

**Die Histon-H4K20-Methyltransferase Kmt5 des  
Maispathogens *Colletotrichum graminicola* ist ein Virulenzfaktor  
und steuert die Genexpression in vegetativen Hyphen**

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III  
Agrar- und Ernährungswissenschaften,  
Geowissenschaften und Informatik

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau M.Sc. Iris Gase  
geboren am 04.06.1988 in Jena

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Holger B. Deising

Herr Prof. Dr. Uwe Conrath

Verteidigt am 20.05.2019

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VIII
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Bedeutung von <i>Colletotrichum graminicola</i> .....	1
1.2 Die Biologie und der Lebenszyklus von <i>C. graminicola</i> .....	2
1.3 Chromatinstruktur und epigenetische Modifikationen.....	4
1.3.1 Histon-Lysin-Methylierung.....	5
1.3.2 Die Bedeutung von Histon-H4K20-Methyltransferasen.....	5
2 Ziele der Arbeit .....	9
3 Material und Methoden .....	10
3.1 Biologisches Material .....	10
3.1.1 Bakterien .....	10
3.1.2 Pilze.....	10
3.1.3 Pflanzen.....	10
3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	11
3.2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen .....	11
3.2.2 Vektoren.....	17
3.2.3 Oligonukleotide.....	18
3.3 Molekularbiologische Methoden .....	23
3.3.1 Präparation von Nukleinsäuren.....	23
3.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	25
3.3.3 PCR-Anwendungen .....	25
3.3.4 DNA-Sequenzierung zur Identifikation von klonierten PCR-Fragmenten .....	32
3.3.5 Klonierung von PCR-Produkten .....	33
3.3.6 Transformationstechniken.....	34
3.3.7 Southern-Hybridisierung.....	36
3.3.8 Immunzytologischer Nachweis von Histonmodifikationen.....	38
3.4 Infektionsversuche .....	39

---

3.4.1 Gewinnung der Konidiensuspension zur Inokulation .....	39
3.4.2 Inokulation von Mais .....	39
3.4.3 Inokulation von Zwiebel .....	40
3.4.4 Inokulation von Polyesterfolie .....	40
3.5 Wachstumsversuche .....	41
3.5.1 Axenisches Wachstum auf verschiedenen Medien .....	41
3.5.2 Kultivierung von Myzel auf Nylonmembranen .....	41
3.5.3 Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot .....	41
3.5.4 Sporulationsversuche .....	42
3.5.5 Benetzbarkeitsassay .....	43
3.6 RNA-Seq .....	43
3.6.1 RNA-Seq infizierter Maisblätter .....	43
3.6.2 RNA-Seq vegetativer Hyphen .....	44
3.6.3 Genauswahl für RT-qPCR .....	44
3.7 Dokumentation .....	44
3.7.1 Lichtmikroskopie .....	44
3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie .....	44
3.7.3 Atomkraftmikroskopie zur Untersuchung der Appressorienoberfläche .....	45
3.7.4 Fotografie .....	45
3.8 Bioinformatische Analyse .....	45
3.8.1 Datenbankrecherche .....	45
3.8.2 Phylogenetische Analyse .....	46
3.9 Statistik .....	47
4 Ergebnisse .....	48
4.1 Das <i>single-copy</i> -Gen <i>KMT5</i> kodiert für eine Histon-H4K20-Methyltransferase .....	48
4.2 Deletion von <i>KMT5</i> .....	50
4.3 Genetische Komplementation von $\Delta kmt5$ .....	51
4.4 Kmt5 ist im Zellkern lokalisiert .....	53
4.5 Kmt5 ist für die Mono-, Di- und Trimethylierung von H4K20 unabdingbar .....	53
4.6 Die Bedeutung von <i>KMT5</i> für die vegetative Entwicklung und die Bildung asexueller Sporen .....	55
4.6.1 Axenisches Wachstum und Sporulationsversuche .....	55
4.6.2 <i>KMT5</i> beeinflusst die Expression zahlreicher Gene in vegetativen Hyphen .....	57
4.6.3 <i>KMT5</i> kontrolliert Zellwandintegrität und Sekundärmetabolismus vegetativer Hyphen .....	59
4.7 Die Bedeutung von <i>KMT5</i> für die pathogene Entwicklung .....	63
4.7.1 <i>KMT5</i> ist essentiell für die Virulenz .....	63
4.7.2 <i>KMT5</i> beeinflusst die Funktionalität von Appressorien .....	65
4.7.3 <i>KMT5</i> spielt keine Schlüsselrolle bei der Genexpression in Infektionshyphen .....	69

