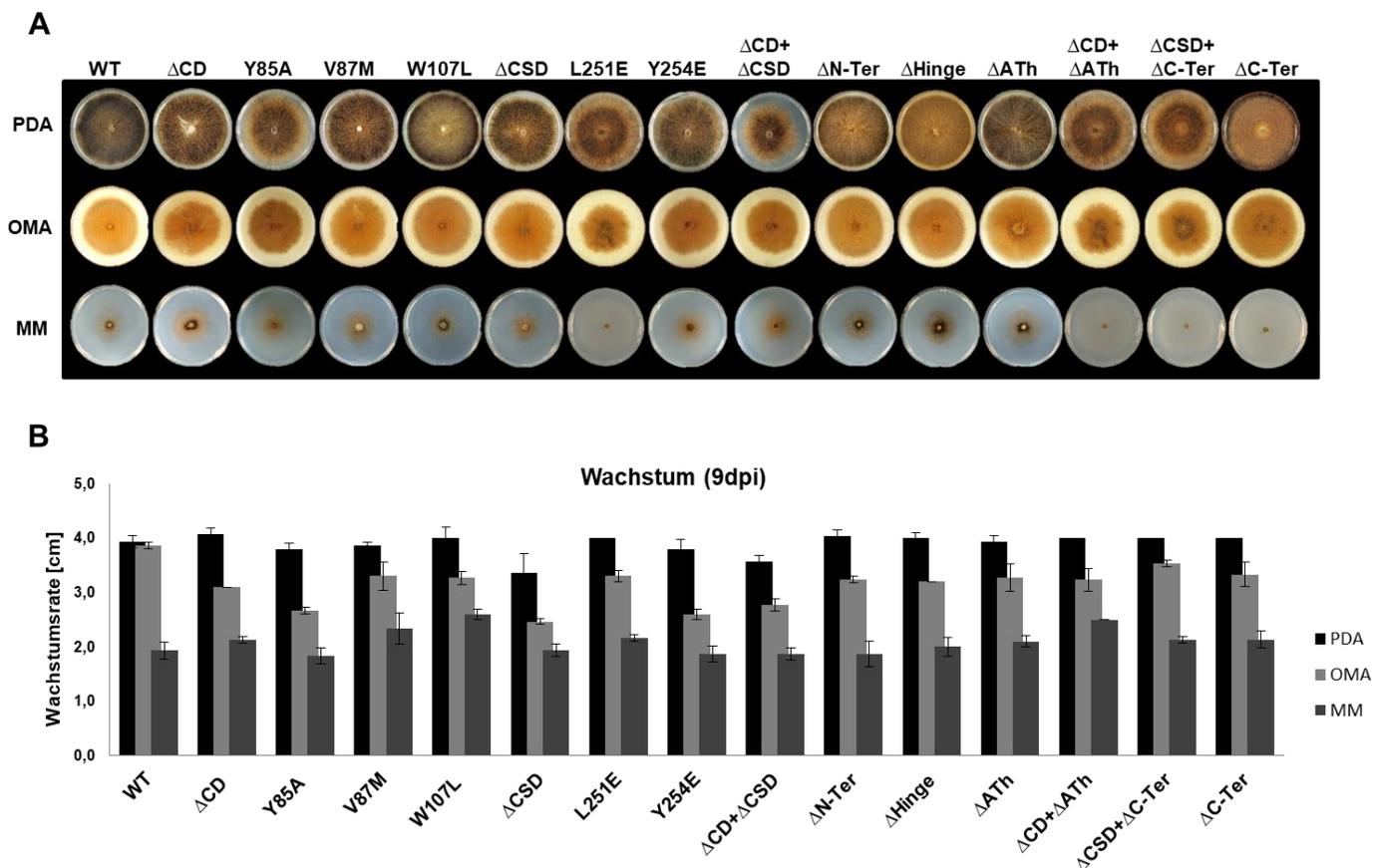


Abbildung 19: Mutationen des HP1 Proteins beeinflussen das Wachstum von *C. graminicola* nicht. (A) und (B) Wachstumsversuche auf verschiedenen Medien zeigen nach 9 Tagen keine signifikante Beeinträchtigung im Vergleich zum Wildtyp. PDA potato dextrose agar, OMA oat meal agar, MM Minimalmedium. Signifikanz - t-Test: * $p \leq 0,05$, ** $\leq 0,005$, * $\leq 0,0005$.**

4.7. Infektionsstudien auf verschiedenen Maiskultivaren, B73 und den Inzucht-Linien

Die Virulenz eines Pflanzenpathogen kann von mehreren Faktoren, wie biotische und abiotische Umweltbedingungen, beeinflusst werden. Aber auch die Suszeptibilität des Wirtes kann entscheidend für eine erfolgreiche Infektion des Pathogens sein (Poland et al. 2011). Es wurden weitere Infektionsstudien mit dem Wildtyp und $\Delta hp1$ durchgeführt, um die Pathogenität auf anderen Kultivaren und verschiedenen Standard-Inzucht-Linien zu untersuchen. Dazu wurden zuerst das Kultivar Golden Jubilee und die Linie B73 getestet. Auf dem Kultivar Golden Jubilee wird beim Wildtyp eine starke Infektion 4 Tage nach der Inokulation beobachtet. $\Delta hp1$ bildet auf diesem Kultivar ähnlich starke Symptome aus. Auch auf der Linie B73 besiedelt $\Delta hp1$ die Maisblätter. Jedoch sind die nekrotischen Blattflecken

nicht so stark ausgeprägt, wie beim Wildtyp (Abbildung 20A). Auszählungen der Infektionsstrukturen unterstützen diese Ergebnisse. 4 Tage nach Inokulation der Pflanzen bildet $\Delta hp1$ auf Golden Jubilee mit 90,7% annähernd die gleichen Mengen an Primärhyphen wie der Wildtyp. Die Ausbildung von 80,7% Sekundärhyphen auf diesem Kultivar bestätigt die makroskopischen Beobachtungen. Im Vergleich zu Golden Jubilee zeigt $\Delta hp1$ bei der Infektion von B73 eine Reduktion der Primärhyphenbildung um 30%. Auch werden nur 60% sekundäre Hyphen ausgebildet, was die schwächer erscheinende Infektion bekräftigt. Bei Infektion von Mikado weist $\Delta hp1$ nur ca. 10% Primärhyphen und 1% Sekundärhyphen auf. Auf Mikado zeigt $\Delta hp1$ in Vergleich zum Wildtyp eine verminderte Penetration. Auch bei B73 ist eine reduzierte Penetration (80%) zu beobachten, während Golden Jubilee gleich dem Wildtyp ist (Abbildung 20B). Die Keimungsrate und Appressorienbildung ist auf allen getesteten Maislinien, bzw. –Kultivaren unverändert (Anhang 8.9.). Somit ist die Virulenz von $\Delta hp1$ abhängig von der Suszeptibilität des jeweiligen Wirtes.

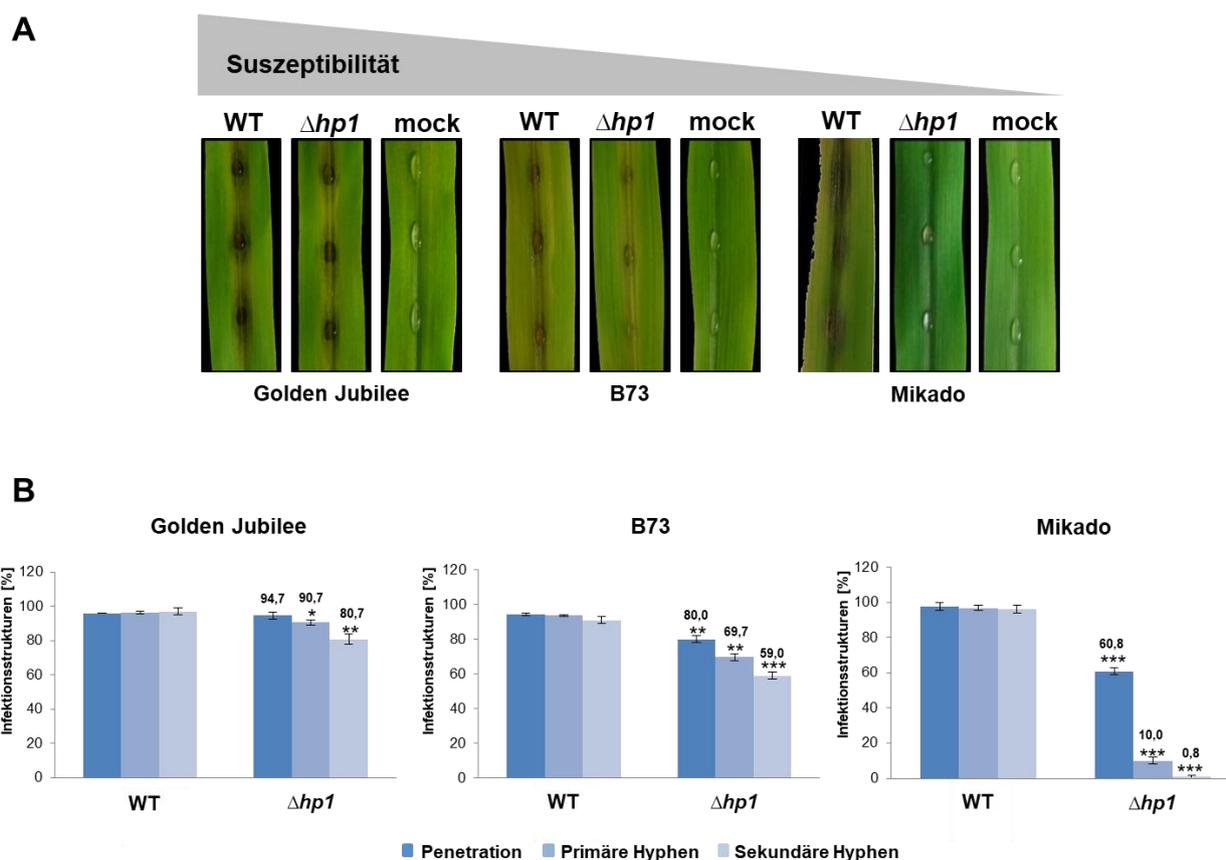


Abbildung 20: Infektionsstudien auf dem Maiskultivar Golden Jubilee, der Linie B73 und Mikado. (A) Blattinfektionsassays belegen, dass $\Delta hp1$ auf Golden Jubilee und B73 pathogen ist. Bilder von A. Mickel. **(B)** Quantifizierung der Infektionsstrukturen. Dokumentation der Symptome 4 Tage nach Inokulation auf den Maiskultivaren. Die Sporenkonzentration beträgt 1×10^6 Sporen/ml.

Die Arbeitsgruppe um Poland konnte zeigen, dass die Infektion des Pilzes *Setosphaeria turcica*, dem Erreger von *Northern leaf blight* (NLB-Blattfleckenkrankheit), auf verschiedenen Mais Inzucht-Linien unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Poland et al. 2011). Das Pathogen ist in der Lage, suszeptibler Linien, wie Oh7B und MS71, besser zu infizieren, als partiell resistentere Linien, wie CML247, bei denen keine Symptome zu beobachten sind (Poland et al. 2011). Um Aufschluss darüber zu erhalten, in wie weit pflanzliche Suszeptibilität eine Rolle spielt, wurden ebenfalls Infektionsstudien auf diesen Linien durchgeführt.

Tabelle 12: Verwendete Inzucht-Linien.

Inzucht-Linie	Nummer	Herkunft
Oh43	Ames19288	USA, Ohio
Oh7B	Ames19323	USA, Ohio
Tx303	Ames19327	USA, Texas
CML103	Ames27081	Mexico, Federal District
CML228	Ames27088	Mexico, Federal District
CML322	Ames27096	Mexico, Federal District
CML333	Ames27101	Mexico, Federal District
IL14H	Ames27118	USA, Illinois
Ki3	Ames27123	Thailand
Ki11	Ames27124	Thailand
Ky21	Ames27130	USA, Kentucky
M37W	Ames27133	South Africa, KwaZulu-Natal
Nc350	Ames27171	USA, North Carolina
Nc358	Ames27175	USA, North Carolina
CML69	Ames28184	Mexico, Federal District
P39 Godmann-Buckler	Ames28186	USA, Indiana
Tzi8	PI506245	Nigeria, Oyo
Mo18W	PI550441	USA, Missouri
B97	PI564682	USA, Iowa
HP301	PI587131	USA, Indiana
Ms71	PI587137	USA, Michigan
CML247	PI595541	Mexico, Federal District
CML277	PI595550	Mexico, Federal District
CML52	PI595561	Mexico, Federal District

Insgesamt wurden 22 amerikanische Inzucht-Linien mit *C. graminicola* infiziert (Tabelle 12). Im Gegensatz zu *Setosphaeria turcica* ist *C. graminicola* auf allen Linien pathogen. Es existieren sechs Linien, CML333, Ky21, CML103, CML225, CML69 und CML247, bei denen eine schwächere Infektion 4 Tage nach der Inokulation der Pflanzen, beobachtet wird (Abbildung 21). Auch zu einem späteren Zeitpunkt sind die nekrotischen Blattflecken nie so stark ausgeprägt wie beim Referenzkultivar Mikado. Betrachtet man die Pathogenität von $\Delta hp1$, so fällt auf, dass diese Mutante auf den Linien CML333, Tx303, CML103, CML228, CML332, CML69 und CML247 apathogen ist (Abbildung 21). Auf den Linien MS71, Mo18W und Ky21 zeigt $\Delta hp1$ eine verzögerte Infektion, da erste Symptome erst 5 bis 6 Tage nach der Inokulation auftreten. Weitere Infektionen belegen, dass $\Delta hp1$ auf 11 Linien pathogen ist. Um einen Einblick darüber zu erhalten, ob epigenetische Kontrollfaktoren eine veränderte Virulenz auf den unterschiedlich suszeptiblen Inzucht-Linien aufweisen, wurden die Pflanzen mit einer weiteren Deletionsmutante, $\Delta e(Z)$ infiziert, welche keinen Pathogenitätsdefekt auf Mikado zeigt (Abbildung 21). Diese Mutante weist auf fünf Inzucht Linien (CML333, Ky21, Oh43, Tx303, CML322 und Ki11) eine verzögerte Infektion auf. Interessanterweise werden die Linien Oh43 und Ki11 vom Wildtyp und $\Delta hp1$ infiziert, während $\Delta e(Z)$ auf diesen Linien nur schwache Symptome ausbildet. Auf den Linien CML103 und CML247 ist diese Mutante apathogen (Abbildung 21).

Diese Ergebnisse zeigen ein komplexes Wechselspiel zwischen der epigenetischen Kontrolle der Virulenz von *C. graminicola* und der pflanzenabhängigen Abwehr. Die Virulenz eines Pathogens ist somit signifikant von der Suszeptibilität der Wirtspflanze abhängig.

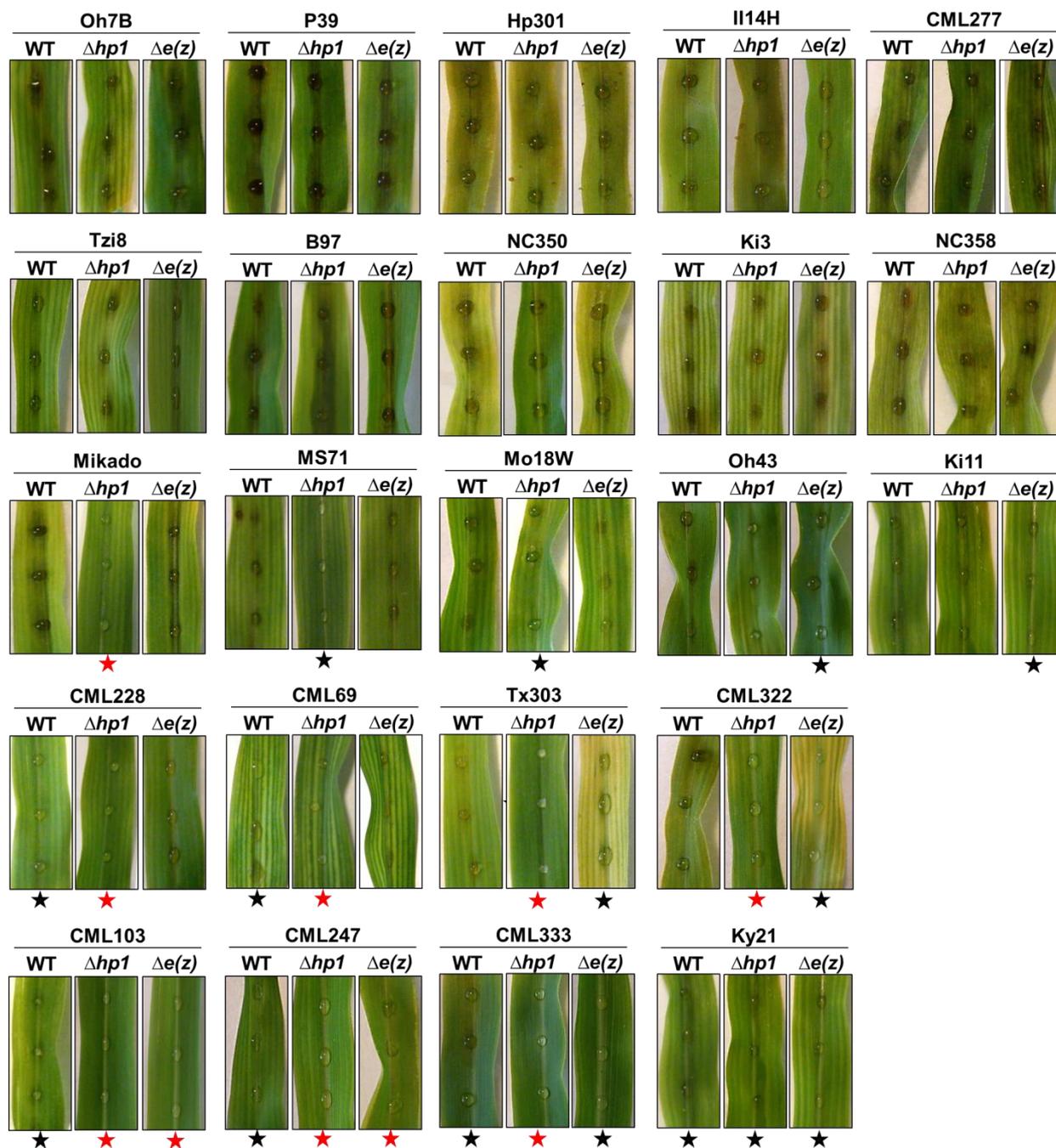


Abbildung 21: Infektionsstudien auf verschiedenen Inzucht-Linien. Dokumentation der Symptome 4 Tage nach Inokulation auf den Inzucht-Linien. **roter Stern** - apathogen, **schwarzer Stern** - verzögerte Infektion. Die Sporenkonzentration beträgt 1×10^6 Sporen/ml

5. Diskussion

5.1. *Colletotrichum graminicola* als Modellorganismus für epigenetische Analysen

Colletotrichum graminicola, der Erreger der Anthraknose an Mais ist ein ökonomisch wichtiges Pathogen. Aufgrund seiner guten genetischen Manipulierbarkeit, stellt *C. graminicola* ein Modellorganismus dar, an welchem zahlreiche Studien zum Infektionsprozess durchgeführt wurden. Bislang erfolgten jedoch keine epigenetischen Untersuchungen an diesem Organismus. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob *C. graminicola* ein geeigneter Pilz für epigenetische Analysen ist, wurden erste zytologische Experimente durchgeführt. Dabei standen unter anderem die Verteilung von Heterochromatin in Interphasekernen, sowie epigenetische Prozesse zur Bildung von Heterochromatin im Mittelpunkt der Analysen.

1928 erkannte Emil Heitz die zytologisch nachweisbare Längsdifferenzierung von Chromosomen in Eu- und Heterochromatin, die mit der genetischen Linearität korreliert. Diese neuen zytologischen Merkmale interpretierte er erstmals als das genetisch inaktive Heterochromatin und das genetisch aktive Euchromatin und prägte sie als neue epigenetische Einheit (Heitz 1928). In weiteren Analysen zeigte er, dass das Heterochromatin von Teilen der Chromosomen als Chromozentren in Interphasekernen sichtbar bleibt (Heitz 1928; Heitz 1929; Passarge 1979). Heterochromatin ist vorwiegend in den perizentromeren Bereichen der Chromosomen und Telomeren lokalisiert. Heterochromatische Regionen können mit Hilfe verschiedener DNA-Farbstoffe im Zellkern sichtbar gemacht werden. Vergleichende Analysen führen zur Identifizierung prinzipieller Unterschiede in der Verteilung von Heterochromatin in Interphasekernen. Dabei werden drei Typen der Heterochromatinverteilung in Interphasekernen unterschieden: der Gradiententyp, der Chromozentertyp und der diffuse Typ (Fukui & Nakayama 1996). *A. thaliana* ist ein Modellorganismus, bei dem heterochromatische Chromatinbereiche deutlich als Chromozentren zu erkennen sind. Diese Form der Chromatinorganisation in Interphasekernen wird als Chromozentren-Typ bezeichnet (Fukui & Nakayama 1996). In Pilzen werden alle drei Typen der Heterochromatinverteilung in Interphasekernen gefunden. Umfangreiche zytologische Analyse von 17 verschiedenen Ascomyceten zeigen, dass *C. graminicola* eine Besonderheit in der Organisation von Heterochromatin in dieser

Klasse darstellt. In den Interphasekernen von *C. graminicola* wird eine Chromozentrenorganisation von Heterochromatin gefunden. Diese Chromozentrenorganisation des Interphasekerns wurde nur noch bei *L. maculans* beobachtet. In den anderen Arten ist oft nur eine diffuse Verteilung von Heterochromatin zu erkennen, mit einzelnen stark angefärbten Bereichen, die auf Chromozentren hinweisen. Somit stellt *C. graminicola* ein besonders geeignetes experimentelles System für die Untersuchung der epigenetischen Kontrolle von Heterochromatin bei Pilzen dar.