---

4.7.4 $\Delta kmt5$ eliciert keine verstärkte pflanzliche Abwehr .....	71
5 Diskussion .....	76
5.1 Das <i>single-copy</i> -Gen <i>KMT5</i> ist unabdingbar für die H4K20-Methylierung in <i>C. graminicola</i> .....	77
5.2 Die Bedeutung von <i>KMT5</i> für die vegetative Entwicklung .....	79
5.2.1 Der Einfluss von <i>KMT5</i> auf die Sporulation und die Bildung des Luftmyzels.....	79
5.2.2 Der Einfluss von <i>KMT5</i> auf die Zellwandintegrität .....	82
5.2.3 Der Einfluss von <i>KMT5</i> auf den Sekundärmetabolismus .....	83
5.3 Die Bedeutung von <i>KMT5</i> für die Maisinfektion.....	85
Zusammenfassung.....	87
Literaturverzeichnis .....	89
Anhang .....	101
I Relative <i>KMT5</i> -Transkriptmengen in vegetativen Hyphen und Infektionsstrukturen .....	101
II Kernlokalisation von <i>Kmt5</i> .....	102
III Kandidatengene für RT-qPCR .....	103
IV Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot .....	104
V Analyse der Benetzbarkeit von Myzel und Sporen .....	105
VI Die jeweils 250 Gene mit am meisten erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in $\Delta kmt5$ .....	106
VII CAZymes-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen $\Delta kmt5$ -Hyphen	119
VIII Sekundärmetabolit-Cluster-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen <i>Δkmt5</i> -Hyphen .....	124
IX Mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen von $\Delta kmt5$ .....	127
X Wachstumsversuche auf PDA mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und Bengalrosa .....	128
XI Mittels RT-qPCR bestimmte relative Transkriptmengen in vegetativen Hyphen .....	129
XII Abwehrgene in <i>Zea mays</i> .....	130
Danksagung.....	131
Eidesstattliche Erklärung .....	132
Wissenschaftlicher Werdegang .....	133