Epigenetische Histonmodifizierungen indizieren heterochromatische Bereiche in verschiedenen Organismen. Sowohl bei *Drosophila*, als auch in Säugern wurden konservierten molekularen Mechanismen für heterochromatisches Gensilencing identifiziert, welche eine zentrale Rolle bei der Bildung von heterochromatischen Chromatinzuständen spielen. Kovalente Modifikationen am N-Terminus der Histone regulieren die Chromatinstruktur und definieren epigenetische Markierungen für die Transkriptionskompetenz während der Entwicklung (Rudolph et al. 2007). Dabei ist die Methylierung von Histon H3 am Lysin 9 eine wichtige Modifizierung für konstitutives Heterochromatin. Bei *Drosophila* ist dieses durch H3K9me1 und H3K9me2 definiert, während H3K9me3 nur wenig gefunden wird (Schotta et al. 2002; Ebert et al. 2004; Ebert et al. 2005). Bei *A. thaliana* werden alle drei Methylierungsstufen am Lysin 9 nachgewiesen. Genau wie bei *Drosophila*, ist Heterochromatin bei *A. thaliana* durch H3K9me1 und H3K9me2 gekennzeichnet. H3K9me3 wird vorwiegend im Euchromatin gefunden (Naumann et al. 2005). Im Gegensatz dazu wird in Säugern perizentrisches Heterochromatin überwiegend durch H3K9me3 definiert, welches durch die Histonmethyltransferasen SUV39H1 und SUV39H2 kontrolliert wird (Peters et al. 2003). Bei *C. graminicola* wird perizentrisches Heterochromatin ebenfalls durch H3K9me3 definiert. H3K9me1 und H3K9me2 konnte immunozytologisch nicht nachgewiesen werden. Massenspektrometrische Analysen deuten aber darauf hin, dass beide Modifikationen in geringem Ausmaß vorkommen und vermutlich als Zwischenprodukt gebildet werden, um die H3K9 Trimethylierung aufzubauen. Das Vorhandensein von H3K9me3 lässt darauf schließen, dass Pilze evolutionär näher mit tierischen Organismen verwandt sind, als mit Pflanzen, da auch in anderen untersuchten Asco- und Basidiomyceten H3K9me3 die vorherrschende Modifikation für Heterochromatin ist. In allen analysierten Pilzen wurde außerdem nur selten H3K9me1 und H3K9me2 nachgewiesen. Interessanterweise können bei dem Oomyceten *Phytophthora infestans* alle drei Stufen der H3K9 Methylierung

detektiert werden. Oomyceten zeigen somit die für Pflanzen typische Indizierung von Heterochromatin. Um diesen Beobachtungen jedoch zu bekräftigen, müssten bei weiteren Oomyceten, Basidio- und Ascomyceten die H3K9 Methylierung analysiert werden.

Bei *Drosophila* wird perizentrisches Heterochromatin durch H3K9me1 und H3K9me2, sowie allen drei Methylierungsstufen von H3K27 markiert. H3K27 ist sowohl im Eu-, als auch im Heterochromatin zu finden (Ebert et al. 2004). Bei Maus sind nur H3K27me1 und H3K9me3 im perizentrischen Heterochromatin angereichert (Peters et al. 2003). Auch bei *A. thaliana*, sind H3K9me1 und H3K9me2, aber nur H3K27me1 und H3K27me2 heterochromatische Modifizierungen, während H3K27me3 im Euchromatin lokalisiert ist. Dies wurde auch in den Interphasekernen von *C. graminicola* beobachtet. Somit sind die Histonmodifizierungen H3K27me1 und H3K27me2 an der heterochromatischen Indizierung von *C. graminicola* beteiligt, während H3K27me3 vorwiegend in euchromatischen Bereichen nachweisbar ist. Bei *Drosophila* und bei Maus wird perizentrisches Heterochromatin zusätzlich durch H4K20me3 definiert (Peters et al. 2003; Ebert et al. 2004). Im Gegensatz dazu ist bei *A. thaliana* H4K20me3 und auch H4K20me2 nur im Euchromatin zu finden. Bei diesem Organismus ist H4K20me1 eine typische Modifikation für Heterochromatin (Naumann et al. 2005). Bei *C. graminicola* ist offensichtlich auch H4K20me1 an der Etablierung des Heterochromatins beteiligt, da diese Modifikation auch im Heterochromatin angereichert ist, während H4K20me2 und H4K20me3 ausschließlich in euchromatischen Bereichen detektiert werden. Zusammenfassend konnte für *C. graminicola* gezeigt werden, dass H3K9me3, H3K27me1 und H3K27me2, sowie H4K20me1 mit der heterochromatischen Indizierung kausal verbunden sind. Diese detaillierten Untersuchungen ergeben auch, dass *C. graminicola* ein Modellorganismus für die Analyse epigenetischer Mechanismen bei Ascomyceten ist. Des Weiteren wird deutlich, dass die Indizierung von perizentrischem Heterochromatin bei Maus, *Drosophila*, *A. thaliana* und *C. graminicola* nicht völlig übereinstimmen. Sowohl in der eu- und heterochromatischen Verteilung, als auch in dem Vorhandensein von einzelnen Histonmodifikationen gibt es zwischen diesen Organismen deutliche Unterschiede.

Die epigenetische Kontrolle von heterochromatischen Chromatinzuständen wird weiterhin durch verschiedene Proteine reguliert. H3K9me2 und H3K9me3 wird bei *Drosophila* beispielsweise durch die Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 katalysiert. Die SUV4-20 Histonmethyltransferase bei Maus und *Drosophila* reguliert die Trimethylierung von H4K20 und E(Z) ist für die H3K27 Methylierung verantwortlich (Peters et al. 2003; Ebert et al.

2004). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese Proteine in den unterschiedlichen Organismen evolutionär konserviert sind. Sequenzvergleiche mit anderen Organismen zeigen, dass auch bei *C. graminicola* all diese wichtigen Histonmethyltransferasen vorhanden sind.

5.2. Heterochromatinbildung bei *Colletotrichum graminicola*

Die Organisation des Chromatins in Strukturen höherer Ordnung beeinflussen die Chromosomenfunktion und die epigenetische Genregulation. Veränderungen in der Chromatinstruktur höherer Ordnung werden mit kovalenten Modifikationen an Histonschwänzen in Verbindung gebracht, welche transkriptionell aktive oder inaktive Zustände des Chromatins regulieren und somit die Chromosomenkondensation beeinflussen (Rea et al. 2000; Lachner et al. 2004). Das stark kondensierte Heterochromatin in Pilzen teilt molekulare Merkmale mit dem Heterochromatin in höheren Eukaryoten. A:T-reiche, repetitive DNA, H3K9 Methylierung, das Heterochromatin Protein 1 (HP1) und DNA-Methylierung sind Faktoren, die für den Aufbau von Heterochromatin essentiell sind (Lewis et al. 2010). Bei *N. crassa* wurde zusätzlich noch ein weiterer Faktor, DIM-7, identifiziert, der für Heterochromatinbildung wichtig ist (Lewis et al. 2010). Auch bei *C. graminicola* konnten entsprechende homologe Proteine gefunden werden. Das Zusammenspiel aller genannten Proteine ist entscheidend für die Kondensation des Chromatins.

Für die Bildung von perizentrischen Heterochromatin spielt die H3K9 Histonmethyltransferase SU(VAR)3-9 eine wichtige Rolle. Rea et al. 2000, zeigten erstmals, dass das humane SUV39H1 Protein eine H3K9 Histonmethyltransferaseaktivität besitzt. Das homologe SU(VAR)3-9 Protein ist bei *Drosophila* die Haupt-H3K9 Histonmethyltransferase (Schotta et al. 2002). Mittels immunozytologischer Färbungen konnte gezeigt werden, dass SU(VAR)3-9 in den heterochromatischen Chromozentren, an den Telomeren und auch in einigen euchromatischen Bereichen detektierbar ist. Dieses Protein ist bei *Drosophila* eine spezifische H3K9 Histonmethyltransferase, da in SU(VAR)3-9 Nullmutanten eine stark reduzierte H3K9 Methylierung in den heterochromatischen Chromozentren zu beobachten ist (Schotta et al. 2003). Studien bei Pilzen, wie *N. crassa* zeigen, das NcDIM-5, welches ein SU(VAR)3-9 Homolog ist, für die H3K9 Trimethylierung

verantwortlich ist. Bei der *dim-5* Mutante wurde mittels ChIP über verschiedene Bereiche des Genoms eine reduzierte H3K9me3 gefunden (Tamaru et al. 2003). Auch bei *L. maculans* kommt es zu einer Reduktion von H3K9me3 in einem stillgelegten LmDIM5 Hintergrund (Soyer et al. 2014). Bei *C. graminicola* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Enzym CgDIM5 eine H3K9 Histonmethyltransferase-Funktion besitzt, da ein Verlust von H3K9me3 in den $\Delta dim5$ Deletionsstämmen beobachtet wird. Die Analysen bei den verschiedenen Organismen belegen somit, dass SU(VAR)3-9 homologe Proteine eine zentrale Funktion bei der Heterochromatinbildung besitzen.

Untersuchungen bei *N. crassa* zeigen, dass die H3K9 Trimethylierung in Zusammenhang mit der DNA-Methylierung steht. Mutationen in *dim-5* führen dazu, dass keine DNA-Methylierung an den untersuchten Loci detektiert werden kann. Nullmutanten für *dim-5* führen wie eine Nullmutante der DNA-Methyltransferase *dim-2* zum Verlust der DNA-Methylierung (Tamaru & Selker 2001; Freitag et al. 2004; Kouzminova & Selker 2001). Ein ähnliches Ergebnis ist auch bei *C. graminicola* zu beobachten. Bei $\Delta dim5$ wird zytologisch keine DNA-Methylierung mehr nachgewiesen und in der Massenspektrometrie sind nur noch 0,06% aller Cytosine methyliert. Beim Wildtyp wird eine Methylierung von 1,1% aller Cytosine massenspektroskopisch nachgewiesen. Bei Mäusen wird im perizentrischen Heterochromatin H3K9me3 angereichert. Diese Methylierung wird durch die HMTasen, Suv39h1 und Suv39h2 katalysiert. In Doppel-Null Mutanten wird in embryonalen Stammzellen ebenfalls ein Verlust der DNA-Methylierung beobachtet (Lehnertz et al. 2003). Auch bei Pflanzen, wie *A. thaliana* wurde ein ähnlicher Mechanismus beschrieben. Bei einem Mutanten-Screen am Locus SUPERMAN wurde das Gen KRYPTONITE identifiziert. Dieses kodiert für die H3K9 Methyltransferase SUVH4. Mutanten, mit einem Loss-of-Function *kryptonite*-Allele ähneln Mutanten des DNA-Methyltransferasegens *CHROMOMETHYLASE3 (CMT3)*. In beiden kommt es zu einem Verlust der Cytosin-Methylierung im CpNpG Motiv. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die CpNpG DNA-Methylierung über die Interaktion von CMT3 der H3K9 Histonmethyltransferase SUVH4 gesteuert wird (Jackson et al. 2002). Diese Untersuchungen zeigen, dass die DNA-Methylierung sowohl bei Säugern, als auch bei Pflanzen und Pilzen von der H3K9 Methylierung abhängig ist.

Neben der H3K9 Methylierung ist auch die DNA-Methylierung eine typische epigenetische Markierung von Heterochromatin. DNA-Methyltransferasen katalysieren die Methylierung der Cytosine. Bei Mensch und Maus wurden vier DNA MTasen: DNMT1, DNMT2, DNMT3a und DNMT3b gefunden. Dabei katalysiert DNMT1 die „Maintenance“ Methylierung, während DNMT3a und DNMT3b für die *de novo* Methylierung verantwortlich sind (Li et al. 1992; Lei et al. 1996; Okano et al. 1999). Bei Pilzen wurden ebenfalls DNMT1 Methyltransferasen gefunden, jedoch keine DNMT3 Homologe (Jeon et al. 2015). Genomweite Analysen bei *N. crassa* zeigen, dass DIM-2 für die gesamte DNA-Methylierung in diesem Organismus verantwortlich ist (Selker et al. 2003; Lewis et al. 2010; Honda et al. 2010). Phylogenetische Analysen bei *M. oryzae* belegen, dass dieser Pilz zwei Proteine mit einer DNMTase Domäne, MoDIM-2 und MoRID, besitzt, wobei MoRID ein Homolog zu RID aus *N. crassa* darstellt. Detailliertere Sequenzvergleiche mit weiteren Ascomyceten decken auf, dass das Vorhandensein zweier DNA-Methyltransferasen für Pilze der Unterabteilung Pezizomycotina üblich ist. Die beiden Homologe CgDIM2-1 und CgDIM2-2 bei *C. graminicola*, wobei letzteres das RID-Homolog ist, unterstützen diese Aussage von Jeon et al. 2015. *M. oryzae* weist nur 0,2% DNA-Methylierung auf, während es bei *A. flavus* noch umstritten ist, ob überhaupt eine Methylierung der Cytosine erfolgt. Gowher et al. 2000 fanden 0,04% DNA-Methylierung, während Liu et al. 2012 mittels genomweiter Bisulfit-Sequenzierung keine Methylierung bei *A. flavus* detektieren konnten (Gowher et al. 2001; Liu et al. 2012). Bei *N. crassa* sind etwa 1,5% aller Cytosine methyliert. In der *dim-2* Mutante von *N. crassa* wird hingegen keine DNA-Methylierung mehr detektiert (Foss et al. 1993). Mittels Massenspektrometrie konnte bei *C. graminicola* gezeigt werden, dass ca. 1,16% aller Cytosine methyliert sind. Die Deletion von *CgDIM2-1* führt zytologisch ebenfalls zum Verlust der DNA-Methylierung, während bei $\Delta dim2-2$ ein Signal gleich dem Wildtyp beobachtet wird. Die Massenspektrometrie belegt, dass es zu einer starken Reduktion an methylierter Cytosine bei $\Delta dim2-1$ kommt. Es werden nur noch 0,17% DNA-Methylierung gefunden. Der Doppelknockout beider Gene $\Delta dim2-1\Delta dim2-2$ führt ebenfalls zum Verlust der DNA-Methylierung. Genomweite Bisulfit-Sequenzierung von *C. graminicola* bestätigen, dass sowohl bei $\Delta dim2-1$ und dem Doppelknockout keine DNA-Methylierung mehr detektierbar ist (G. Hönig, nicht publiziert). Ähnliche Ergebnisse wurde auch bei *M. oryzae* erhalten. Bei diesem Ascomyceten führt die Deletion von *MoDIM-2* zum Verlust der DNA-Methylierung. Bisulfitdaten zeigen, dass nur 4500 Stellen methyliert sind, während beim Wildtyp ca. 46000 Stellen gefunden wurden. Jeon et al. 2015 postulieren, dass MoDIM-2 als Hauptmethyltransferase in diesem Organismus agiert. Jedoch haben diese Analysen

auch gezeigt, dass für die Methylierung von Cytosinen beide Methyltransferasen benötigt werden (Jeon et al. 2015). Vergleichbar zu *M. oryzae* konnte auch bei *C. graminicola* in der $\Delta dim2-1$ Mutante eine geringe Menge an DNA-Methylierung gefunden werden, während in $\Delta dim2-1\Delta dim2-2$ kein 5-Methylcytosin mehr nachweisbar ist. Vermutlich tragen auch bei *C. graminicola* beide DNA-Methyltransferasen zur Cytosinmethylierung bei. CgDIM2-2 scheint aber nur vereinzelt noch Cytosine zu methylieren. Damit sind die Ergebnisse aus *M. oryzae* und *C. graminicola* verschieden zu denen in *N. crassa*, wo postuliert wird, dass alleine das DNMT1-homologe DIM-2 für die gesamte Methylierung der Cytosine verantwortlich ist (Kouzminova & Selker 2001).

Bei *N. crassa* wurden zuerst einzelne Gene identifiziert, welche den Aufbau des Heterochromatins kontrollieren (Selker et al. 2003; Lewis et al. 2009). Für die systematische Analyse zur Identifizierung weiterer Gene, wurde bei *N. crassa* ein neues genetisches Selektionssystem etabliert. Dazu wurden Stämme generiert, welche zwei Reporter-Gene enthalten, die durch das Vorhandensein von DNA-Methylierung im Organismus stillgelegt sind. Diese Stämme wurden einer UV-Mutagenese unterzogen. Können beide Reporter-Gene reaktiviert werden, so kann von einem Defekt in der DNA-Methylierung ausgegangen werden. Diese Mutanten wurden anschließend genauer untersucht (Lewis et al. 2010). In diesem Experiment wurde bei *N. crassa* das Gen *DIM-7* identifiziert. BLAST Analysen zeigen, dass Homologe nur in Pilzen gefunden werden (Lewis et al. 2010). Genauere Analysen einer Deletionsmutante $\Delta dim-7$ zeigen, dass dieses Protein bei *N. crassa* im Aufbau von Heterochromatin involviert ist. Ein Verlust von DIM-7 führt dazu, dass keine H3K9 Trimethylierung und keine DNA-Methylierung mehr detektiert werden kann (Lewis et al. 2010). Auch bei *C. graminicola* ist DIM7 für H3K9me3 und DNA-Methylierung essentiell. In der $\Delta dim7$ Deletionsmutante wird identisch zu *N. crassa* ein Verlust von H3K9me3 beobachtet (Lewis et al. 2010). DamID Analysen bei *N. crassa* zeigen eine Heterochromatinassoziation von DIM-5. Das Protein DIM-7 kontrolliert die Rekrutierung von DIM-5, um den DCDC-Komplex zu bilden. Dieser Komplex besteht aus fünf Proteinen (DIM-5, DIM-7, DIM-9, Cul4 und DDB1 (DIM-8)), welche für die Etablierung von H3K9me3 essentiell sind. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass nur DIM-7 für die Assoziation von DIM-5 mit heterochromatischen Regionen benötigt wird (Lewis et al. 2010). Ob DIM7 bei *C. graminicola* eine ähnliche Funktion übernimmt lässt sich nur vermuten. Da alle Proteine des DCDC-Komplexes in der Genomsequenz von *C. graminicola* vorhanden sind, wäre dies jedoch sehr wahrscheinlich. Erste Analysen einer $\Delta dim8$ Deletionsmutante

von *C. graminicola* belegen, dass dieses Protein auch an der Regulation der H3K9 Trimethylierung beteiligt ist (J.Copus-Winston, nicht publiziert).

Für das Silencing von genomischen Bereichen fungiert das Heterochromatin Protein 1 (HP1) bei vielen Organismen als Bindeglied zwischen H3K9me3 und der DNA-Methylierung (Lewis et al. 2010). Ein Verlust des HP1-Proteins führt bei *N. crassa* zum Verlust der DNA-Methylierung. Southern Blot Analysen mit methylierungssensitiven Enzymen zeigen in den *hpo* Mutanten keine DNA-Methylierung in den untersuchten Regionen (Freitag et al. 2004). Auch bei *C. graminicola* hat die Deletion von *CgHP1* einen Verlust der DNA-Methylierung zur Folge. Immunozytologische Färbungen zeigen keine detektierbaren Signale für 5-MeC. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch die Massenspektrometrie. Bei $\Delta hp1$ Mutanten sind nur noch 0,1% aller Cytosine methyliert.

Um die genaue Funktion von CgHP1 bei *C. graminicola* zu analysieren, wurden neben der $\Delta hp1$ Deletionsmutante weitere Mutanten generiert, bei denen Deletionen der Chromo oder Chromo Shadow Domäne, sowie Aminosäureaustausche eingefügt wurden. Um auch Veränderungen in der Lokalisation des Proteins zu beobachten, wurden eGFP Fusionskonstrukte genutzt. HP1-GFP im Wildtyp zeigt eine typische heterochromatische Lokalisation des Proteins. Bei der Maus ist HP1 α vorwiegend im perizentrischen Heterochromatin lokalisiert, während HP1 β und HP1 γ sowohl in heterochromatischen als auch euchromatischen Bereichen zu finden ist. Bei *A. thaliana* hingegen ist LHP1 ausschließlich im Euchromatin lokalisiert (Maison & Almouzni 2004; Freitag et al. 2004; Libault et al. 2005; Honda & Selker 2008).

Die Chromo Domäne ist eine evolutionär konservierte Domäne des HP1 Proteins. Studien bei der Maus und *D. melanogaster* belegen, dass Mutationen in dieser Domäne eine Reduktion des Gensilencings hervorrufen (Liu & Zhang 2006). Die Chromo Domäne ist auch essentiell für HP1 und den Aufbau von Heterochromatin bei *C. graminicola*. Eine Deletion (ΔCD) führt zu einer uniformen Verteilung des Proteins im Zellkern. Auch ist ein Verlust der DNA-Methylierung bei dieser Mutante zu beobachten. Bei *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass insbesondere die Positionen 24 und 26 (Y24 und V26) in der Chromo Domäne von HP1 wichtig sind. Beide Aminosäureaustausche Y24F und V26M verändern die Gensilencing Funktion des HP1 Proteins. V26 ist die Bindestelle für trimethyliertes H3K9. Durch den Aminosäureaustausch wird die Stabilität der Chromo Domäne beeinflusst, was zur Folge hat, dass kein H3K9me3 mehr gebunden werden kann (Jacobs et al. 2001).

Die Erkennung und Bindung dieser Modifikation ist auch wichtig, damit DNA-Methylierung im Heterochromatin über HP1 vermittelt werden kann (Jacobs et al. 2001; Lewis et al. 2010). Bei *C. graminicola* besitzt diese Aminosäure die gleiche Funktion wie bei *D. melanogaster*. Die Punktmutante V87M führt zu einem Verlust der Heterochromatinbindung von HP1 und zum Verlust der DNA-Methylierung. Auch Y85A scheint Einfluss auf die H3K9me3-Bindung zu besitzen, weil diese Mutante den gleichen Phänotyp aufweist wie V87M.