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	einfach destilliertes Wasser
aa	Aminosäuren	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	zweifach destilliertes (entionisiertes) Wasser
ABI	Applied Biosystems		
<i>ad</i>	lateinisch: zu	H3K9me3	Trimethylierung des Lysins an Position 9 des Histons H3
AFM	Atomkraftmikroskopie		
amp	Ampicillin	H4K20me1, H4K20me2, H4K20me3	Mono-, Di- bzw. Trimethylierung des Lysins an Position 20 des Histons H4
AP	Alkalische Phosphatase		
Ap	Appressorium		
AS	Aminosäure		
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	<i>hph</i>	Hygromycin-Phosphotransferase- Gen aus <i>Escherichia coli</i> <i>hours post inoculation</i>
bp	Basenpaare	<i>hpi</i>	Hygromycin
bspw.	beispielsweise	Hyg	Hygromycin
bzw.	beziehungsweise	Kb	Kilobasenpaar(e)
C	Cytosin	kDa	Kilodalton
°C	Grad Celsius	Kmt	Lysin-Methyltransferase
ca.	circa	<i>KMT5</i>	Gen, das für die Histon-H4K20- Methyltransferase kodiert
CAZymes	<i>carbohydrate-active enzymes</i>		
CgM2	<i>Colletotrichum graminicola</i> Isolat M2	LB	<i>Lysogeny Broth</i>
CM	<i>Complete Medium</i>	µl	Mikroliter
cm	Zentimeter	M	Molarität
CPM	<i>counts per million</i>	Mb	Megabasenpaare
CSPD	Dinatriummethoxy Spirotriccyclo- phenylphosphat	Mg	Milligramm
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>	min	Minute
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	ml	Milliliter
ddNTP	Didesoxynukleotid	µE	Mikroeinsteinstärke
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat	µl	Mikroliter
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat	µM	Mikromolar
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat	mM	Millimolar
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat	MPa	Megapascal
DIG	Digoxigenin	NA	<i>not applicable</i>
DIG-dUTP	DIG-desoxyUridintriphosphat	<i>natI</i>	Nourseothricin-Acetyltransferase- Gen aus <i>Streptomyces noursei</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NLS	<i>nuclear localization signal</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat	nt	Nukleotid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	<i>oliC</i>	Oligomycin-Resistenzgen
dGTP	DesoxyGuanosintriphosphat	OMA	<i>Oat Meal Agar</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	ORF	<i>open reading frame</i>
dpi	<i>days post inoculation</i>	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
ekt	Isolat mit ektopischer Integration der Resistenzkassette	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , lateinisch: und andere	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
Fab	<i>Fragment antigen-binding</i>	PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
FC	<i>fold change</i>	PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>	PEG	Polyethylenglycol
for, fw, F	<i>forward</i>	PEG 6000	Polyethylenglycol mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 6000 g mol <sup>-1</sup>
G	Guanin		
g	Gramm		
g	Erdbeschleunigung	pg	Pikogramm
gDNA	genomische DNA	P <sub>gpd</sub>	Promotor des Glycerinaldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase-Gens aus <i>Aspergillus nidulans</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol		
µg	Mikrogramm		

pH	lateinisch: <i>potentia hydrogenii</i> , Wasserstoffionenkonzentration	STC	Sorbitol/Tris/Calciumchlorid
PR-Protein	<i>Pathogenesis-related-Protein</i>	T	Thymin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
pUC18	artifizielles Plasmid, hergestellt an der Universität von Californien	T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
qPCR	quantitative PCR	Tris	Tris- (hydroxymethyl)aminomethan
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-PCR</i>	TSS	<i>transformation and storage in the same solution</i>
RT-qPCR	<i>Reverse Transcription- quantitative PCR</i>	T <sub>trpc</sub>	Terminator des Tryptophan- Synthasegens C aus <i>Aspergillus nidulans</i>
rev, Rv, R	<i>reverse</i>	UV	Ultraviolett
RNA	Ribonukleinsäure	V	Volt
RNAi	RNA-Interferenz	v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
RNase	Ribonuklease	WT	Wildtyp
ROS	<i>reactive oxygen species</i>	w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)
rpm	Umdrehungen pro Minute	z.B.	zum Beispiel
RT	Reverse Transkriptase		
s	Sekunde		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
SET	Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax		