Interaktionsstudien zwischen dem H3 Histonschwanz und der Chromo Domäne des HP1 Proteins von *D. melanogaster* zeigen, dass die Tryptophane 24, 45 und 48 in dieser Domäne für die Bindung von H3K9me3 wichtig sind. Mutationen dieser Tryptophane setzt die Bindungsaffinität mit dem H3 Histonschwanz herab. Ein Austausch zu Leucin führt sogar dazu, dass kein H3K9me3 mehr gebunden werden kann (Jacobs et al. 2002). Eine uniforme Verteilung des HP1 Proteins bei der Punktmutante W107L von *C. graminicola* und der damit verbundene Verlust der DNA-Methylierung lässt vermuten, dass auch Tryptophan 107 eine entscheidende Rolle für die Stabilität und wahrscheinlich auch für die Bindungsaffinität der Chromo Domäne zu H3K9me3 spielt. Um dies genauer zu untersuchen, müssten ebenfalls *in vitro* Interaktionsstudien durchgeführt werden.

Die zweite wichtige Domäne von HP1 ist die Chromo Shadow Domäne. Diese Domäne kann mit einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen, wie z.B. p150, der Untereinheit des Chromatin Assembly Faktors 1 (CAF-1) aus Maus, oder der DNA-Methyltransferase DIM-2 aus *N. crassa* interagieren (Thiru et al. 2004; Honda & Selker 2008). Für diese Interaktion ist ein PXXVL Pentapeptide Motiv der Interaktionspartner entscheidend. Untersuchungen bei der Maus belegen, dass die Chromo Shadow Domäne des HP1 β -Protein zusammen mit den Interaktionspartnern und der Erkennung von H3K9me3 für die Heterochromatisierung benötigt wird (Thiru et al. 2004). Die Chromo Shadow Domäne von HP1 ist auch für die heterochromatische Lokalisation des Proteins verantwortlich. Konstrukte, welche nicht die komplette Domäne besitzen, sind auch nicht mehr im Heterochromatin lokalisiert. Veränderungen in der Chromo Shadow Domäne bei der Maus beweisen, dass HP1 β nicht mehr ausschließlich im Heterochromatin lokalisiert ist, sondern eine uniforme Verteilung im Kern besitzt (Aasland & Stewart 1995; Thiru et al. 2004). Bei *C. graminicola* führt die komplette Deletion der Chromo Shadow Domäne (Δ CSD) ebenfalls zu einer veränderten Lokalisation des Proteins. Δ CSD ist noch in den Foci der Chromozentren zu beobachten, aber im Vergleich zum Wildtyp wird eine deutlich Anreicherung des

Proteins im Euchromatin gefunden. Bei *N. crassa* führt der Aminosäureaustausch Y244E ebenfalls zu einer veränderten Verteilung von HP1 in euchromatische Bereiche (Honda & Selker 2008). Bei *C. graminicola* sind beide Punktmutanten L251E und Y254E, vermehrt im Euchromatin lokalisiert, was die Theorie bekräftigt, dass auch die komplette Chromo Shadow Domäne für eine korrekte Lokalisation des Proteins benötigt wird. Da im Gegensatz zu *N. crassa* bei diesen Mutanten noch heterochromatische Bereiche beobachtet werden, ist die Chromo Shadow Domäne von *C. graminicola* nicht alleine für die Lokalisierung des Proteins verantwortlich (Honda & Selker 2008). Bei diesem Ascomyceten ist primär die Chromo Domäne für die Heterochromatinbindung des HP1-Proteins wichtig.

Studien zeigen, dass HP1 Proteine Dimere bilden, um eine Bindungstasche für die PXVXL-Motive anderer interagierender Proteine zu bilden. Bevor dies gesehen kann, muss das Protein mit sich selbst interagieren, was durch die Chromo Shadow Domäne vermittelt wird (Cowieson et al. 2000; Brasher et al. 2000). Bei Maus führt der Aminosäureaustausch von Tyrosin zu Glutaminsäure (Y164E) dazu, dass die Dimerisierung des HP1 herabgesetzt wird und somit die Interaktion mit putativen Bindungspartnern, welche ein PXVXL Motiv besitzen, beeinflusst wird (Brasher et al. 2000). Ähnliche Studien bei *N. crassa* zeigen, dass korrespondierenden Austausche zu denen bei Maus, Y244E und I250E, ebenfalls die Dimerisierung und die Interaktion zwischen DIM-2 und HP1 aufheben (Honda & Selker 2008). Die Punktmutanten L251E und Y254E bei *C. graminicola* weisen einen Verlust der DNA-Methylierung auf. Diese Modifikation wird durch CgDIM2-1 vermittelt. Anhand der Ergebnisse von *N. crassa* lässt sich vermuten, dass auch bei *C. graminicola* die Bindung zwischen HP1 und DIM2-1 gestört ist und die Aminosäuren L251 und Y254 in der Chromo Shadow Domäne von CgHP1 für diese Wechselwirkung essentiell sind.

Die Untersuchungen epigenetischer Faktoren bei *C. graminicola* belegen, dass die Methylierung von DNA, sowie die H3K9 Trimethylierung und das Heterochromatin Protein 1 essentielle Faktoren für die Bildung von Heterochromatin sind. Anhand der vorliegenden Analysen kann ein Modell für den Aufbau von Heterochromatin bei *C. graminicola* aufgestellt werden. DIM7 ist für die Rekrutierung von DIM5 zu heterochromatischen Sequenzen verantwortlich. Es erfolgt die Trimethylierung von H3K9 durch DIM5. Diese Modifikation wird dann von der Chromo Domäne des HP1-Proteins erkannt und gebunden. Dabei ist die Aminosäureposition V87 in der Chromo Domäne für die H3K9me3 Erkennung essentiell. Darauf folgt über die Chromo Shadow Domäne des HP1-Proteins die Rekrutierung der DNA-Methyltransferase DIM2-1, welche DNA-Methylierung katalysiert.

Auch das CgDIM2-1 Protein besitzt ein PXVXL like Motiv, was vermutlich an die Chromo Shadow Domäne des HP1 bindet. Die fortlaufende Interaktion dieser Proteine führt zu einer immer dichteren Verpackung der DNA bis hin zur Bildung von Heterochromatin. Dieser Mechanismus ist dem Aufbau von Heterochromatin bei *N. crassa* sehr ähnlich. Genau wie bei *C. graminicola* ist H3K9me3 unabhängig von der DNA-Methylierung und von HP1 (Lewis et al. 2010). Bei *N. crassa* sind neben DIM-5 und DIM-7 noch DIM-8 (DDB1), DIM-9 und CUL4 Komponenten des DCDC-Komplexes in der H3K9- und DNA-Methylierung involviert. DIM-7 vermittelt die Interaktion von DIM-5 und DDB1/CUL4 über DIM-9. Lewis et al. 2010 schlussfolgern daraus, dass es bei *N. crassa* einen Two-Step Mechanismus für die Methylierung von H3K9 gibt (Lewis et al. 2010). Im ersten Schritt rekrutiert DIM-7 das DIM-5 Protein um den DCDC-Komplex zu bilden. In der zweiten Phase katalysiert dann DIM-5 die Trimethylierung von H3K9. Sequenzvergleiche der Proteine des DCDC-Komplexes zeigen, dass es auch bei *C. graminicola* homologe Proteine gibt. Ob diese Proteine eine ähnliche Funktion, wie bei *N. crassa* haben, wäre sehr wahrscheinlich, jedoch müsste dieser Aspekt mittels Knockouts und die Charakterisierung dieser Mutanten, sowie Interaktionsstudien analysiert werden.

5.3. Einfluss der Deletionsmutanten epigenetischer Faktoren auf die Entwicklung und Pathogenität von *C. graminicola*

Gezielte Veränderungen in der Genomsequenz, z.B. die Deletion einzelner Gene, können Einfluss auf die Entwicklung eines Organismus nehmen. Bei Pflanzenpathogenen kann der Verlust eines Gens auch die Virulenz beeinträchtigen. Welche Rolle SU(VAR)3-9 Homologe auf die Morphologie und Virulenz von Pilzpathogenen haben, belegen verschiedene Deletionsexperimente an unterschiedlichen Ascomyceten. Bei *Aspergillus fumigatus* konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des SU(VAR)3-9 Homologen ClrD zu Wachstumsdefekten führt (Palmer et al. 2008). Auch bei den *dim-5* Mutanten aus *N. crassa* und *LmDIM5* aus *L. maculans* konnten Veränderungen im Wachstum beobachtet werden (Tamaru & Selker 2001; Soyer et al. 2014). Eine Deletion von DIM5 bei *C. graminicola* führt ebenfalls zu geringen Wachstumsdefekten (Mickel 2010). Aufgrund der verminderten Vitalität könnte man schlussfolgern, dass ein mit dem Gen-Knockout einhergehendes reduziertes Wachstum auch zu Beeinträchtigungen der Pathogenität führt. Dies konnte bei *C. graminicola* jedoch nicht festgestellt werden. Somit ist CgDIM5 für die Virulenz des

Pilzes nicht essentiell. Auch bei *A. fumigatus* sind keine Pathogenitätsdefekte zu beobachten. Bei *L. maculans* hingegen führt die Reduktion LmDIM5 Transkript-Konzentration zu einem Virulenzdefekt. LmDIM5 RNAi Mutanten sind noch pathogen, zeigen aber eine reduzierte Virulenz auf einem suszeptiblen Raps-Kultivar. Eine komplette Deletion des Gens würde wahrscheinlich zum Verlust der Pathogenität führen (Palmer et al. 2008; Soyer et al. 2014).

Auch die DNA-Methylierung ist essentiell für die normale Entwicklung und Differenzierung bei Pflanzen und Säugern (Lee et al. 2008). Defekte in der DNA-Methylierung verursachen embryonale Letalität bei der Maus oder führen zu abnormer Blütenbildung bei *A. thaliana* (Finnegan et al. 1996; Okano et al. 1999). Bei Pilzen hingegen scheint der Prozess der DNA-Methylierung entbehrlich. Beim Ascomyceten *Aspergillus nidulans* wurde beispielsweise kein 5-MeC nachgewiesen (Lee et al. 2008). Auch bei anderen Ascomyceten, wie *S. pombe* oder *S. cerevisiae* wird keine DNA-Methylierung gefunden (Lee et al. 2008; Liu et al. 2012). Bei *M. oryzae* sind DNA-Methyltransferase-Deletionsmutanten noch pathogen, jedoch ist das vegetative Wachstum beeinträchtigt und die asexuelle Sporenproduktion ist reduziert. Bei *Ascobolus* zeigt eine *masc1* Mutante und bei *N. crassa* eine *dim-2* Mutante keine Veränderungen im vegetativem Wachstum (Foss et al. 1993; Malagnac et al. 1997). Auch bei *C. graminicola* ist die Virulenz in den Deletionsmutanten $\Delta dim2-1$ und $\Delta dim2-1\Delta dim2-2$ gegenüber dem Wildtyp unverändert und die Mutanten zeigen normales Wachstum. Somit wird die normale Entwicklung und die Virulenz von *C. graminicola* durch den Verlust der DNA-Methylierung nicht beeinflusst.

Im Gegensatz dazu, zeigen $\Delta dim7$ Deletionsmutanten bei *C. graminicola* eine leicht verzögerte Virulenz. Vier Tage nach der Inokulation des Maiskultivar Mikado wird eine verminderte Penetration um 20% im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. Eine Reduktion der Bildung von Primär- und Sekundärhyphen bewirkt bei $\Delta dim7$ den Pathogenitätsdefekt. Ob die Deletion von DIM7 auch bei anderen Pflanzenpathogenen einen Virulenzdefekt verursacht, ist bislang nicht bekannt. $\Delta dim-7$ Stämme bei *N. crassa* zeigen neben dem Verlust von H3K9me3 und der DNA-Methylierung auch einen Wachstumsdefekt (Lewis et al. 2010). Bei *C. graminicola* wurde ebenfalls ein reduziertes Wachstum beobachtet.

Das hochkonservierte HP1-Protein ist bei Tieren an der Etablierung von heterochromatischen Gensilencing, der Telomerorganisation, sowie an der Kontrolle der Entwicklung und des Zellzyklus beteiligt. Bislang ist bekannt, dass der Verlust von HP1 bei

D. melanogaster zur Letalität im dritten Larvenstadium führt (Lu et al. 2000). Mutationen des Heterochromatin Protein 1 bei *A. thaliana* (LHP1) verursachen pleiotrope Effekte und beeinflussen die Blühzeit sowie die Blattmorphologie (Libault et al. 2005). Bei filamentösen Pilzen führt die Deletion von HP1 ebenfalls zu Beeinträchtigungen der Entwicklung. *hpo* (HP1) Mutanten von *N. crassa* sind lebensfähig, zeigen aber signifikante Wachstumsdefekte, sowie eine Reduktion in der Carotinoidbildung und der Konidienproduktion. $\Delta hp1$ Mutanten bei *C. graminicola* weisen eine rötliche Pigmentierung des Myzels auf (Voigt 2011). Dass die Deletion von HP1 Einfluss auf den Sekundärmetabolismus nimmt, wurde bereits bei anderen Pilzen gezeigt (Freitag et al. 2004; Reyes-Dominguez et al. 2012). Der Verlust von *HEP1* bewirkt eine erhöhte Expression von Aurofusarin bei *F. graminearum*, was ebenfalls eine rötliche Pigmentierung zur Folge hat (Freitag et al. 2004; Reyes-Dominguez et al. 2012). Reyes-Dominguez et al. 2012 vermuteten aufgrund der Arbeiten mit der *hep1* Δ Mutante von *F. graminearum*, dass Veränderungen im Sekundärmetabolismus auch Einfluss auf die Virulenz des Pathogens nehmen könnten. Bei *B. cinerea* hat eine Deletion des *BcHP1* jedoch keine Einfluss auf die Entwicklung und Pathogenität des Pilzes (Zhang et al. 2016). Im Gegensatz dazu führt bei *C. graminicola* die Deletion von *CgHP1* zu einem kompletten Verlust der Pathogenität auf dem Maiskultivar Mikado. Detaillierte Analysen zeigen, dass die Mutante die Pflanzenepidermis noch penetrieren kann, jedoch im Vergleich zum Wildtyp in der frühen biotrophen Phase arretiert. Im Vergleich zum Wildtyp werden nur noch 10% biotrophe Primärhyphen gebildet. Domändelektionen von *CgHP1* zeigen, dass die Chromo Shadow Domäne entscheidend für die Virulenz von *C. graminicola* ist. Nur die gesamte Deletion dieser Domäne (Δ CSD) führt zum völligen Verlust der Pathogenität. Die Punktmutanten der Chromo Shadow Domäne, L251E und Y254E, weisen eine reduzierte Virulenz auf. Erste RNA-Seq Analysen von infiziertem Blattmaterial zeigen, dass in der biotrophen Lebensphase der $\Delta hp1$ Deletionsmutanten 478 Gene dereguliert sind. Von den 345 hochregulierten Gene sind ca. 1/3 hypothetische Proteine, oder können keiner funktionellen Gruppe zugeordnet werden (G. Hönig, nicht publiziert). Weitere RNA-Seq Analysen sind deshalb erforderlich, um genaue Aussagen zu den Ursachen des Pathogenitätsverlustes von $\Delta hp1$ treffen zu können.

Betrachtet man die Gene, welche in Mais nach Pathogeninfektion dereguliert sind, so fällt auf, dass bei Infektion mit $\Delta hp1$ ca. 11000 Gene dereguliert sind. Unter den hochregulierten Genen sind funktionale Gruppen (GO-Terms), wie „Response to Chitin“ oder „Response to

Oxidative Stress“ angereichert. Diese Gruppen sind bei Infektion mit dem Wildtyp nicht hochreguliert. Die Vermutung liegt nahe, dass der Pathogenitätsdefekt von $\Delta hp1$ nicht nur auf ein einzelnes Gen zurückzuführen ist. Der Pilz kann eventuell durch die Deregulation von beispielsweise Effektoren besser von der Pflanze erkannt werden, welche somit vorzeitig alle nötigen Gene für die Pflanzenabwehr anschaltet, was die große Zahl an de/hochregulierter Gene bei Infektion mit $\Delta hp1$ erklären würde.

5.4. H3K27 Methylierung und Gensilencing bei *C. graminicola*

Polycomb-Gruppen Proteine bilden multimere Komplexe, welche für die H3K27 Trimethylierung und eine transkriptionelle Repression verantwortlich sind. Bei *Drosophila* wurden die beiden Polycomb Repressive Proteinkomplexe PRC1 und PRC2 identifiziert. Dabei spielt der PRC2 eine entscheidende Rolle bei der Methylierung von H3K27. Dieser Komplex besteht aus vier Proteinen: Enhancer-of-Zeste [E(Z)], Extra sex combs (ESC), Suppressor-of-Zeste12 [SU(Z)12], und p55. E(Z) stellt die Histonmethyltransferase dar und katalysiert H3K27me₃. Die anderen Proteinkomponenten tragen zur Stabilität des Komplexes bei. H3K27me₃ rekrutiert anschließend PRC1 und sorgt für die Etablierung von transkriptionellen Gensilencing (Müller et al. 2002; Schwartz & Pirrotta 2007; Qian & Zhou 2006; Spivakov & Fisher 2007). Auch bei filamentösen Pilzen wurde der Einfluss der Methylierung am Lysin 27 untersucht. Jedoch scheint diese Methylierung nicht bei allen Pilzen vorhanden zu sein. Während bei *N. crassa*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi* und *E. festucae* homologe PRC2-Proteinkomponenten gefunden wurden, gibt es bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* keinen Hinweis auf ein SET-Domänen Protein, welches ein Homolog von E(Z) darstellt (Lachner et al. 2004, Jamieson et al. 2013; Chujo & Scott 2014, Studt et al. 2016, Niehaus et al. 2016). Im Gegensatz dazu wurden bei *C. graminicola* alle vier Proteine (E(Z), ESC, SU(Z)12 und p55) des PRC2 gefunden (G. Hönig, persönl. Mitteilung). Funktionelle Analysen der katalytischen Untereinheit E(Z) bei verschiedenen Organismen belegen, dass eine Deletion auch mit einem Verlust von H3K27me₃ einhergeht. Western Blot und ChIP Experimente bei *F. graminearum* zeigen bei der Deletionsmutante *kmt6* keine detektierbare Trimethylierung mehr (Connolly et al. 2013). Auch bei *N. crassa* ist SET-7 für die Methylierung am Lysin 27 verantwortlich (Jamieson et al. 2013). Bei *Drosophila* katalysiert E(Z) alle drei H3K27 Methylierungsstufen (Ebert et al. 2004; Ebert et

al. 2005). Ähnliche Ergebnisse sind bei *C. graminicola* zu beobachten. Bei der Deletionsmutanten $\Delta e(z)$ ist keine H3K27me₁, H3K27me₂ und H3K27me₃ mehr nachweisbar. CgE(Z) ist somit auch für alle drei Methylierungsstufen am Lysin 27 verantwortlich.

In embryonalen Stammzellen (ES) der Maus führt der Verlust der Komponente EED des PRC2 Komplexes zu Veränderungen in der DNA-Methylierung. MeDIP Experimente zeigen, dass es zu einer erhöhten oder auch reduzierten DNA-Methylierung an verschiedenen Entwicklungsgenen kommt (Hagarman et al. 2013). Insgesamt sind 4% aller Gene von diesen Veränderungen betroffen. In einer weiteren Studie wurde die Untereinheit des PRC2 Komplexes Suz12 ausgeschalten, was zum Verlust der H3K9 Trimethylierung führt (de la Cruz et al. 2007). Im Gegensatz dazu belegen Analysen bei *N. crassa*, dass die Eliminierung der Untereinheiten SET-7 und EED des PRC2 keinen Einfluss auf H3K9me₃ oder DNA-Methylierung haben (Jamieson et al. 2013). Auch bei *C. graminicola* hat die Deletion von CgE(Z) keinen Einfluss auf H3K9m₃ oder DNA-Methylierung. Ob eine Deletion der anderen Untereinheiten des PRC2 Komplexes Einfluss auf die H3K9me₃ oder DNA-Methylierung haben, wäre in weiteren Analysen durch die Erzeugung von Knockout-Mutanten von großem Interesse. Da die Deletion von EED bei *N. crassa* jedoch keine Auswirkungen auf diese H3K9 Modifikationen hat (Jamieson et al. 2013), ist es fraglich, ob bei *C. graminicola* Effekte auftreten würden.

Die Markierung genomischer Bereiche durch H3K27me₃ führt zur Reprimierung zahlreicher Gene. Bei *N. crassa* bilden Gene, welche von H3K27me₃ markiert sind nur wenig, bis gar kein Transkript. Bei diesem Pilz bewirkt die Eliminierung von H3K27me₃ durch die Deletion von SET-7 eine erhöhte Expression von 130 Genen. Im Gegensatz dazu sind nur 5 Gene herabreguliert (Jamieson et al. 2013). Bei *F. fujikuroi* wurde weiterhin gezeigt, dass ein Knockdown von Kmt6 zu einer erhöhten Expression von Sekundärmetabolit-Clustern, wie beispielsweise dem Beauvericin-Cluster führt (Studt et al. 2016; Niehaus et al. 2016). Auch bei *E. festucae* führt eine Deletion von EzhB zur Aktivierung der bioprotektiven Alkaloidmetabolit-Cluster Lolitrem B (ltm) und Ergovalin (eas) (Chujo & Scott 2014). Die Ergebnisse der genomweiten RNA-Sequenzierung der Deletionsmutante $\Delta e(Z)$ von *C. graminicola* zeigen in vegetativen Hyphen ebenfalls eine Deregulation zahlreicher Gene. Im Vergleich zu *N. crassa* scheint die H3K27me₃ einen größeren Einfluss auf die transkriptionelle Repression von Genen zu nehmen, da bei *C. graminicola* 3606 Gene eine erhöhte Expression zeigen, wenn E(Z) deletiert ist. Im Gegensatz dazu sind 1191 Gene

schwächer exprimiert als im Wildtyp. Weiterhin wird auch die transkriptionelle Aktivität der Transposons durch H3K27me3 reguliert (G. Hönig, unveröffentlicht). Von den 30 gefunden Retrotransposons bei *C. graminicola* wird bei 19 ein Anstieg der Expression beobachtet, wenn die H3K27 Trimethylierung komplett ausfällt (G. Hönig, unveröffentlicht). Zusätzlich zeigen qRT-PCR Analysen von infiziertem Blattmaterial, dass bei *C. graminicola* die Expression einzelner Transposons in der $\Delta e(Z)$ Deletionsmutante stärker exprimiert wird. Somit ist H3K27me3 bei *C. graminicola* nicht nur in vegetativem Myzel, sondern auch *in planta* entscheidend für die Reprimierung zahlreicher Gene und Transposons. ChIP-Analysen von Jamieson et al. 2013 verdeutlichen, dass von den 130 deregulierten Genen bei *N. crassa* lediglich nur 21 Gene eine Bindung mit H3K27me3 markierten Domänen zeigen. Aufgrund der geringen Genzahl schlussfolgerten sie, dass neben dem Verlust von H3K27me3 weitere Aktivierungssignale für die Expression von Genen in H3K27me3 Domänen benötigt werden (Jamieson et al. 2013). Auch bei Mensch, *Drosophila* und *Arabidopsis* gibt es Hinweise darauf, dass ein Verlust von Polycomb Gruppen Genen nur ausreicht, um einen kleinen Teil von H3K27me3 markierte Gene zu aktivieren (Kirmizis et al. 2004; Schwartz et al. 2010; Weinhofer et al. 2010). Wie viel der 3606 hochregulierten Gene bei *C. graminicola* eine H3K27me3 Bindung aufweisen ist bislang nicht bekannt. H3K27me3 ChIP-Seq-Experimente würden zeigen, ob auch nur ein geringer Teil der deregulierten Gene eine H3K27me3 Bindung besitzen.

Studien von E(Z)-Deletionsmutanten zeigen, dass der Verlust Auswirkungen auf die normale Entwicklung eines Organismus hat. *Ezh2*-Nullmutanten bei der Maus resultieren in embryonaler Letalität in frühen Stadien der Entwicklung (O'Carroll et al. 2001). Die Deletion von KMT6 bei *F. graminearum* nimmt Einfluss auf das Wachstum, den Sekundärmetabolismus und führt außerdem zur Induktion der Carotinoidbildung, weshalb diese Mutante rötlicher erscheint als der Wildtyp. Außerdem wird eine reduzierte Virulenz beobachtet (Connolly et al. 2013). In *F. fujikuroi* ist Kmt6 essentiell für den Organismus, da ein Knockout, bzw. das Einfügen von Punktmutationen letal ist. KMT6 Knockdown (*KMT6^{Kd}*) Mutanten zeigen bei *F. fujikuroi* pleiotrophe Effekte, wie ein stark reduziertes Wachstum (Studt et al. 2016). Bei $\Delta ezhB$ Mutanten von *E. festucae* wird auf PD-Medium (Potato Dextrose) normales Hyphenwachstum beobachtet. Infektionsstudien der Mutante zeigen eine erhöhte Produktion der Wurzelbiomasse oder eine erhöhte Anzahl an Wurzelsprossbildung (Chujo & Scott 2014). Bei *C. graminicola* ist hingegen die Ausprägung der nekrotischen Läsion auf dem Maiskultivar Mikado bei $\Delta e(z)$ gleich dem Wildtyp. Im

Vergleich zu *F. graminearum* wurden auch keine Wachstumsdefekte oder ähnliches beobachtet. Bei filamentösen Ascomyceten scheint ein Verlust von E(Z) nicht immer Einfluss auf die Entwicklung des Organismus zu nehmen, da bei *N. crassa* ebenfalls keine Veränderungen in der Morphologie oder des Wachstums beobachtet werden (Jamieson et al. 2013).

5.5. Der Einfluss pflanzlicher Suszeptibilität auf die Virulenz von *C. graminicola*

Die Resistenz gegen Krankheiten in vielen Pflanzen beruht auf einer komplexen Vererbung. Man unterscheidet in qualitative und quantitative Resistenz. Die qualitative Resistenz wird monogenisch kontrolliert und wirkt gegen einen spezifischen Pilz- oder Virusstamm. Im Gegensatz dazu wird die komplexe oder quantitative Resistenz (QDR) in der Pflanze polygenisch kontrolliert und ist somit gegen zahlreiche Pathogene wirksam. Resistenz-Gen-Allele die eine Resistenz liefern, sind an der direkten oder indirekten Erkennung eines Pathogens beteiligt (Sacco 2009). Eine Mutation oder der Verlust des Erkennungsziels in einem Pathogen macht ein oder mehrere Resistenzallele an diesen Genen unwirksam (Ayliffe et al. 2008; Poland et al. 2011). Für zahlreiche wichtige Pflanzenkrankheiten, einschließlich der meisten, die durch nekrotrophe Pathogene verursacht werden, sind Resistenzgene von großer Wirkung, aber meist unbekannt und QDR ist die einzig verfügbare Form von Resistenz. Dabei ist die Kartierung quantitativer Trait-Loci (QTL-Quantitative Trait Loci) ein leistungsfähiges Werkzeug für die genetische Analyse von QDR (St. Clair 2010; Poland et al. 2011). Bei Pflanzen existieren rassenspezifische Resistenzgene, die sich in wenige Klassen von Genen einteilen lassen. Diese Gene und deren Mechanismen ermöglichen es den Pflanzen die Infektion durch Pathogene zu reduzieren. Das heißt, die Pflanzen sind weniger suszeptibel gegenüber einem Pathogen. Es wird postuliert, dass diese Gene und deren Mechanismen an QDR beteiligt sind (Poland et al. 2011). Bei einigen Nutzpflanzen, wie Weizen oder Reis, wurden bereits Abwehrgene identifiziert, die quantitative Resistenzen konditionieren (Krattinger et al. 2009; Fukuoka et al. 2009). Bei Mais wurden bislang rassenspezifische Resistenzgene bei Rostkrankheiten und bei *Northern Leaf Blight* (NLB) gefunden (Wisser et al. 2006; Welz & Geiger 2000). Analysen zur Resistenz gegenüber NLB, verursacht durch das Pathogen *S. turcica*, ergaben eine komplexe genetische Verteilung von quantitativen Merkmalsloci (QTL) über das gesamte Genom. Dabei wurden drei Gene identifiziert, die eine rassenspezifische

Resistenz gegenüber *S. turcica* vermitteln (Poland et al. 2011; Zwonitzer et al. 2010; Balint-Kurti et al. 2010). Aufgrund der geringen Auflösung früherer QTL-Mapping-Studien wurde eine Nested Association Mapping (NAM)-Maispopulation auf Resistenz gegen NLB getestet. Dabei wurden 29 quantitative Merkmalsloci (QTLs) identifiziert, die zum Teil multiple Allele besitzen. Auch konnten putative Kandidatengenene für die Pflanzenabwehr gefunden werden (Poland et al. 2011). Poland et al., 2011 bestätigten somit die Hypothese, dass QDR in Pflanzen durch zahlreiche Mechanismen bedingt wird. Zuvor wurden die Standard-Inzucht-Linien (Gründerlinien) und B73, der NAM-Referenzelternteil, auf Resistenz gegenüber *S. turcica* getestet. Die Resultate dieser Infektionen zeigen eine breite phänotypische Varianz (Poland et al. 2011).

Diese phänotypische Vielseitigkeit war auch bei *C. graminicola* zu beobachten. Die Infektion von unterschiedlichen Maiskultivaren und der Standard-Inzucht-Linien sowie B73 mit *C. graminicola* Wildtyp zeigt, dass die Pflanzen verschieden suszeptibel gegenüber dem Pathogen sind. Auch hier scheinen verschiedene unbekannte Gene eine quantitative Resistenz (QDR) gegenüber *C. graminicola* zu vermitteln. Die Suszeptibilität von Maispflanzen und die einhergehende QDR werden auch durch die epigenetischen Kontrollfaktoren für die Heterochromatinbildung beeinflusst. Sowohl bei $\Delta hp1$ und $\Delta e(Z)$ konnte gezeigt werden, dass eine Deletion dieser Faktoren auch das Infektionsvermögen der Mutanten auf den unterschiedlichen Maispflanzen verändert. Auf Mikado apathogen, besitzt $\Delta hp1$ die Fähigkeit einige Inzucht-Linien zu infizieren. Auch $\Delta e(Z)$ weist eine veränderte Virulenz auf den Inzucht-Linien auf. Zeigt die $\Delta e(Z)$ Deletionsmutante auf Mikado eine Infektion gleich dem Wildtyp, so ist sie auf zwei Linien apathogen und auf fünf Inzucht-Linien wird eine verzögerte Infektion beobachtet. Vermutlich werden durch die Deletion dieser Gene die Erkennungssignale des Pathogens für einige Maispflanzen verändert, bzw. stillgelegt. Dies hat zur Folge, dass ein oder mehrere Abwehrgene der Pflanzen unwirksam werden. Um einen Einblick in die quantitative Resistenzbestimmung gegenüber *C. graminicola* zu gewinnen, wäre es möglich mit der vorhandenen NAM Populationen dieser Inzucht-Linien die QTLs möglicher Pflanzenabwehrgene zu identifizieren und somit auch rassenspezifische Resistenzgene aufzudecken. Würde man diese Bestimmung für die unterschiedlichen generierten Mutantenlinien für epigenetischen Kontrollfaktoren durchführen, würde man einen Einblick darüber erhalten, ob die Deletion einzelner Gene auch unterschiedliche Resistenzgene der Maispflanzen aktivieren. Auch würde man Informationen darüber erhalten, ob Faktoren, die an der heterochromatischen Chromatinbildung beteiligt sind, Einfluss auf Pathogenerkennungssignale besitzen.

6. Zusammenfassung

Die Regulation von epigenetischen Mechanismen in dem Maispathogen *C. graminicola* war weitestgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, Knockout-Mutanten von Genen zu generieren und analysieren, welche als epigenetische Kontrollfaktoren des heterochromatischen Chromatinzustandes bereits bei anderen Organsimsen, wie Maus, *D. melanogaster* oder *N. crassa* beschrieben wurden. Mittels molekulargenetischer Analysen konnte gezeigt werden, dass DIM5 die Trimethylierung von H3K9 katalysiert und E(Z) alle drei Methylierungsstufen am Lysin 27 des Histon H3. DIM7 scheint als CoFaktor für DIM5 zu fungieren, damit überhaupt eine H3K9me3 ermöglicht werden kann. Des Weiteren belegt die Deletion von DIM2-1, dass dieses Enzym für die DNA-Methylierung bei *C. graminicola* verantwortlich ist. Detaillierte Analysen des Heterochromatin Proteins 1 (HP1) zeigen, dass dieses Protein eine wichtige Rolle im Aufbau von Heterochromatin spielt. Die Chromo Domäne ist für die Bindung und Erkennung von H3K9me3 verantwortlich, während die Chromo Shadow Domäne für die Bindung der DNA-Methyltransferase DIM2-1 benötigt wird. Lokalisierungsstudien mit eGFP fusionierten HP1 Proteinen, bei denen eine der beiden Domänen deletiert wurde, weisen eine veränderte Lokalisierung des Proteins auf. Δ CD zeigt keine Bindung zu Heterochromatin und ist diffus im Kern verteilt, während Mutanten der Chromo Shadow Domäne noch mit Heterochromatin assoziieren. Jedoch wird bei diesen Mutanten auch eine vermehrte euchromatische Lokalisation beobachtet. Aus diesen Resultaten lässt sich schlussfolgern, dass das Zusammenspiel all dieser Faktoren entscheidend für die Heterochromatinbildung bei *C. graminicola* sind. Virulenztests aller Mutanten auf dem Maiskultivar Mikado zeigen, dass nur die Deletion von HP1 zum Verlust der Pathogenität führt. Dünnschnitte von infiziertem Blattmaterial decken auf, dass Δ hp1 die Wirtsepidermis noch penetrieren kann, jedoch in der biotrophen Phase stagniert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Defekt über die Chromo Shadow Domäne vermittelt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass HP1 zwei essentielle Funktionen besitzt. Zum einen fungiert das Protein als Adapter zwischen H3K9me3 und DNA-Methylierung. Zum anderen ist es ein Faktor, der für die Pathogenität des Pilzes benötigt wird. Vermutlich ist HP1 Bindepartner für weitere Proteine, welche für die Virulenz von *C. graminicola* benötigt werden.

7. Literatur

- Aasland, R., Stewart, A.F. and Gibson, T., 1996. The SANT domain: A putative DNA binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(3), pp.87–88.
- Aasland, R. and Stewart, A. F., 1995. The chromo shadow domain, a second chromo domain in heterochromatin-binding protein 1, HP1. *Nucleic Acids Research*, 23(16), pp.3168–3173.
- Adhvaryu, K. K., Morris, S.A., Strahl, B.D. and Selker, E.U., 2005. Methylation of histone H3 lysine 36 is required for normal development in *Neurospora crassa*. *Eucaryotic Cell*, 4(8), pp.1455–1464.
- Anderson, D.W. and Nicholson, R.L., 1996. Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*, 88(6), p.996.
- Ayliffe, M., Singh, R. and Lagudah, E., 2008. Durable resistance to wheat stem rust needed. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(2), pp.187–192.
- Badugu, R., Yoo, Y., Singh, P.B. and Kellum, R., 2005. Mutations in the heterochromatin protein 1 (HP1) hinge domain affect HP1 protein interactions and chromosomal distribution. *Chromosoma*, 113(7), pp.370–384.
- Balint-Kurti, P.J., Yang, J., Van Esbroeck, G., Jung, J. and Smith, M.E., 2010. Use of a maize advanced intercross line for mapping of QTL for Northern leaf blight resistance and multiple disease resistance. *Crop Science*, 50(2), pp.458–466.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21(3), pp.381–395.
- Barra, J.L., Rhounim, L., Rossignol, J.L. and Faugeron, G., 2000. Histone H1 is dispensable for methylation-associated gene silencing in *Ascobolus immersus* and essential for long life span. *Molecular and Cellular Biology*, 20(1), pp.61–9.
- Bergstrom, G.C. and Nicholson, R.L., 1999. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease*, 83(7), pp.596–608.
- Bestor, T., Laudano, A., Mattaliano, R. and Ingram, V., 1988. Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*, 203(4), pp.971–983.
- Bhaumik, S.R., Smith, E. and Shilatifard, A., 2007. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(11), pp.1008–16.
- Brasher, S.V., et al., 2000. The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer. *The EMBO Journal*, 19(7), pp.1587–1597.
- Brook, P.J., 1977. *Glomerella cingulata* and bitter rot of apple. *New Zealand Journal of*

Agricultural Research, 20(4), pp.547–555.

- Brosch, G., Loidl, P. and Graessle, S., 2008. Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(3), pp.409–439.
- Bryan, T.M., 2001. Chromatin and gene regulation: Mechanisms in Epigenetics. *Blackwell Science Ltd*, 284 pp.
- Callebaut, I., Courvalin, J.C. and Moron, J.P., 1999. The BAH (bromo-adjacent homology) domain: A link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. *FEBS Letters*, 446(1), pp.189–193.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R. and Weir, B.S., 2012. *Colletotrichum* - current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, pp.181–213.
- Cao, R. et al., 2002. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in polycomb-group silencing. *Science*, 298, pp.1039–1044.
- Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. and Vaillancourt, L., 2001. Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 91, pp.558–564.
- Chujo, T. and Scott, B., 2014. Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte-plant symbiosis. *Molecular Microbiology*, 92, pp.431–434.
- Connolly, L.R., Smith, K.M. and Freitag, M., 2013. The *Fusarium graminearum* histone H3 K27 methyltransferase KMT6 regulates development and expression of secondary metabolite gene clusters. *PLoS Genetics*, 9(10).
- Cowieson, N.P., Partridge, J.F., Allshire, R.C. and McLaughlin, P.J., 2000. Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis. *Current Biology*, 10(9), pp.517–525.
- Dean, R., Van Kann, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., Foster, G.D., 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), pp.414–430.
- Dean, R., Lichens-Park, A. and Kole, C., 2014. Genomics of plant-associated fungi: Monocot pathogens. *Springer Berlin Heidelberg*.
- Debieu, M., Huard-Chauveau, C., Genissel, A., Roux, F., Roby, D., 2016. Quantitative disease resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* involves an *Arabidopsis* immune receptor pair and a gene of unknown function. *Molecular Plant Pathology*, 17(4), pp.510–520.
- Ding, S.-L., Huard-Chauveau, C., Genissel, A., Roux, F. and Roby, D., 2010. The tig1 histone deacetylase complex regulates infectious growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Cell*, 22(7), pp.2495–2508.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R. and Burg, G., 1997. Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, culture cells, plants and

bacteria. 88-90. *BioTechniques*, 22(1), pp.88–90.

- Ebert, A., Schotta, G., Lein, S., Kubicek, S., Krauss, V., Jenuwein, T. and Reuter, G., 2004. Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes and Development*, 18(23), pp.2973–2983.
- Ebert, A., Lein, S., Schotta, G. and Reuter, G., 2005. Histone methylation and the control of gene silencing in *Drosophila*. *FEBS Journal*, 272, p.280.
- Eissenberg, J.C., James, T.C., Foster-Hartnett, D.M., Hartnett, T., Ngan, V. and Elgin, S.C., 1990. Mutation in a heterochromatin-specific chromosomal protein is associated with suppression of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(24), pp.9923–7.
- Epstein, L., Lusnak, K. und Kaur, S., 1998. Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 23, 189-203
- Gao, Y. G., Yan, X.Z., Song, A.X., Chang, Y.G., Gao, X.C., Jiang, N., Zhang, Q. and Hu, H.Y., 2006. Structural insights into the specific binding of huntingtin proline-rich region with the SH3 and WW domains. *Structure*, 14(12), 1755-1765.
- Hagarman, J.A., Motley, M.P, Kristjansdottir, K. and Soloway, P.D., 2013. Coordinate regulation of DNA methylation and H3K27me3 in mouse embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 8(1).
- Hagerman, A.E. and Butler, L.G., 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 256(9), pp.4494–4497.
- Halverson, D., Gutkin, G. and Clarke, L., 2000. A novel member of the *Swi6p* family of fission yeast chromo domain-containing proteins associates with the centromere *in vivo* and affects chromosome segregation. *Molecular and General Genetics*, 264(4), pp.492–505.
- He, X.-J., Chen, T. and Zhu, J.-K., 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, 54(3), pp.442–465.
- Heard, E., Clerc, P. and Avner, P., 1997. X-Chromosome inactivation in mammals. *Annual Review of Genetics*, 31(1), pp.571–610.
- Heitz, E., 1929. Heterochromatin, Chromocentren, Chromomeren. *Bericht der Botanischen Gesellschaft*, 47, pp.274–284.
- Heitz, E., 1928. Das Heterochromatin der Moose. *I. Jahrb Wiss Bot*, 69, pp.762–818.
- Honda, S., Lewis, Z.A., Huarte, M., Cho, L.Y., David, L.L., Shi, Y. and Selker, E.U., 2010. The DMM complex prevents spreading of DNA methylation from transposons to nearby genes in *Neurospora crassa*. *Genes and Development*, 24(5), pp.443–454.
- Honda, S. and Selker, E.U., 2008. Direct interaction between DNA methyltransferase DIM-2 and HP1 is required for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Molecular and Cellular Biology*, 28(19), pp.6044–55.
- Horbach, R. Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J.C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J. and Deising, H.B., 2009. Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl

- transferase is indispensable for fungal pathogenicity. *The Plant Cell*, 21(October), pp.1–18.
- Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C.R. and Schubert, I., 2003. Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant Journal*, 33(6), pp.967–973.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. and Money, N.P., 1991. Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(24), pp.11281–11284.
- Hsieh, T.-F. and Fischer, R.L., 2005. Biology of chromatin dynamics. *Annual Review of Plant Biology*, 56, pp.327–351.
- Izawa, M., Takekawa, O., Arie, T., Teraoka, T., Yoshida, M., Kimura, M. and Kamakura, T., 2009. Inhibition of histone deacetylase causes reduction of appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 55, pp.489–498.
- Jackson, J.P., Lindroth, A.M., Cao, X. and Jacobsen, S.E., 2002. Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone. *Nature*, 416, p. 556–560.
- Jacobs, S.A., Taverna, S.D., Zhang, Y., Briggs, S.D., Li, J., Eissenberg, J.C., Allis and C.D., Khorasanizadeh, S., 2001. Specificity of the HP1 chromo domain for the methylated N-terminus of histone H3. *The EMBO Journal*, 20(18), pp.5232–5241.
- Jacobs, S.A. and Khorasanizadeh, S., 2002. Structure of HP1 chromodomain bound to a lysine 9-methylated histone H3 tail. *Science*, 295(5562), pp.2080–3.
- James, T.C. and Elgin, S.C.R., 1986. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. *Molecular Cell* 6(11), pp.3862–3872.
- Jamieson, K., Rountree, M.R., Lewis, Z.A., Stajich, J.E. and Selker, E.U., 2013. Regional control of histone H3 lysine 27 methylation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(15), pp.6027–32.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D., 2001. Translating the histone code. *Science*, 293(5532), pp.1074–1080.
- Jeon, J., Choi, J., Lee, G.W., Park, S.Y., Huh, A., Dean, R.A. and Lee, Y.H., 2015. Genome-wide profiling of DNA methylation provides insights into epigenetic regulation of fungal development in a plant pathogenic fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 5, p.8567.
- Jeon, J., Kwon, S. and Lee, Y.H., 2014. Histone acetylation in fungal pathogens of plants. *The Plant Pathology Journal*, 30(1), pp.1–9.
- de Jong, J., McCormack, B.J., Smirnov, N. and Talbot, N.J., 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature*, 389, p.244.