### Anmerkungen zur Schreibweise

Fremdsprachige Fachbegriffe wurden, wenn es möglich oder sinnvoll erschien ins Deutsche übersetzt. Englische Fachtermini, Anglizismen, Wörter anderer Fremdsprachen sowie Art- und Gattungsnamen wurden kursiv markiert. Genbezeichnungen wurden mit kursiven Großbuchstaben geschrieben (z.B. *KMT5*). Falls aus dem Kontext nicht eindeutig ersichtlich, wurde der abgekürzte Artnamen vorangestellt (z.B. *CgKMT5* für *KMT5* in *Colletotrichum graminicola*). Proteine sind nicht kursiv geschrieben (z.B. *Kmt5* bzw. *CgKmt5*). Mutationen, die zu einem Gendefekt führen, werden durch ein  $\Delta$  und kursive Kleinbuchstaben verdeutlicht (z.B.  $\Delta kmt5$ ). Für aus der Literatur zitierte Gene, Proteine und Mutanten wurde die in der entsprechenden Veröffentlichung bereits vorgegebene Nomenklatur verwendet.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Analyse der Histon-H4K20-Methyltransferasen aus Ascomyceten, Basidiomyceten und einem Zygomyceten.....	49
Abbildung 2: Gen- und Proteinstruktur der Histon-H4K20-Methyltransferasen aus Ascomyceten, Basidiomyceten und einem Zygomyceten.....	50
Abbildung 3: <i>KMT5</i> -Deletion mittels homologer Rekombination und Southern Blot-Analyse.....	51
Abbildung 4: Genetische Komplementation von $\Delta kmt5$ mittels homologer Rekombination und Southern Blot-Analyse .....	52
Abbildung 5: Zellspezifische Lokalisierung von <i>Kmt5</i> .....	54
Abbildung 6: Lokalisierung der H4K20-Methylierung im Zellkern.....	55
Abbildung 7: Axenisches Wachstum und Sporulationsversuche.....	56
Abbildung 8: Mittels RNA-Seq ermittelte veränderte Transkriptmengen verschiedener Genkategorien in vegetativen $\Delta kmt5$ -Hyphen .....	58
Abbildung 9: Einfluss von Calcofluor Weiß und Kongorot auf das vegetative Wachstum.....	60
Abbildung 10: Mittels RT-qPCR bestimmte relative Transkriptmengen von Sekundärmetabolit-Cluster-Genen in vegetativen Hyphen.....	61
Abbildung 11: Mittels RT-qPCR bestimmte relative Transkriptmengen von <i>HFB1</i> und <i>EGL1</i> in vegetativen Hyphen .....	62
Abbildung 12: Virulenztest, mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen und Zytorrhizie	64
Abbildung 13: Atomkraftmikroskopische Untersuchungen der Appressorien-Zellwand.....	67
Abbildung 14: RT-qPCR in Appressorien 24 hpi auf Maisblättern.....	68
Abbildung 15: RNA-Seq-Untersuchungen von Sporen.....	70
Abbildung 16: RNA-Seq-Untersuchungen von nekrotrophen Hyphen .....	71
Abbildung 17: Untersuchung der Papillenbildung und der Transkriptmengen pflanzlicher Abwehrgene .....	73
Abbildung 18: Relative <i>KMT5</i> -Transkriptmengen in vegetativen Hyphen und Infektionsstrukturen .	101
Abbildung 19: Kernlokalisierung von <i>Kmt5</i> .....	102
Abbildung 20: Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot.....	104
Abbildung 21: Wasser- und Detergenstropfen zur Analyse der Benetzbarkeit auf der Oberfläche von Myzel.....	105
Abbildung 22: Mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen von $\Delta kmt5$ .....	127
Abbildung 23: Einfluss von ROS auf das vegetative Wachstum.....	128
Abbildung 24: Mittels RT-qPCR bestimmte relative <i>HFB2</i> - und <i>HFB3</i> -Transkriptmengen in vegetativen Hyphen .....	129