- Kanoh, J., Francesconi, S., Collura, A., Schramke, V., Ishikawa, F., Baldacci, G. and Géli, V., 2003. The fission yeast *spSet1p* is a histone H3-K4 methyltransferase that functions in telomere maintenance and DNA repair in an ATM kinase Rad3-dependent pathway. *Journal of Molecular Biology*, 326(4), pp.1081–1094.
- Kasinsky, H.E., Lewis, J.D., Dacks, J.B. and Ausió, J., 2001. Origin of H1 linker histones. *The FASEB Journal*, 15(1), pp.34–42.
- Kellum, R. and Alberts, B.M., 1995. Heterochromatin protein 1 is required for correct chromosome segregation in *Drosophila* embryos. *Journal of Cell Science*, 108, pp.1419–1431.
- Kirmizis, A., Bartley, S.M., Kuzmichev, A., Margueron, R., Reinberg, D., Green, R. and Farnham, P.J., 2004. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes and Development*, 18(13), pp.1592–1605.
- Kouzarides, T., 2002. Histone methylation in transcriptional control. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(2), pp.198–209.
- Kouzarides, T., 2000. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO Journal*, 19(6), pp.1176–9.
- Kouzminova, E. and Selker, E.U., 2001. Dim-2 encodes a DNA methyltransferase responsible for all known cytosine methylation in *Neurospora*. *The EMBO Journal*, 20(15), pp.4309–4323.
- Krattinger, S.G., Lagudah, E.S., Spielmeier, W., Singh, R.P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L.L. and Keller, B., 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science*, 323(5919), pp.1360–1363.
- Kubo, Y. and Takano, Y., 2013. Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology*, 79(4), pp.233–242.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D., 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of zeste protein. *Genes and Development*, 16(22), pp.2893–2905.
- de la Cruz, C.C., Kirmizis, A., Simon, M.D., Isono, K., Koseki, H. and Panning, B., 2007. The polycomb group protein SUZ12 regulates histone H3 lysine 9 methylation and HP1 alpha distribution. *Chromosome Research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology*, 15(3), pp.299–314.
- Lachner, M., Sengupta, R., Schotta, G. and Jenuwein, T., 2004. Trilogies of histone lysine methylation as epigenetic landmarks of the eukaryotic genome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 69, pp.209–218.
- Lan, F., Zariatgui, M., Villén, J., Vaughn, M.W., Verdel, A., Huarte, M., Shi, Y., Gygi, S.P., Moazed, D., Martienssen, R.A. and Shi, Y., 2007. *S. pombe* LSD1 homologs regulate heterochromatin propagation and euchromatic gene transcription. *Molecular Cell*, 26(1), pp.89–101.

- Leach, J., Lang, B.R., and Yoder, O.C., 1982. Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Journal of General Microbiology*, 128, pp.1719–1729.
- Lee, D.W., Freitag, M., Selker, E.U. and Aramayo, R., 2008. A cytosine methyltransferase homologue is essential for sexual development in *Aspergillus nidulans*. *PLoS ONE*, 3(6).
- Lehnertz, B., Ueda, Y., Derijck, A.A., Braunschweig, U., Perez-Burgos, L., Kubicek, S., Chen, T., Li, E., Jenuwein, T. and Peters, A.H., 2003. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current Biology*, 13(14), pp.1192–1200.
- Lei, H., Oh, S.P., Okano, M., Jüttermann, R., Goss, K.A., Jaenisch, R. and Li, E., 1996. *De novo* DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development*, 122(10), pp.3195–3205.
- Leite, B. and Nicholson, R.L., 1992. Mycosporine-alanine: a self-inhibitor of germination from the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Experimental Mycology*, 16(1), pp.76–86.
- Lewis, Z.A., Adhvaryu, K.K., Honda, S., Shiver, A.L., Knip, M., Sack, R. and Selker, E.U., 2010. DNA methylation and normal chromosome behavior in *Neurospora* depend on five components of a histone methyltransferase complex, DCDC. *PLoS Genetics*, 6(11), pp.1–11.
- Lewis, Z.A., Adhvaryu, K.K., Honda, S., Shiver, A.L. and Selker, E.U., 2010. Identification of DIM-7, a protein required to target the DIM-5 H3 methyltransferase to chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(18), pp.8310–5.
- Lewis, Z.A., Honda, S., Khlafallah, T.K., Jeffress, J.K., Freitag, M., Mohn, F., Schübeler, D. and Selker, E.U., 2009. Relics of repeat-induced point mutation direct heterochromatin formation in *Neurospora crassa*. *Genome Research*, 19(3), pp.427–437.
- Li, E., Bestor, T.H. and Jaenisch, R., 1992. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), pp.915–926.
- Li, Y., Wang, C., Liu, W., Wang, G., Kang, Z., Kistler, H.C. and Xu, J.R., 2011. The HDF1 histone deacetylase gene is important for conidiation, sexual reproduction, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 24(4), pp.487–496.
- Liao, C.Y., Chen, M.-Y., Chen, Y.-K., Kuo, K.-C., Chung, K.-R. and Lee, M.-H., 2012. Formation of highly branched hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the fruit cuticles of *Capsicum* spp. *Plant Pathology*, 61(2), pp.262–270.
- Libault, M., Tessadori, F., Germann, S., Snijder, B., Fransz, P. and Gaudin, V., 2005. The *Arabidopsis* LHP1 protein is a component of euchromatin. *Planta*, 222(5), pp.910–925.
- Liu, F.T. and Zhang, Y., 2006. Heterochromatin protein 1 deleted chromo domain decreases gene silencing of transgene in mouse. *Biotechnology Letters*, 28(6), pp.419–424.

- Liu, S.Y., Lin, J.Q., Wu, H.L., Wang, C.C., Huang, S.J., Luo, Y.F., Sun, J.H., Zhou, J.X., Yan, S.J., He, J.G., Wang, J. and He, Z.M., 2012. Bisulfite sequencing reveals that *Aspergillus flavus* holds a hollow in DNA methylation. *PLoS ONE*, 7(1).
- Lomberk, G., Wallrath, L. and Urrutia, R., 2006. The Heterochromatin Protein 1 family. *Genome Biology*, 7(7), p.228.
- Lorentz, A., Ostermann, K., Fleck O. and Schmidt, H., 1994. Switching gene *swi6*, involved in repression of silent mating-type loci in fission yeast, encodes a homologue of chromatin-associated proteins from *Drosophila* and mammals. *Gene*, 143(1), pp.139–143.
- Lu, B.Y., Emtage, P.C., Duyf, B.J., Hilliker, A.J. and Eissenberg, J.C., 2000. Heterochromatin protein 1 is required for the normal expression of two heterochromatin genes in *Drosophila*. *Genetics*, 155(2), pp.699–708.
- Luger, K., 2003. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13(2), pp.127–135.
- Maison, C. and Almouzni, G., 2004. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 5(4), pp.296–304.
- Malagnac, F., Wendel, B., Goyon, C., Faugeron, G., Zickler, D., Rossignol, J.L., Noyer-Weidner, M., Vollmayr, P., Trautner, T.A. and Walter, J., 1997. A gene essential for *de novo* methylation and development in *Ascobolus* reveals a novel type of eukaryotic DNA methyltransferase structure. *Cell*, 91(2), pp.281–290.
- Meijer, A.H., van Dijk, E.L. and Hoge, H.J., 1996. Novel members of a family of AT hook-containing DNA-binding proteins from rice are identified through their *in vitro* interaction with consensus target sites of plant and animal homeodomain proteins. *Plant Molecular Biology*, 31(3), pp.607–18.
- Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Müller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Günther, T., Buettner, R. and Schüle, R., 2005. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature*, 437, pp.436–439.
- Mickel, A., 2010. „ Die Bedeutung epigenetischer Faktoren für die Differenzierung von Infektionsstrukturen. *Diplomarbeit. Naturwissenschaftliche Fakultät III, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz (Halle (Saale): Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Deutschland)*
- Mims, C.W. and Vaillancourt, L., 2002. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. *Phytopathology*, 92(7), pp.803–812.
- Minc, E., Allory, Y., Courvalin, J.C. and Buendia, B., 2001. Immunolocalization of HP1 proteins in metaphasic mammalian chromosomes. *Methods in Cell Science : an official Journal of the Society for In Vitro Biology*, 23(1–3), pp.171–174.
- Minc, E., Courvalin, J.C. and Buendia, B., 2000. HP1 γ associates with euchromatin and heterochromatin in mammalian nuclei and chromosomes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 90(3–4), pp.279–284.
- Minc, E., Allory, Y., Worman, H.J., Courvalin, J.C. and Buendia, B., 1999. Localization and

phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells. *Chromosoma*, 108(4), pp.220–234.

- Mishima, Y., Watanabe, M., Kawakami, T., Jayasinghe, C.D., Otani, J., Kikugawa, Y., Shirakawa, M., Kimura, H., Nishimura, O., Aimoto, S., Tajima, S. and Suetake, I., 2013. Hinge and chromoshadow of HP1 α participate in recognition of K9 methylated histone H3 in nucleosomes. *Journal of Molecular Biology*, 425(1), pp.54–70.
- Morris, S., Shibata, Y., Noma, K., Tsukamoto, Y., Warren, E., Temple, B., Grewal, S.I. and Strahl, B.D., 2005. Histone H3K36 Methylation is associated with transcription elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell*, 4(8), pp.1446–1454.
- Muller, H.J., 1930. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *Journal of Genetics*, 22(3), pp.299–334.
- Müller, J., Hart, C.M., Francis, N.J., Vargas, M.L., Sengupta, A., Wild, B., Miller, E.L., O'Connor, M.B., Kingston, R.E. and Simon, J.A., 2002. Histone methyltransferase activity of a *Drosophila* polycomb group repressor complex. *Cell*, 111(2), pp.197–208.
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. and Deising, H.B., 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of Plant Physiology*, 165(1), pp.41–51.
- Naumann, K., Fischer, A., Hofmann, I., Krauss, V., Phalke, S., Irmeler, K., Hause, G., Aurich, A.C., Dorn, R., Jenuwein, T. and Reuter, G., 2005. Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. *The EMBO Journal*, 24(7), pp.1418–1429.
- Nicholson, R.L. and Moraes, W.B.C., 1980. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. *Phytopathology*, 70(3), p.255-261.
- Niehaus E. M., Studt, L., von Bargen, K. W., Kummer, W., Humpf, H. U., Reuter, G., Tudzynski, B., 2016. Sound of silence: the beauvericin cluster in *Fusarium fujikuroi* is controlled by cluster-specific and global regulators mediated by H3K27 modification. *Environmental Microbiology*, 18(11), p.4282-4302.
- O'Carroll, D., Erhardt, S., Pagani, M., Barton, S.C., Surani, M.A. and Jenuwein, T., 2001. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), pp.4330–4336.
- O'Connell, R.J. et al., 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics*, 44(9), pp.1060–1065.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A. and Li, E., 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for *de novo* methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3), pp.247–257.
- Palmer, J.M., Perrin, R.M., Dagenais, T.R. and Keller, N.P., 2008. H3K9 methylation regulates growth and development in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 7(12), pp.2052–2060.
- Panaccione, D. G., McKiernan, M. and Hanau, R.M., 1988. *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous benomyl-resistance genes retains

- expected pathogenicity to corn. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 1(3), pp.113–120.
- Pascholati, Deising, H.B., Leiti, B., Anderson, D. and Nicholson, R.L., 1993. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 42, pp.37–51.
- Passarge, E., 1979. Emil Heitz and the concept of heterochromatin: longitudinal chromosome differentiation was recognized fifty years ago. *The American Journal of Human Genetics*, 31(2), pp.106–115.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J. and Green, J.R., 1999. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2–3), pp.186–98.
- Peters, A.H., Kubicek, S., Mechtler, K., O'Sullivan, R.J., Derijck, A.A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J.H. and Jenuwein, T., 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular Cell*, 12(6), pp.1577–1589.
- Platero, J.S., Hartnett, T. and Eissenberg, J.C., 1995. Functional analysis of the chromo domain of HP1. *The EMBO Journal*, 14(16), pp.3977–86.
- Poland, J.A., Bradbury, P.J., Buckler, E.S. and Nelson, R.J., 2011. Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 43(2), pp.163–168.
- Qian, C. and Zhou, M.M., 2006. SET domain protein lysine methyltransferases: structure, specificity and catalysis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(23), pp.2755–2763.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406(6796), pp.593–599.
- Reuter, G., Werner, W. and Hoffmann, H.J., 1982. Mutants affecting position-effect heterochromatinization in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 85(4), pp.539–551.
- Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R. and Strauss, J., 2012. Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology*, 49(1), pp.39–47.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N. and Strauss, J., 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 76(6), pp.1376–1386.
- Roth, S.Y., Denu, J.M. and Allis, D., 2001. Histone Acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70, pp.81–120.
- Rountree, M.R., Bachman, K.E. and Baylin, S.B., 2000. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics*, 25(3),

pp.269–277.

- Rudolph, T., Yonezawa, M., Lein, S., Heidrich, K., Kubicek, S., Schäfer, C., Phalke, S., Walther, M., Schmidt, A., Jenuwein, T. and Reuter, G., 2007. Heterochromatin formation in *Drosophila* is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. *Molecular Cell*, 26(1), pp.103–115.
- Sacco, M.A., Moffett, P., 2009. Disease resistance genes: form and function. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, pp.94–141.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, pp.5463–5467.
- Schotta, G., Ebert, A. and Reuter, G., 2003. SU(VAR)3-9 is a conserved key function in heterochromatic gene silencing. *Genetica*, 117(2-3), pp.149–158.
- Schotta, G., Ebert, A., Krauss, V., Fischer, A., Hoffmann, J., Rea, S., Jenuwein, T., Dorn, R. and Reuter, G., 2002. Central role of *Drosophila* SU(VAR)3-9 in histone H3-K9 methylation and heterochromatic gene silencing. *The EMBO Journal*, 21(5), pp.1121–1131.
- Schwartz, Y.B., Kahn, T.G., Stenberg, P., Ohno, K., Bourgon, R. and Pirrotta, V., 2010. Alternative epigenetic chromatin states of polycomb target genes. *PLoS Genetics*, 6(1).
- Schwartz, Y.B. and Pirrotta, V., 2007. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nature Reviews Genetics*, 8(1), pp.9–22.
- Selker, E.U. et al., 2003. The methylated component of the *Neurospora crassa* genome. *Nature*, 422(6934), pp.893–897.
- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A. and Shi, Y., 2004. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119(7), pp.941–953.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J., Grandaubert, J., Balesdent, M.H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T. and Fudal, I., 2014. Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genetics*, 10(3).
- Spivakov, M. and Fisher, A.G., 2007. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature Reviews. Genetics*, 8(4), pp.263–271.
- Spurr, A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*, 26(1–2), pp.31–43.
- St. Clair, D.A., 2010. Quantitative disease resistance and quantitative resistance loci in breeding. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1), pp.247–268.
- Studt, L., Rösler, S.M, Burkhardt, I, Arndt, B., Freitag, M., Humpf, H.U., Dickschat, J.S. and Tudzynski, B., 2016. Knock-down of the methyltransferase *Kmt6* relieves H3K27me3 and results in induction of cryptic and otherwise silent secondary metabolite gene clusters in *Fusarium fujikuroi*. *Environmental Microbiology*, 18(11), pp.4037–4054.

- Sugui, J.A., Leite, B. and Nicholson, R.L., 1998. Partial characterization of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germlings of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52(6), pp.411–425.
- Tachibana, M., Sugimoto, K., Fukushima, T. and Shinkai, Y., 2001. SET Domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *Journal of Biological Chemistry*, 276(27), pp.25309–25317.
- Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., Allis, C.D., Cheng, X. and Selker, E.U., 2003. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature Genetics*, 34(5), pp.75–79.
- Tamaru, H. and Selker, E.U., 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature*, 414(6861), pp.277–283.
- Thiru, A., Nietlispach, D., Mott, H.R., Okuwaki, M., Lyon, D., Nielsen, P.R., Hirshberg, M., Verreault, A., Murzina, N.V. and Laue, E.D., 2004. Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin. *The EMBO Journal*, 23(3), pp.489–499.
- Voigt, A., 2011. „Analyse epigenetischer Faktoren des Maispathogens *Colletotrichum graminicola* und deren Bedeutung für die Infektion des Wirtes“. *Diplomarbeit. Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biologie, Professur für Entwicklungsgenetik (Halle (Saale) Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Deutschland)*
- Waddington, C.H., 1942. The epigenotype. *International Journal of Epidemiology*, 1, pp.18–20.
- Weihmann, F., Eisermann, I., Becher, R., Krijger, J.-J., Hübner, K., Deising, H.B. and Wirsig, S. G. R., 2016. Correspondence between symptom development of *Colletotrichum graminicola* and fungal biomass, quantified by a newly developed qPCR assay, depends on the maize variety. *BMC Microbiology*, pp.1–14.
- Weinhofer, I., Hehenberger, E., Roszak, P., Hennig, L. and Köhler, C., 2010. H3K27me3 profiling of the endosperm implies exclusion of polycomb group protein targeting by DNA methylation. *PLoS Genetics*, 6(10), pp.1–14.
- Welz, H.G. and Geiger, H.H., 2000. Genes for resistance to northern corn leaf blight in diverse maize populations. *Plant Breeding*, 119(1), pp.1–14.
- Werner, S., Sugui, J.A., Steinberg, G. und Deising, H.B., 2007. A chitin synthase with a myosin-like motor domain is essential for hyphal growth, appressorium differentiation and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 20, pp.1555-1567.
- Wisser, R.J., Balint-Kurti, P.J. and Nelson, R.J., 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: a synthesis of published studies. *Phytopathology*, 96(2), pp.120–129.
- Yamamoto, K. and Sonoda, M., 2003. Self-interaction of heterochromatin protein 1 is

required for direct binding to histone methyltransferase, SUV39H1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(2), pp.287–292.

Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y. and Scazzocchio, C., 2004. Double-joint PCR: A PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11), pp.973–981.

Zhang, X., Liu, X., Zhao, Y., Cheng, J., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D. and Chen, T., 2016. Histone H3 lysine 9 methyltransferase DIM5 is required for the development and virulence of *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 7.

Zhang, Y. and Reinberg, D., 2001. Transcription regulation by histone methylation: Interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes and Development*, 15(18), pp.2343–2360.

Zhao, T., Heyduk, T. and Eisenberg, J.C., 2001. Phosphorylation site mutations in heterochromatin protein 1 (HP1) reduce or eliminate silencing activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(12), pp.9512–9518.

Zwonitzer, J.C., Coles, N.D., Krakowsky, M.D., Arellano, C., Holland, J.B., McMullen, M.D., Pratt, R.C. and Balint-Kurti, P.J., 2010. Mapping resistance quantitative trait loci for three foliar diseases in a maize recombinant inbred line population-evidence for multiple disease resistance? *Phytopathology*, 100(1), pp.72–79.

8. Anhang

8.1. Chromatinorganisation der analysierten Ascomyceten

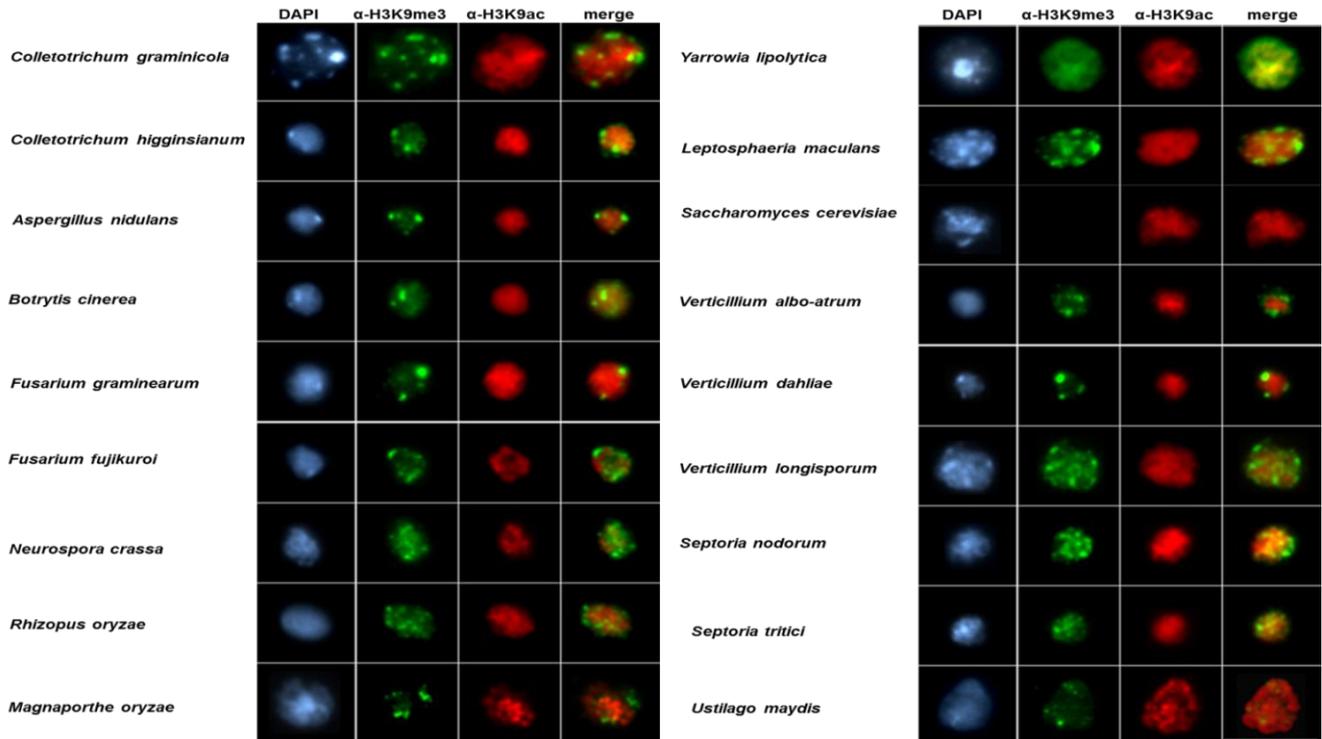


Abbildung 22: Chromatinverteilung und H3K9me3 Färbungen der analysierten Pilze.