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer zur Generierung des Deletionskonstrukts .....	18
Tabelle 2: Primer zur Generierung des Komplementationskonstrukts .....	18
Tabelle 3: Primer zur Generierung des eGFP-Reporterkonstrukts .....	19
Tabelle 4: Primer für qPCR-Analysen .....	19
Tabelle 5: RT-qPCR-Primer der Referenzgene in <i>C. graminicola</i> .....	19
Tabelle 6: RT-qPCR-Primer der Referenzgene in <i>Zea mays</i> .....	19
Tabelle 7: RT-qPCR-Primer von <i>KMT5</i> .....	19
Tabelle 8: RT-qPCR-Primer von CAZymes-Genen .....	20
Tabelle 9: RT-qPCR-Primer von Hydrophobin-Genen .....	20
Tabelle 10: RT-qPCR-Primer von Sekundärmetabolismus-Genen.....	20
Tabelle 11: RT-qPCR-Primer von Transkriptionsfaktor-Genen.....	21
Tabelle 12: RT-qPCR-Primer von Abwehrgenen in <i>Zea mays</i> 36 hpi.....	21
Tabelle 13: RT-qPCR-Primer putativer Abwehrgene in <i>Zea mays</i> 72 hpi.....	22
Tabelle 14: Primer zur Sequenzierung von PCR-Produkten in dem Vektor pJET1.2/ <i>blunt</i> .....	22
Tabelle 15: Primer zur Generierung der Southern Blot-Sonden.....	22
Tabelle 16: Standard-PCR ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ ).....	25
Tabelle 17: Standard-PCR-Bedingungen.....	26
Tabelle 18: PCR-Ansatz zur Amplifikation des Selektionsmarkers ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ ).....	27
Tabelle 19: PCR-Ansatz zur Amplifikation der 5'-und 3'-Flanke des Zielgens ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ ) .....	27
Tabelle 20: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Selektionsmarkers .....	28
Tabelle 21: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der 5'-Flanke und 3'-Flanke des Zielgens.....	28
Tabelle 22: PCR-Ansatz der Fusion von 5'-Flanke des Zielgens, Resistenzkassette und 3'-Flanke des Zielgens ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ ).....	29
Tabelle 23: PCR-Bedingungen der Fusions-PCR .....	29
Tabelle 24: PCR-Ansatz der <i>nested</i> PCR ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ ) .....	29
Tabelle 25: PCR-Bedingungen der <i>nested</i> PCR.....	29
Tabelle 26: PCR-Ansatz der RT-qPCR ( $\Sigma = 20 \mu\text{l}$ ) .....	31
Tabelle 27: PCR-Bedingungen der RT-qPCR .....	32
Tabelle 28: Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion ( $\Sigma = 10 \mu\text{l}$ ) .....	32
Tabelle 29: PCR-Bedingungen der Sequenzierreaktion.....	33
Tabelle 30: Reaktionsansatz Ligation ( $\Sigma = 10 \mu\text{l}$ ).....	34
Tabelle 31: Reaktionsansatz Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide ( $\Sigma = 10 \mu\text{l}$ ) .....	35
Tabelle 32: NCBI-Zugangsnummern der phylogenetisch analysierten Proteine .....	46
Tabelle 33: Kandidatengene für RT-qPCR .....	103



Tabelle 34: Die jeweils 250 Gene mit am meisten erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in <i>Δkmt5</i> .....	106
Tabelle 35: CAZymes-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen <i>Δkmt5</i> -Hyphen .....	119
Tabelle 36: Sekundärmetabolit-Cluster-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen <i>Δkmt5</i> -Hyphen .....	124
Tabelle 37: Abwehrgene in <i>Zea mays</i> .....	130
Tabelle 38: Mittels RNA-Seq in nekrotrophen Hyphen identifizierte putative Abwehrgene aus Mais.....	130

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung von *Colletotrichum graminicola*

Als Erreger der Anthraknose-Blattflecken und Stengelfäule an Mais (*Zea mays*) ist der weltweit verbreitete Ascomycet *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson (Teleomorph: *Glomerella graminicola* [Politis]) von enormer ökonomischer Bedeutung (Wilson, 1914; Bergstrom und Nicholson, 1999; Dean *et al.*, 2012). In den frühen 1970er Jahren verursachten schwerwiegende Epidemien in Nordamerika weitreichende und enorme ökonomische Verluste (Bergstrom und Nicholson, 1999; Warren *et al.*, 1973; Werner *et al.*, 2007). Zur Vermeidung weiterer Epidemien werden weniger anfällige Maissorten angepflanzt (Mims und Vaillancourt, 2002). Da sich das Pathogen dank eines kurzen Reproduktionszyklus und der Produktion großer Sporenmengen bei günstigen Witterungsbedingungen effizient in landwirtschaftlichen Intensivkulturen ausbreiten kann (Bergstrom und Nicholson 1999), verursacht *C. graminicola* allein in den USA jährlich Verluste in Höhe von ungefähr 1 Milliarde Dollar (O'Connell *et al.*, 2012).