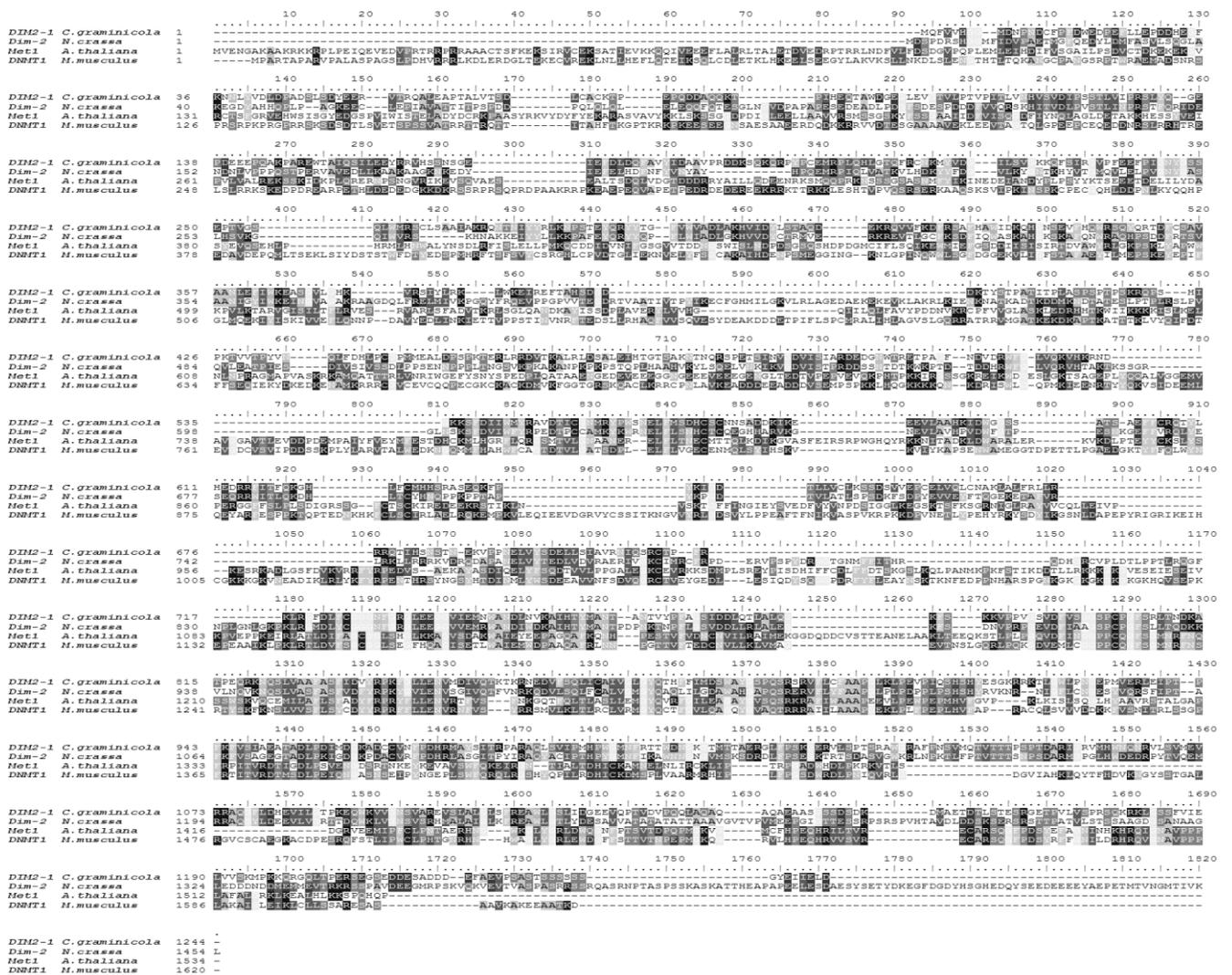


Abbildung 24: Sequenzalignement von CgDIM2-1 mit anderen Organismen.

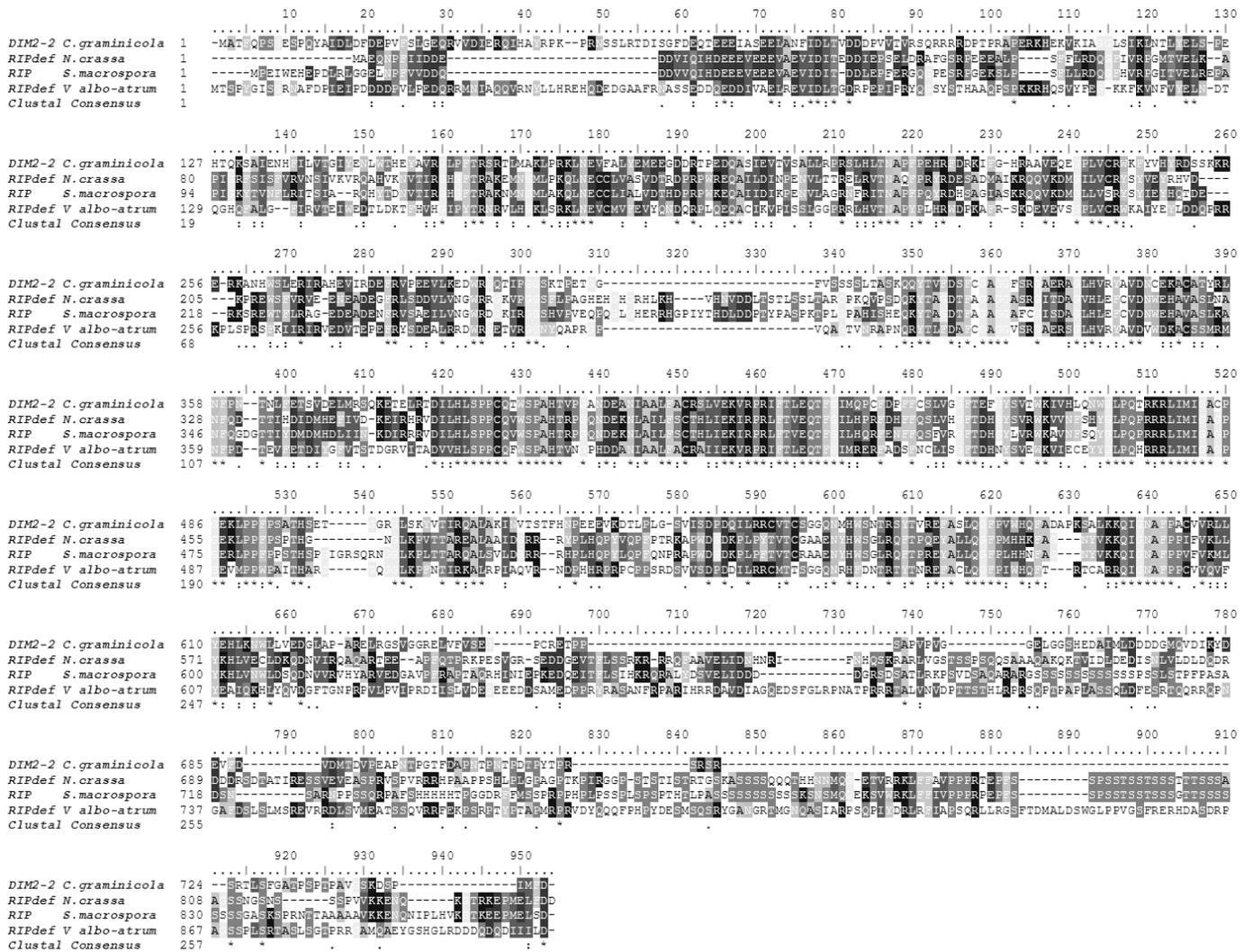


Abbildung 25: Sequenzalignement von CgDIM2-2 mit anderen Organismen.

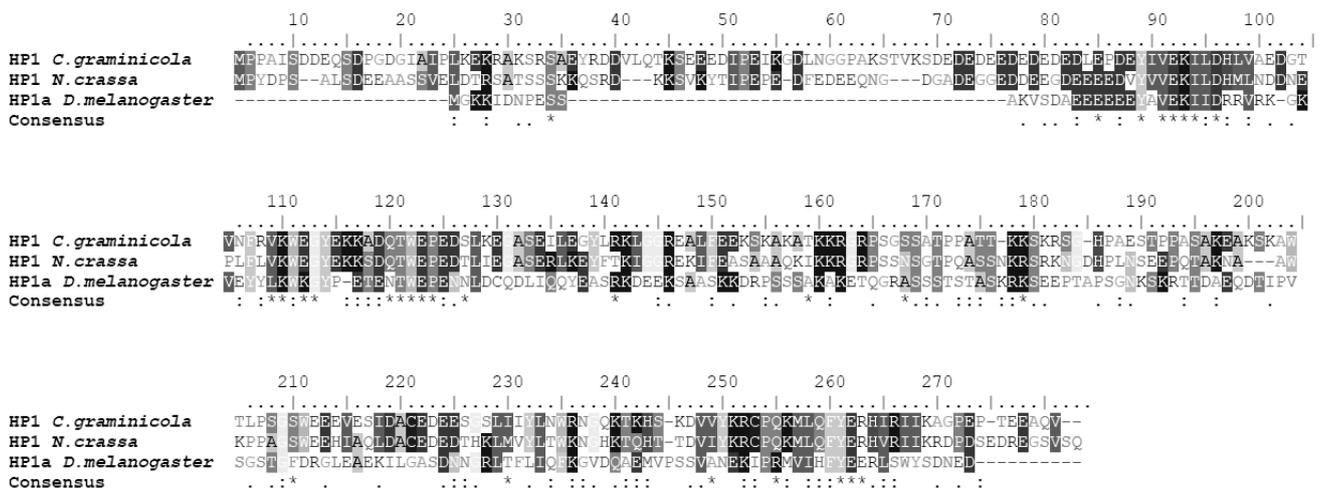


Abbildung 26: Sequenzalignement von CgHP1 mit anderen Organismen.

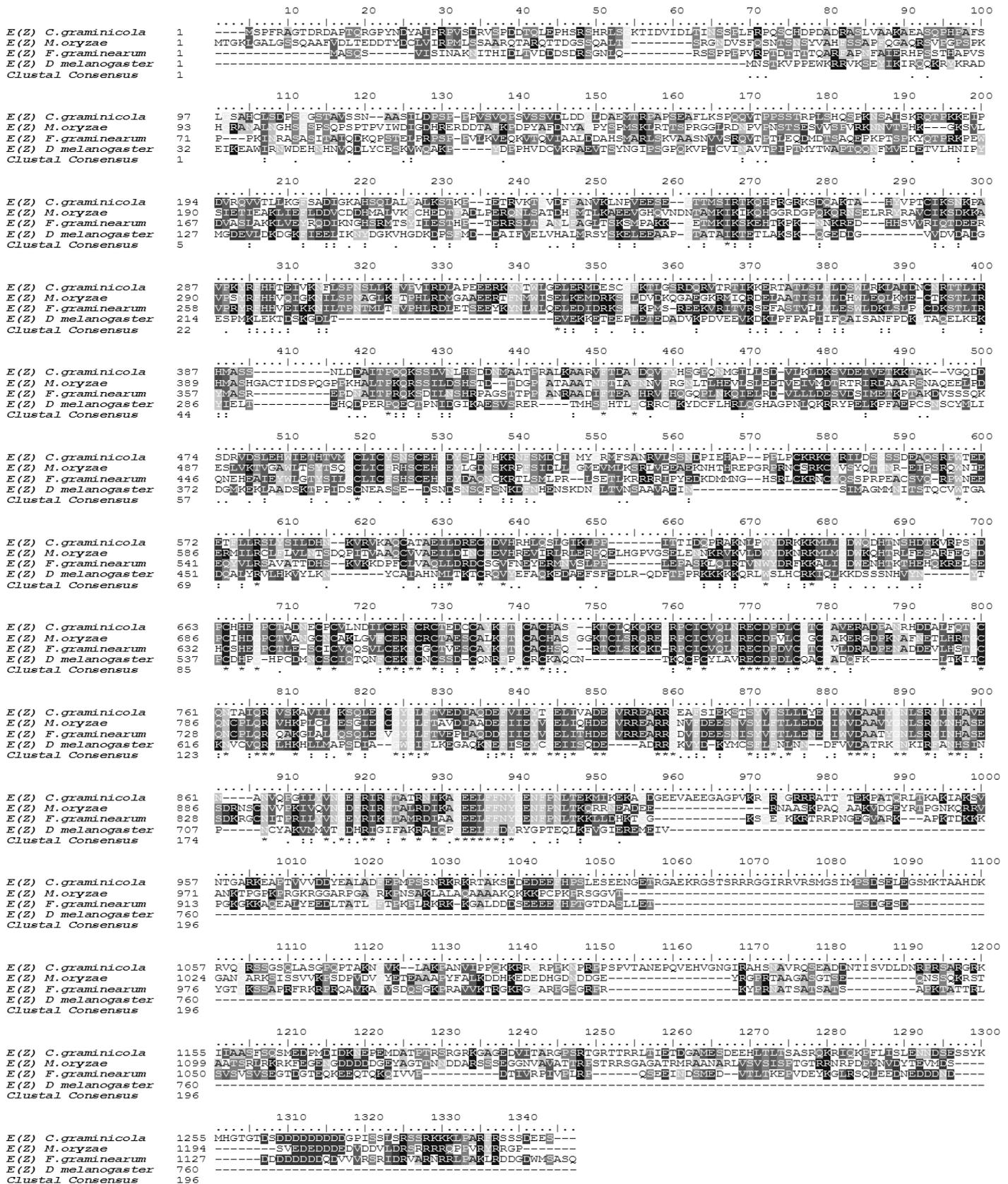


Abbildung 27: Sequenzalignement von Cg(Z) mit anderen Organismen.

8.3. Sequenzen der HP1-GFP Mutanten nach Mutagenese

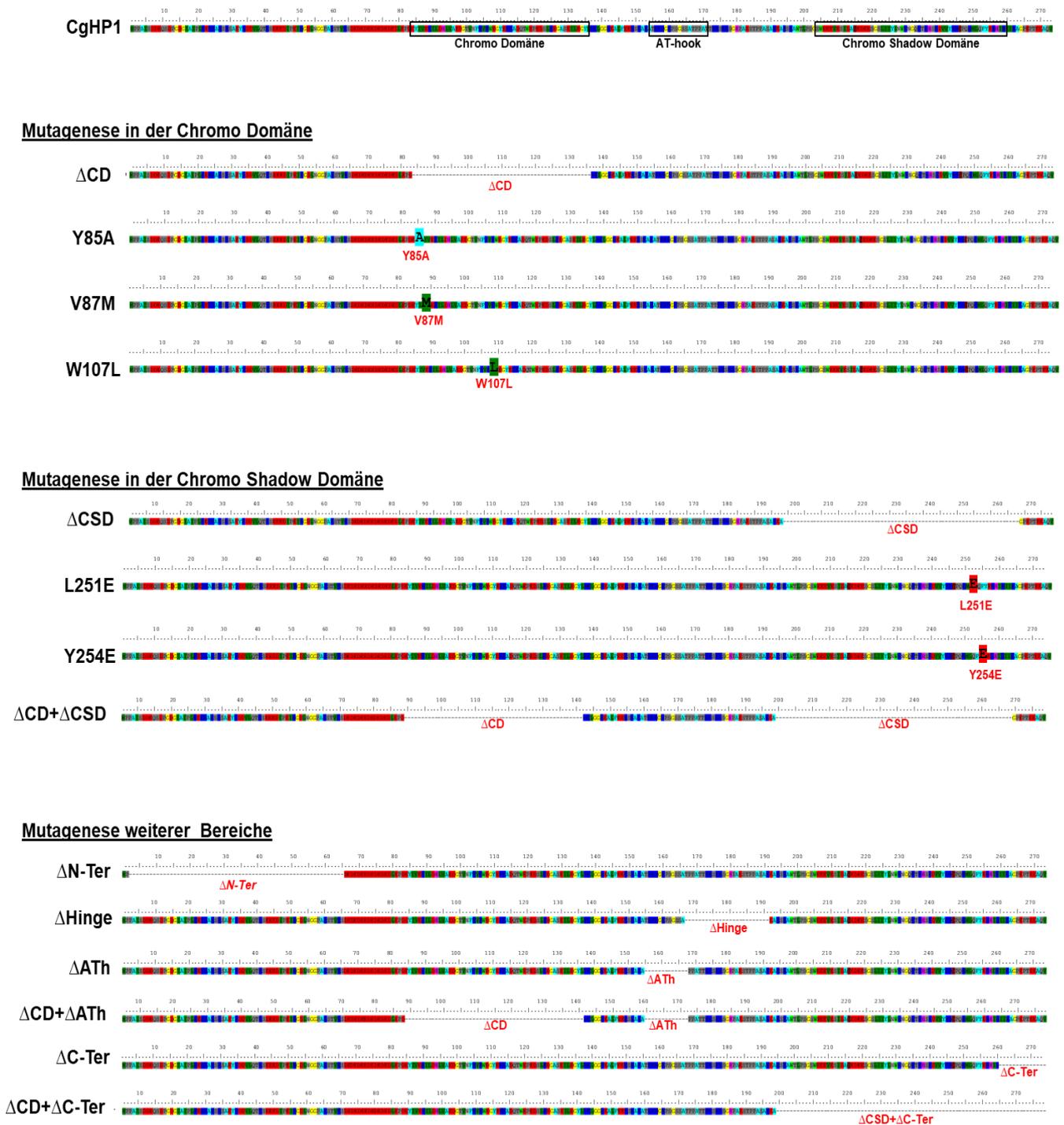


Abbildung 29: Sequenznachweis der erfolgreichen Mutagenese für die einzelnen HP1-GFP Mutanten.

8.4. Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta hp1$

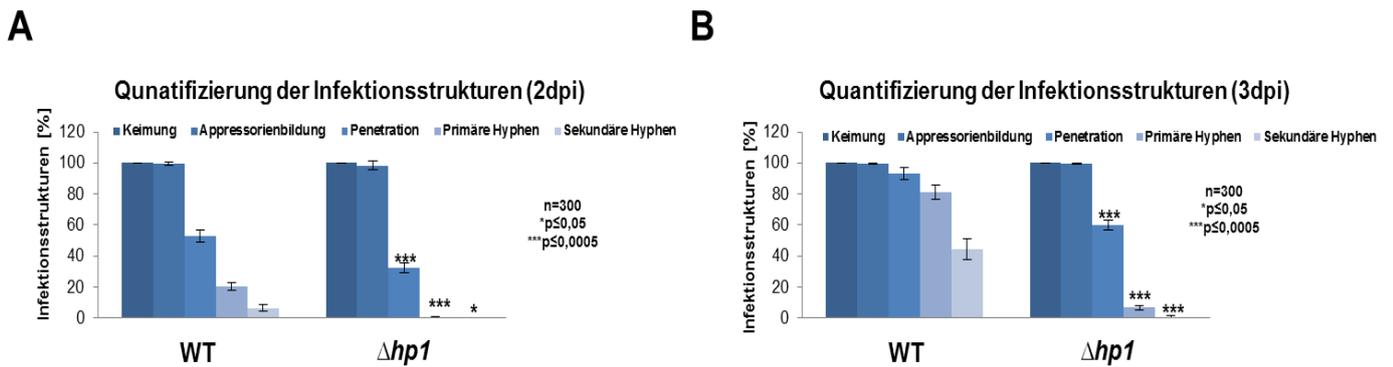


Abbildung 30: Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta hp1$. (A)+(B) Die Auszählung der Infektionsstrukturen erfolgte 2 und 3 Tage nach der Inokulation der Maispflanzen (n=300). Signifikanz - t-Test: *p \leq 0,05, **p \leq 0,005, ***p \leq 0,0005.

8.5. H3K9me3 Western Blots der HP1-GFP Mutanten

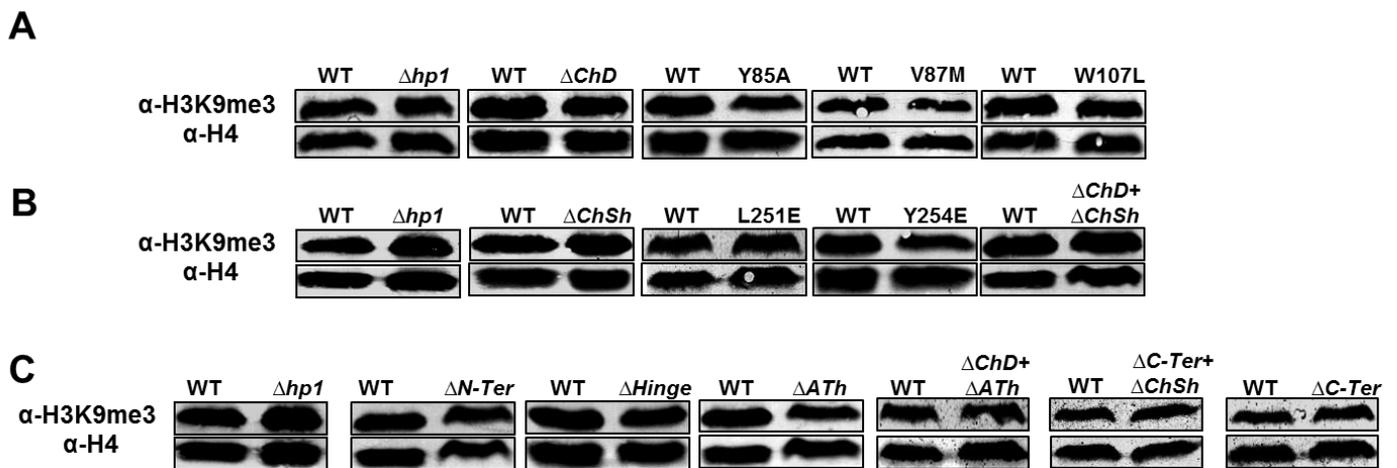


Abbildung 31: H3K9me3 Western Blots der HP1-GFP Mutanten. Die Western Blot Analysen zeigen keine Veränderung in der H3K9 Trimethylierung. Als Ladekontrolle wurde ein spezifischer Antikörper gegen das Histon H4 verwendet.

8.6. Quantifizierung der Infektionsstrukturen der Chromo Shadow Mutanten

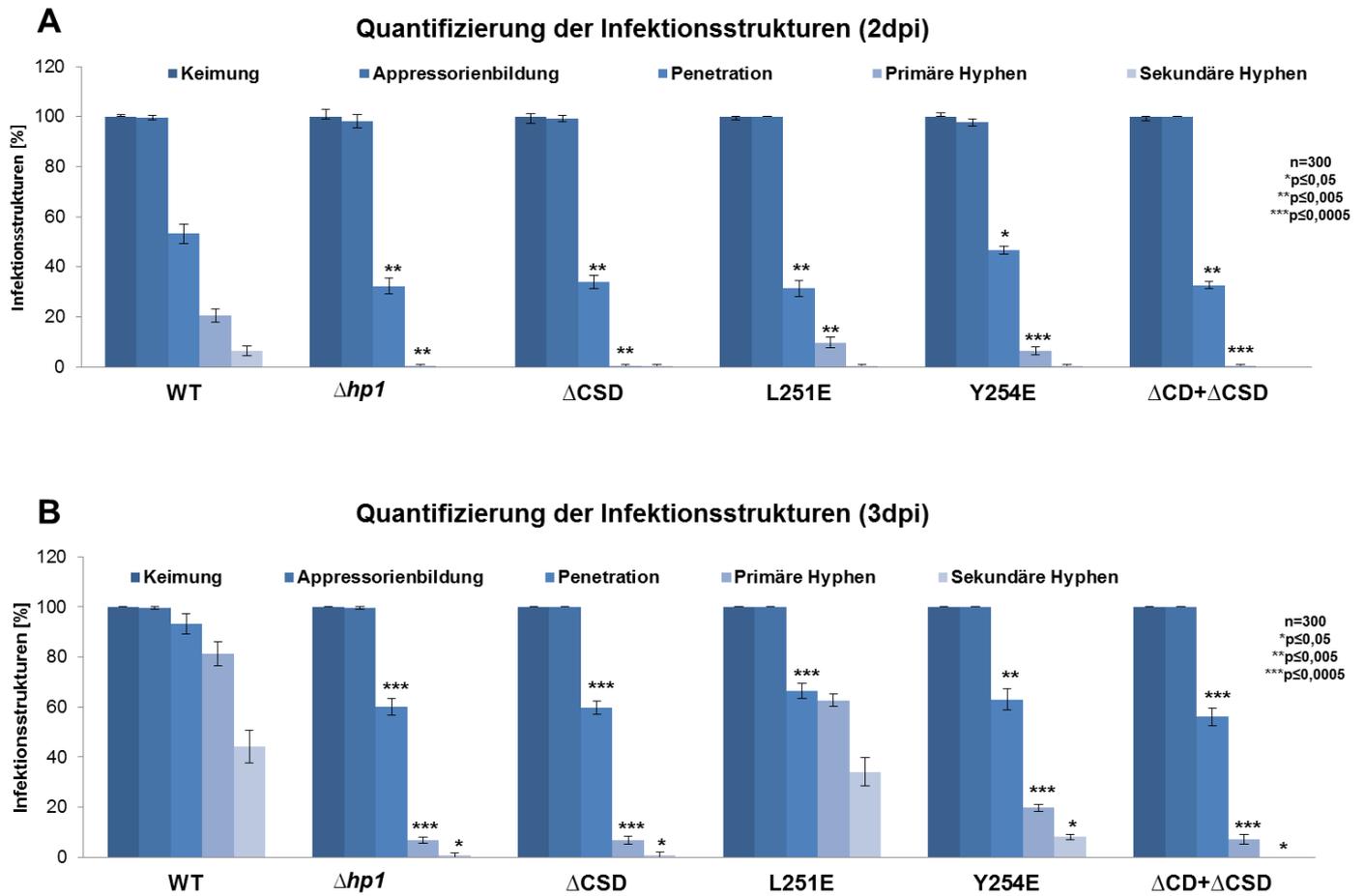


Abbildung 32: Quantifizierung der Infektionsstrukturen der Chromo Shadow Mutanten. (A)+(B) Die Auszählung der Infektionsstrukturen erfolgte 2 und 3 Tage nach der Inokulation der Maispflanzen (n=300). Signifikanz - t-Test: *p≤0,05, **≤0,005, ***≤0,0005.

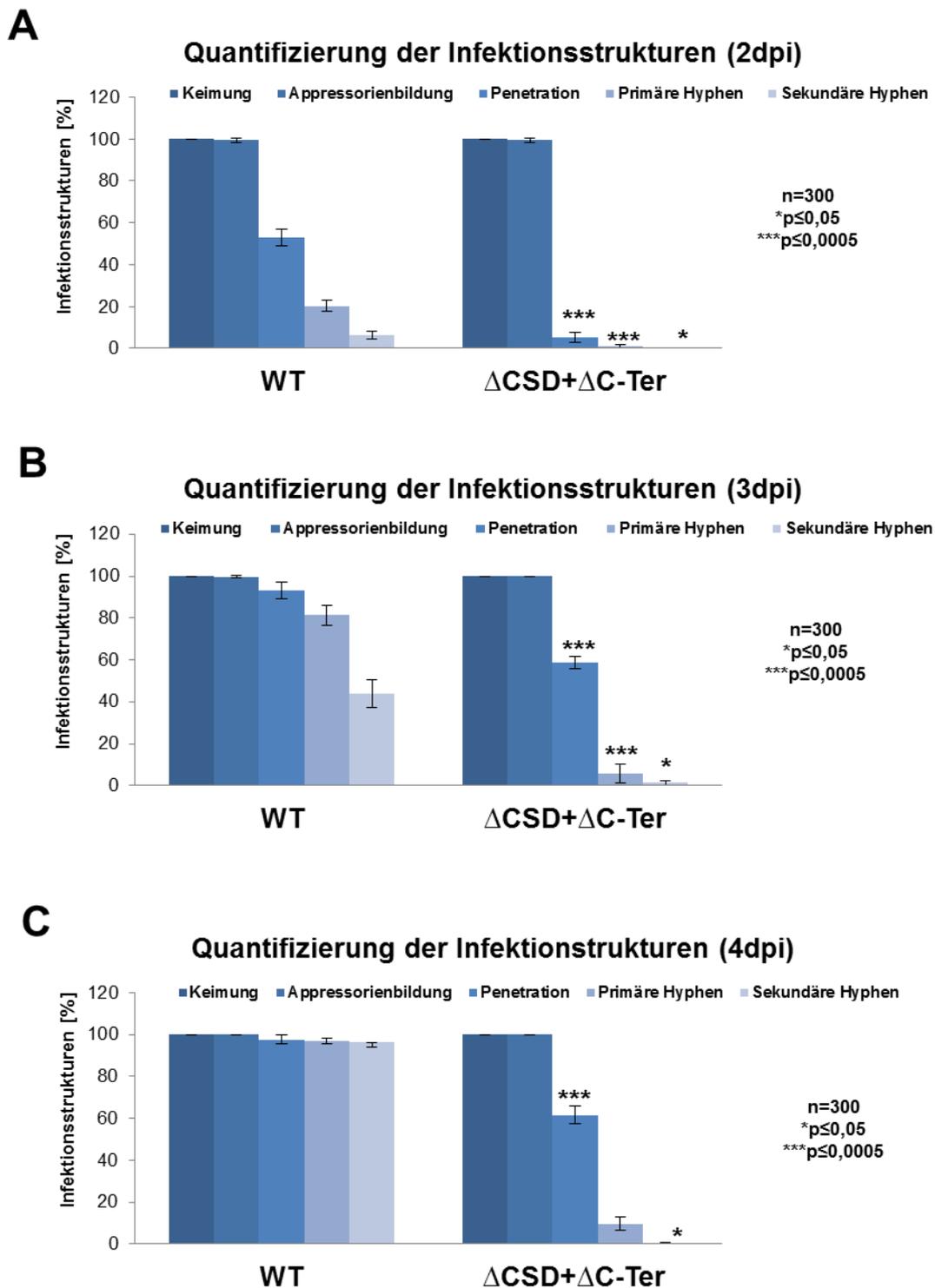
8.7. Quantifizierung der Infektionsstrukturen von Δ CSD+ Δ C-Ter

Abbildung 33: Quantifizierung der Infektionsstrukturen der Δ CSD+ Δ C-Ter Mutante. (A)+(B)+(C) Die Auszählung der Infektionsstrukturen erfolgte 2, 3 und 4 Tage nach der Inokulation der Maispflanzen (n=300). Signifikanz - t-Test: *p<0,05, **≤0,005, ***≤0,0005.

8.8. Quantifizierung der Infektionsstrukturen von $\Delta dim7$

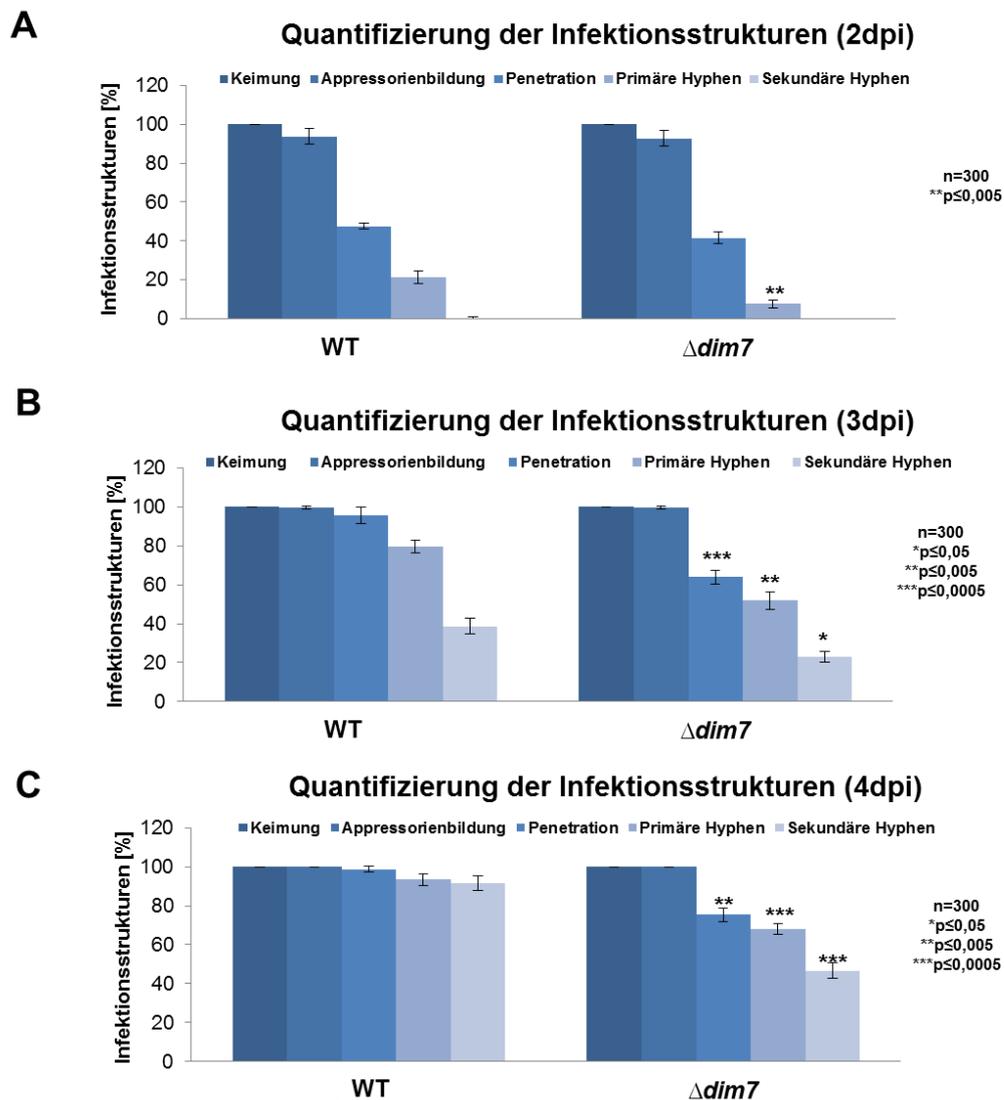
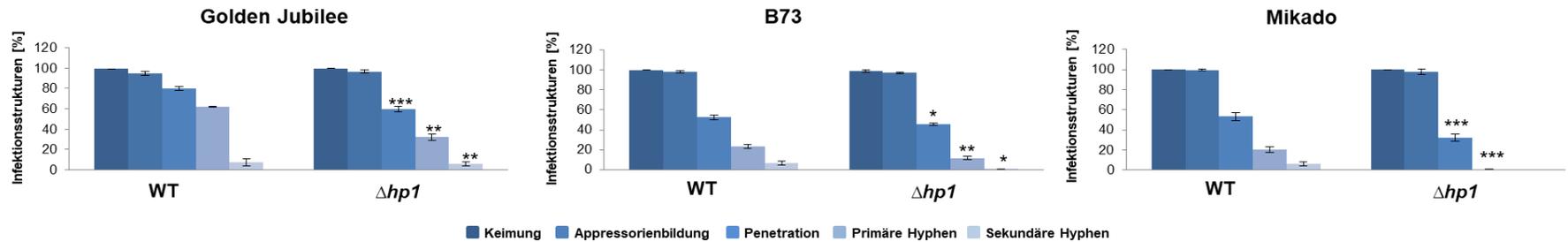


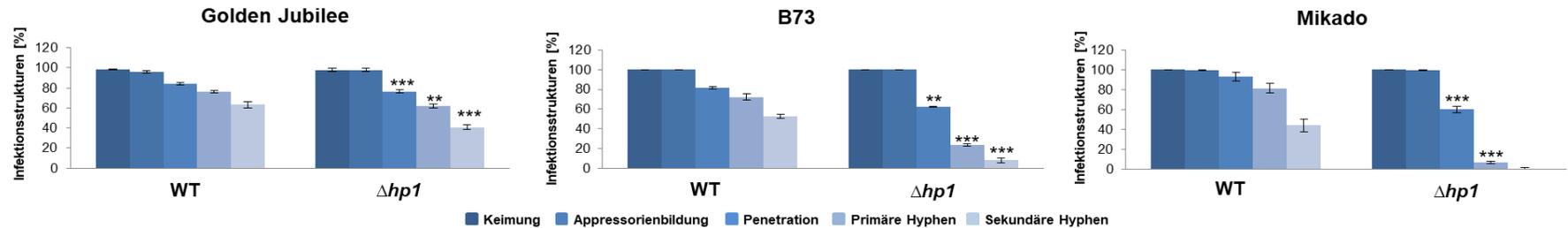
Abbildung 34: Quantifizierung der Infektionsstrukturen $\Delta dim7$. (A)+(B)+(C) Die Auszählung der Infektionsstrukturen erfolgte 2, 3 und 4 Tage nach der Inokulation der Maispflanzen (n=300). Signifikanz - t-Test: *p≤0,05, **≤0,005, ***≤0,0005.

8.9. Quantifizierung der Infektionsstrukturen auf Golden Jubilee und B73

A



B



C

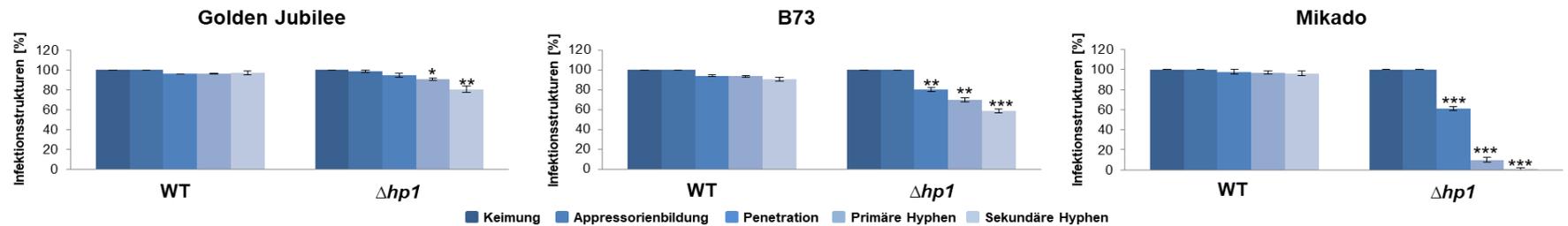


Abbildung 35: Quantifizierung der Infektionsstrukturen verschiedener Maiskultivare. Die Auszählung der Infektionsstrukturen erfolgte (A) 2, (B) 3 und (C) 4 Tage nach der Inokulation der Maispflanzen (n=300). Signifikanz - t-Test: * $p \leq 0,05$

8.10. Southern Blots der generierten Mutanten

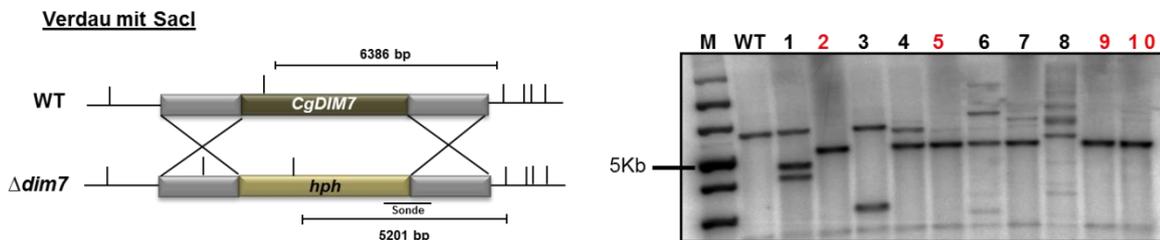


Abbildung 36: Southern Blot der Deletionsmutante $\Delta dim7$. Der Verdau erfolgte mit *SacI*. rot: positive Knockout-Mutanten

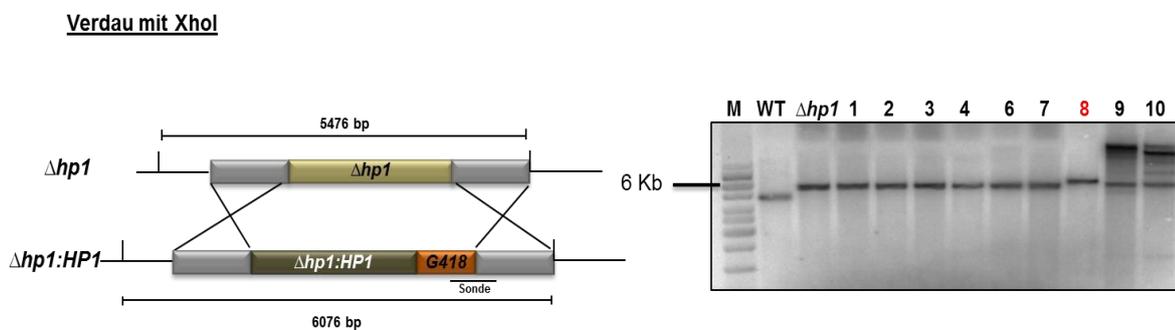


Abbildung 37: Southern Blot Komplementation von $\Delta hp1$. Der Verdau erfolgte mit *XhoI*. rot: positive Komplementationsmutanten $\Delta hp1:HP1$

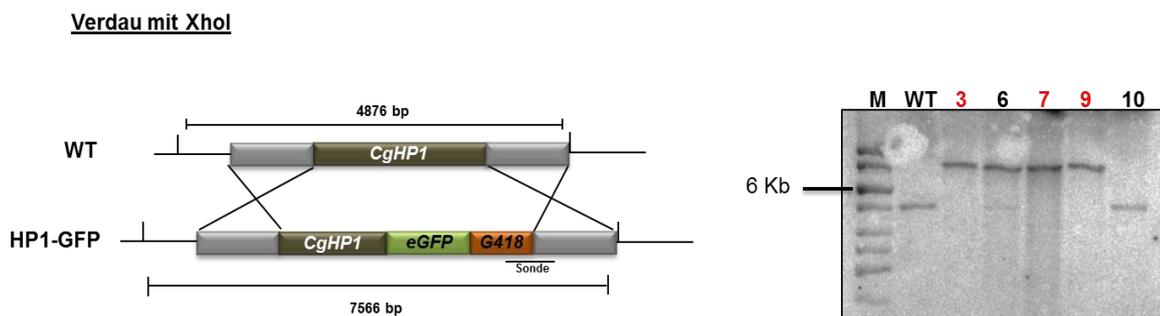


Abbildung 38: Southern Blot des HP1-GFP Fusionskonstrukt. Der Verdau erfolgte mit *XhoI*. rot: positive HP1-GFP Mutanten

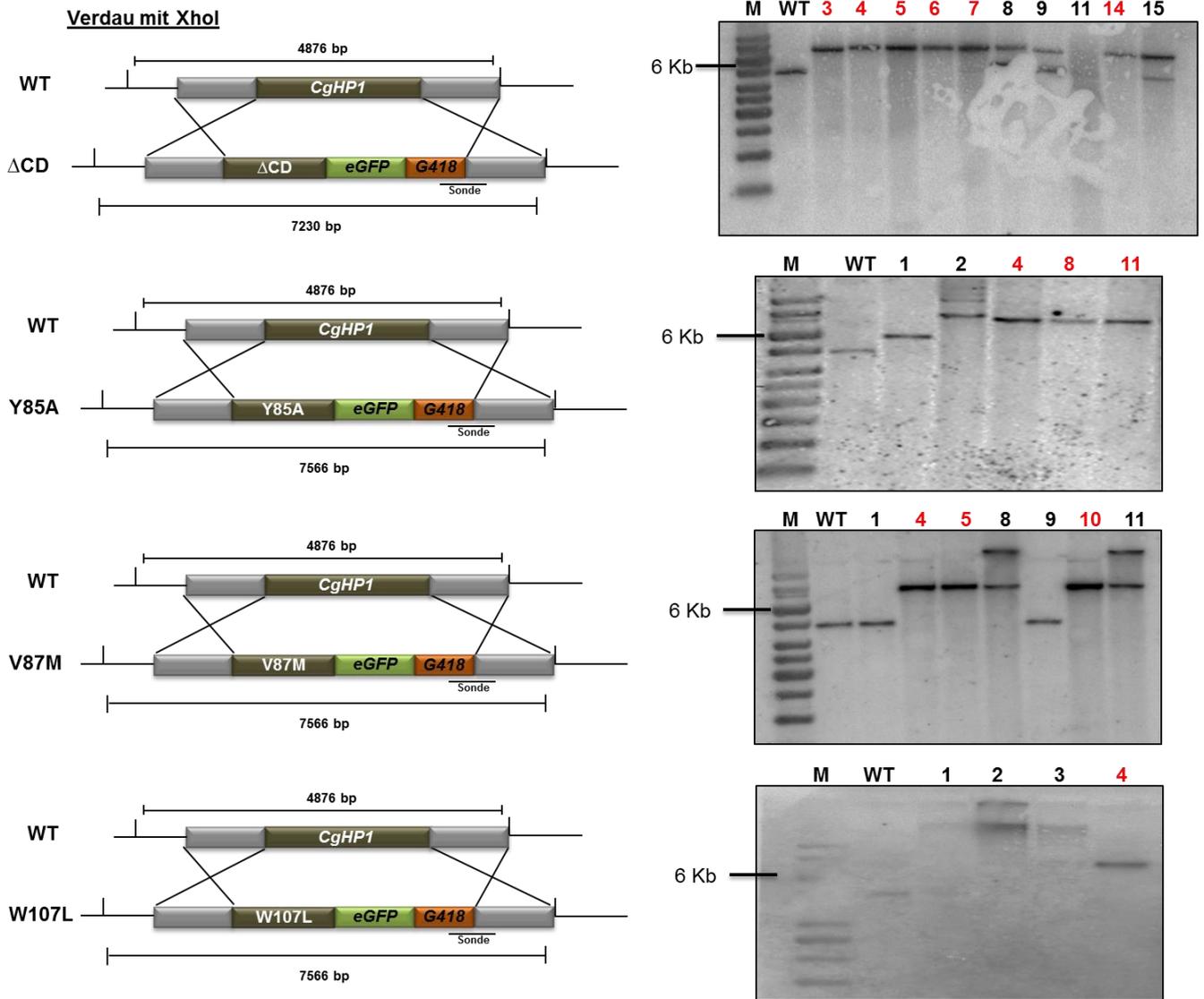


Abbildung 39: Southern Blot der HP1-GFP Chromo Domänen Mutanten. Der Verdau erfolgte mit XhoI. rot: positive HP1-GFP Mutanten

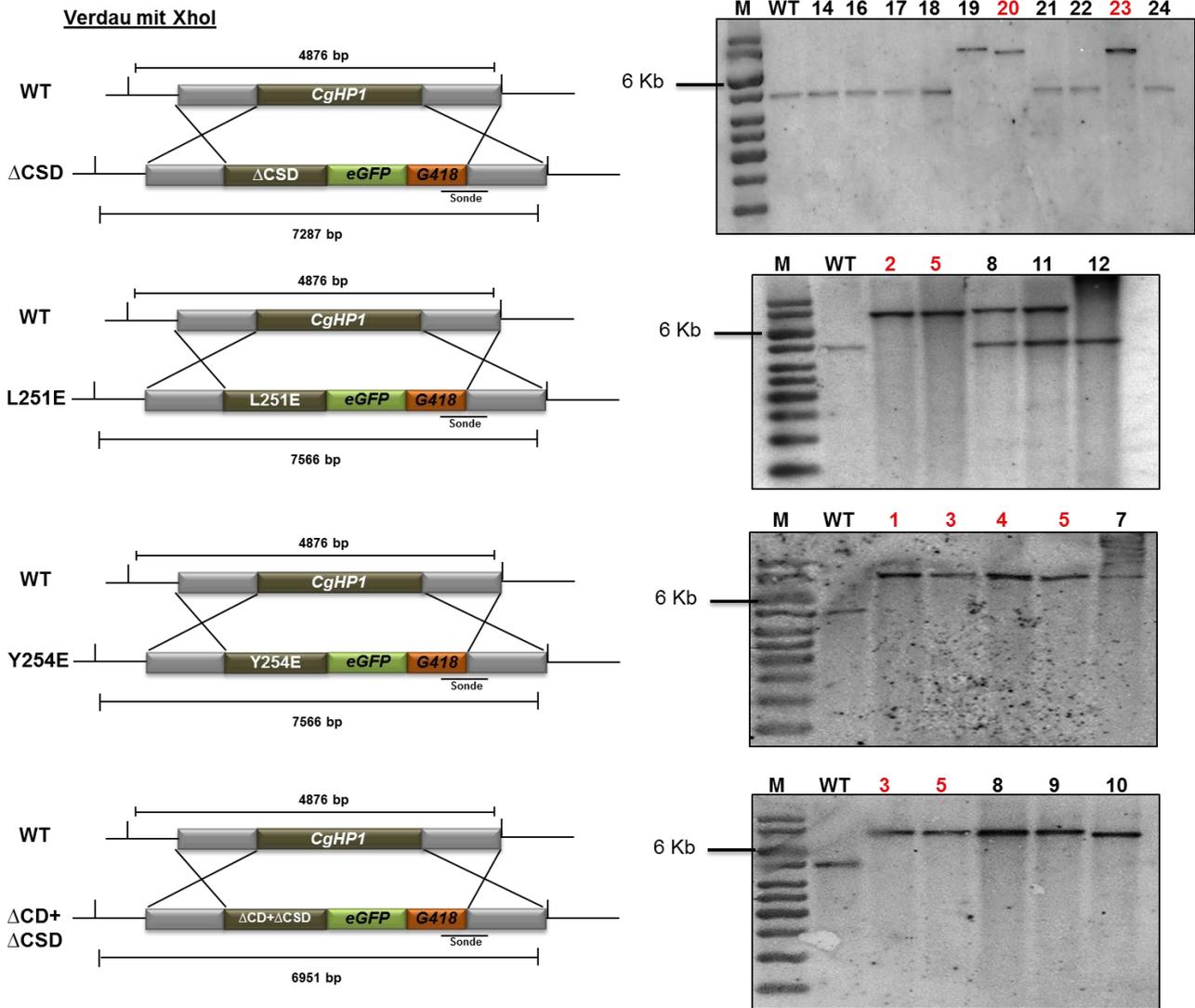


Abbildung 40: Southern Blot der HP1-GFP Chromo Shadow Domänen Mutanten. Der Verdau erfolgte mit XhoI. rot: positive HP1-GFP Mutanten

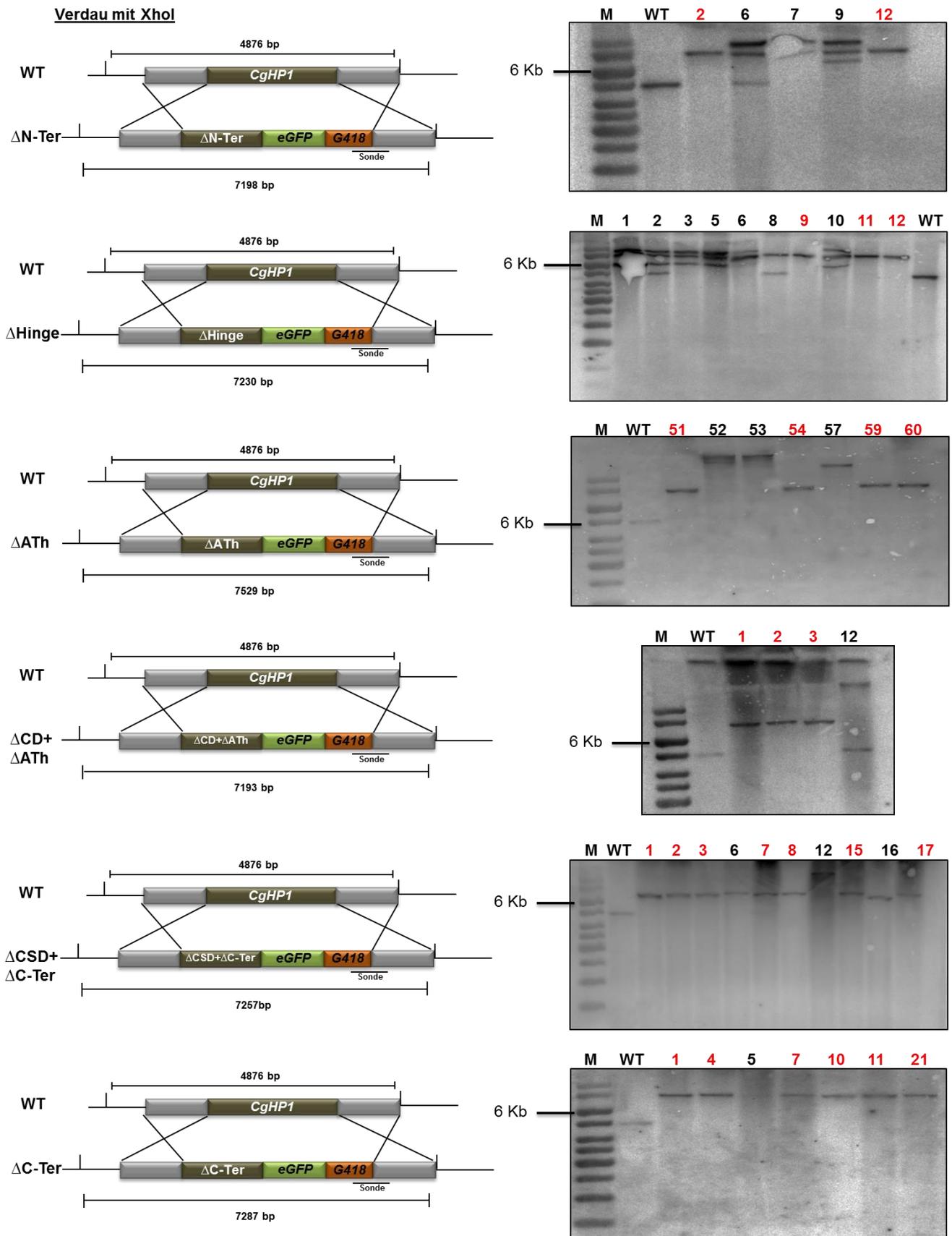


Abbildung 41: Southern Blot der HP1-GFP Deletionsmutanten weiterer Domänen. Der Verdau erfolgte mit XhoI. rot: positive HP1-GFP Mutanten

8.11. Liste aller verwendeter Pilzlinien

Tabelle 13: Verwendete Pilzlinien

Stamm	Stammbezeichnung
<i>Neurospora crassa</i> Shear & Dodge	DSM 1257
<i>Botrytis cinerea</i> Pers.: Fr. (anamorph)	DSM 4709
<i>Rhizopus oryzae</i> Went & Prinsen Gerligs	DSM 5772
<i>Aspergillus nidulans</i> (Eidam) Winter	DSM 63358
<i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke & Berthold	DSM 12230
<i>Ustilago maydis</i> (de Candolle) Corda	DSM 17146
<i>Yarrowia lipolytica</i> (Wickerham et al.) van der Walt & von Arx	DSM 21175
<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	DSM 23352
<i>Fusarium fujikuroi</i>	IMI58289 (CMI Institute, Kew, UK)
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	AG Deising
<i>Leptosphaeria maculans</i>	FSK 2857
<i>Verticillium dahliae</i>	V.d.2 Isolat (Zeise)
<i>Verticillium longisporum</i>	V.I.32 Isolat Zeise
<i>Septoria tritici</i>	12 H5 (Morzfeld)
<i>Septoria nodorum</i>	A-326/2 Mavridis
<i>Magnaporthe oryzae</i>	MG 1.2 Vorbeck

8.12. Liste aller verwendete Antikörper

Tabelle 14: Verwendete Antikörper

Antikörper	Firma	Antikörper	Firma
Primäre Antikörper		H3K14ac	Abcam ab82501
H3K4me1	Active Motif AM39297	H3K18ac	Abcam ab61235
H3K4me2	Active Motif AM39141	H3K23ac	Abcam ab47813
H3K4me3	Active Motif AM39159	H3K27ac	Abcam ab4729
H3K9me1	Abcam ab89906	H4K5ac	Millipore 06-759-MN
H3K9me2	Abcam ab1220	H4K8ac	Millipore 06-760-MN
H3K9me3	Diagenode 146-050	H4K12ac	Millipore 06-761-MN
H3K27me1	Millipore 07448	H4K16ac	Millipore 06-762-MN
H3K27me2	Abcam ab24684	5-MeC	Biorad MCA2201
H3K27me3	Active Motif AM61017	Histone H3	Abcam ab4729
H3K27me2/3	Active Motif AM39535	Histone H4	Abcam ab10158
H3K36me1	Active Motif AM61351	Sekundäre Antikörper	
H3K36me2	Active Motif AM39256	GAM HrP	Life Technologies G21040
H3K36me3	Active Motif AM61017	GAR HrP	Life Technologies G21234
H4K20me1	Upstate 07-440	GAM 488	Lifetechnologies A1108
H4K20me2	Upstate 05-672	GAR 488	Lifetechnologies A1101
H4K20me3	Diagenode 057-050	GAR 555	Lifetechnologies A21428
H3K9ac	Abcam ab10812		

8.13. Liste aller verwendeter Primer

Tabelle 15: Verwendete Primer

Oligoname	Sequenz
HP1- Primer	
05406_5'_for	CTTAGGGCTACTGCCTGGAG
05406_li_rev	GTGCAACTGACAGTCGTACACGCGAATAGTACTTGTTGA
05406_re_for	CCGTCTGGAGTCTCACTAGCTTTACAAAAGCTCGACAT
05406_3'_rev	GGATAGCGGTTGGATAAAGC
05406_nested_for	AGAGGCGTTGTTGGATGAAG
05406_nested_rev	GCAAGCACCGATATGTGATG
cHP1_5'Fl_f	CTTAGGGCTACTGCCTGGAG
cHP1_ORF_r	TTCGTGGCCTTCACGGCATCTAAACCTGGGCCTCCTCCG
cHP1_3'FL_f	ATCCACTTAACGTTACTGATACAAAAGCTCGACATTTAAG
cHP1_3'Fl_r	AGATCGCAAGCACCGATATG
cHP1_nes_f	ATTCATAATGCCGGCAGTC
cHP1_nes_r	TTGTGGCGGAGGTTGAGTAG
Sonde_Hyg_for	CCGCATAACAGCGGTCATTG
Hp1_Sonde_for	GCTCCTGCCGAGAAAGTATC
Hp1_Sonde_rev	CAAAGGAGCCCGATTTCTCTG
DIM7-Primer	
DIM7_3FL_for	GATCCGACGCCGAGAATGAG
DIM7_5FL_rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAAGTGACAACGGCCTAGGCTC
DIM7_3FL_for	TCTGGAGTCTCACTAGCTTCATTTGCCCCGGCACATGGGA
DIM7_3FL_rev	GGCGTTTGCACTTTGAGG
DIM7_nes_for	GCGCGAATCCCTCTTAACGG
DIM7_nes_rev	TGTGCAAACGCTCAACAAGG
DIM7_Sonde_for	GCAGGATCTCCTGTCTATCTC
DIM7_Sonde_rev	TGTCAAATCGGCATCGTAGG
Selektionsmarker	
uni-hyg.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACTGACCGGTGCCTGGATCTTC
uni-hyg.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACGGTCGGCATCTACTCTATTCC
uni-G418.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACAGCGGTTGTTGGATTAAG
uni-G418.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
RT-Primer	
DIM5_RT2_f	CCAGATTCGTTTCGTTCCCTA
DIM5_RT2_r	ATGGGTCGCTTTGAGTTCAG
HP1_RT2_f	GTCGTCCTTCTGGATCTTCG
HP1_RT2_r	TGCGCCAGTTCAGATAGATG
E(Z)_RT_f	GCAGGTTGTCACCTTTGCTGA
E(Z)_RT_r	AGCTCCCCTAACCAGGTGTT
LSD1_RT2_f	AACGACTGCTTGGATCGAGT
LSD1_RT2_r	ATGTCCACCCCATCATCTA
DIM2-1_RT_f	GGGTTGCTTGAAAACGTCAT
DIM2-1_RT_r	TATGTCTGGCAGGTCTGCTG
DIM2-2_RT_f	GAGCTGAGCCCTGAGCATAAC
DIM2-2_RT_r	GCCCAAAAATCTTTTCGATCA
DIM7_RT_for	CATCGAAACGTTGCTCTTCA
DIM7_RT_rev	GCTTTTCTGTCTCCGTTTCG
CgCHSII1	ACCCAACCTAGGTCCTCTCC
CgCHSII3	TGATTCTGTGAGACTGTATGCG
Mutagenese-Primer	
Y85A	
TAC1490-GCG f	CGGGCTGACATTGCTTCAGGGCGATTGTAGAGAAGATCCTCGA

TAC1490-GCG r	TCGAGGATCTTCTCTACAATCGCCCTGAAGCAATGTCAGCCCG
V87M	
GTA1496-ATG f	CTGACATTGCTTCAGGTACATTATGGAGAAGATCCTCGACCATCTG
GTA1496-ATG r	CAGATGGTCGAGGATCTTCTCCATAATGTACCTGAAGCAATGTCAG
ΔATh	
del1820-1861 f	AAGTCCAAGGCCAAGCCACCAGCAACCACC
del1820-1861 r	GGTGGTTGCTGGTGGCTTGGCCTTGGACTT
L251E	
L161E f	CAGGATACCACTTGAAGATGGAGCAATTCTACGAAAGACACA
L161E r	TGTGTCTTTTCGTAGAATTGCTCCATCTTCAAGTGGTATCCTG
Y254E	
Y164E f	TACCACTTGAAGATGCTGCAATTCGaGGAAAGACACATTCGTATCATCAAG
Y164E r	CTTGATGATACGAATGTGTCTTTTCTCGAATTGCAGCATCTTCAAGTGGTA
W107L	
g602t	TCAACTTCCGCGTCAAGTTGGAAGGCTATGAGAA
g602t_antisense	TTTCATAGCCTTCCAACCTTGACGCGGAAGTTGA
ΔCD	
del1432-1768	GATCTGGAGCCCGACAGAAAGCTCGGTGGG
del1432-1768-antisense	CCCACCGAGCTTCTGTCTGGGCTCCAGATC
ΔCSD	
del1940-2219-antisense	GGGCTCGGGCCGGCCTCCTTTGC
del1940-2219	GCAAAGGAGGCCGGCCCGAGCCC
ΔN-Terminus	
del1015-1383	ACTATTCGCGATGCCAGACGAAGACGAGGAAG
del1015-1383-antisense	CTTCCTCGTCTTCGTCTGGCATCGCGAATAGT
ΔC-Terminus	
del2208-2246-antisense	CGCCCTTGCTCACAAACGAATGTGTCTTTTCG
del2208-2246	CGAAAGACACATTCGTGTTGTGAGCAAGGGCG
ΔHinge	
del1859-1933	TTCTGGATCTTCGGCCGAGGCCAAGAGCAAAG
del1859-1933-antisense	CTTTGCTCTTGGCCTCGGCCGAAGATCCAGAA
ΔCSD+ΔC-Ter	
del1940-2249-antisense	CGCCCTTGCTCACGGCCTCCTTTGCC
del1940-2249	GGCAAAGGAGGCCGTGAGCAAGGGCG

8.14. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende wissenschaftlichen Arbeit selbstständig und nur mit die angegebenen Hilfsmittel verfasst habe. Alle wörtlichen und inhaltlichen verwendeten Stellen habe ich entsprechend gekennzeichnet.

Außerdem bestätige ich, dass ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe und die Dissertation in keinen anderem Promotionsverfahren eingereicht habe.

Halle, den

8.15. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Reuter für die Möglichkeit dieses interessante Thema bearbeiten zu können. Ich danke ihm für die ständige Diskussionsbereitschaft und den zahlreichen Anregungen und Ideen, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Bei den Gutachtern bedanke ich mich für die Bereitschaft zur Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Professor Deising danke ich ebenfalls für eine stete Diskussionsbereitschaft, sowie seiner Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenschutz für die freundliche Zusammenarbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn Dr. Andreas Fischer für die umfangreiche, intensive und freundschaftliche Zusammenarbeit während der gesamten Arbeitszeit, für die fachliche Kompetenz in unzähligen Diskussionsrunden, für die experimentelle Hilfe im Labor und die Einweisung in neue Arbeitsmethoden.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik bedanke ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, sowie den regen Gedankenaustausch und der experimentellen Unterstützung.

Ein weiterer Dank geht an die Studenten, die im Rahmen ihrer Abschlussarbeiten oder Praktika zum Erfolg des Projektes beigetragen haben.

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Zusätzlich geht mein Dank an das Interdisziplinäre Zentrum für Nutzpflanzenforschung (IZN) und den SFB648 für die finanzielle Förderung.

8.16. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Dipl. Biologe Wiebke Kummer
 Geburtsdatum und –Ort: 26.07.1985 in Leipzig
 Staatangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung & Ausbildung

Schulbildung

08/1996 bis 07/2004 Besuch des Immanuel- Kant-Gymnasiums in Leipzig
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2004 bis 12/2010 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale
 Abschluss: Diplom-Biologe

Diplomarbeit: „Identifizierung von Virulenzgenen im
 Maispathogen *Colletotrichum graminicola* via
 Zufallsmutagenese“

Seit 01/2011 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Professor für
 Entwicklungsgenetik, Martin-Luther-Universität Halle-
 Wittenberg“

Halle, den

8.17. Publikationen

Niehaus E. M., Studt, L. von Bargen, K. W., Kummer, W., Humpf, H. U., Reuter, G., Tudzynski, B., 2016. Sound of silence: the beauvericin cluster in *Fusarium fujikuroi* is controlled by cluster-specific and global regulators mediated by H3K27 modification. *Environmental Microbiology*, 18(11), pp.4282–4302.