Bei der Erforschung phytopathogener Pilze und der Aufklärung von Pilz-Pflanze-Interaktionen erfüllt *C. graminicola* als ausgezeichneter Modellorganismus eine wichtige Rolle (Perfect *et al.*, 1999; Krijger *et al.*, 2008). *C. graminicola* kann axenisch auf verschiedenen Nährmedien kultiviert werden. Bereits nach drei bis vier Tagen wird ein vollständiger Entwicklungszyklus abgeschlossen, wobei große Mengen Sporen produziert werden. Als erster Vertreter der Gattung *Colletotrichum* wurde der *C. graminicola*-Stamm M1.001 (CgM2) vollständig sequenziert (Crouch und Beim, 2009). Die Genomsequenz ist in der Datenbank des NCBI verfügbar. Das Genom von 57,4 Mb verteilt sich auf 13 Chromosomen (O'Connell *et al.*, 2012). Aufgrund der geringen Genomgröße und des haploiden Chromosomensatzes während eines Großteils des Lebenszyklus (Chen *et al.*, 2002) sind Deletionsmutagenesen zur Untersuchung der Funktionen von Genen und deren Produkten einfach durchzuführen. Durch die Anwendung von Transformationstechniken in Kombination mit verschiedenen Selektionsmarkern lassen sich molekularbiologische Untersuchungen an dem Modellorganismus durchführen (Panaccione *et al.*, 1988; Epstein *et al.*, 1998; Thon *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2002; Flowers und Vaillancourt, 2005; Münch *et al.*, 2011; Punt *et al.*, 1987; Namiki *et al.*, 2001; Malonek *et al.*, 2004). Da *C. graminicola* ein hemibiotropher Pilz ist, vereint er die charakteristischen Eigenschaften von biotrophen und nekrotrophen Pathogenen einschließlich ihrer unterschiedlichen Ernährungs- und Lebensweisen (Bergstrom und Nicholson, 1999; Krijger *et al.*, 2008). Somit tragen die erhaltenen Resultate und Kenntnisse aus Studien an *C. graminicola* auch zu einem Verständnis der Bedeutung und Lebensweise anderer phytopathogener Pilze bei.

## 1.2 Die Biologie und der Lebenszyklus von *C. graminicola*

Als hemibiotropher Pilz zeigt *C. graminicola* einen biphasischen Infektionsverlauf (Perfect *et al.*, 1999). Bevor sich nach einer biotrophen Phase intrazellulär wachsende Hyphen etablieren, wird das Wirtsgewebe durch eine Vielzahl an zellwandabbauenden Enzymen abgetötet (Bergstrom und Nicholson, 1999).

*C. graminicola* überwintert als Saprophyt auf abgestorbenen Pflanzenresten, die auf der Erdoberfläche zurückbleiben und bildet dort im nächsten Frühjahr das primäre Inokulum (Bergstrom und Nicholson, 1999; Crouch und Beirn, 2009). Die Bildung zahlreicher sichelförmiger asexueller Sporen (auch Konidien genannt) erfolgt in speziellen Strukturen, den Acervuli. Bevor die Primärinfektion der Wirtspflanze erfolgen kann, gelangen die Sporen mit Hilfe von spritzendem Regenwasser auf die Blattoberfläche (Bergstrom und Nicholson, 1999).

Auf der hydrophoben Blattoberfläche der Wirtspflanze, bildet die Konidie durch die Sekretion eines klebrigen Gemisches aus Mannose und Glykoproteinen ein Haftkissen, das die Konidie an der Blattoberfläche befestigt (Mercure *et al.*, 1994; Nicholson und Epstein, 1991; Sugui *et al.*, 1998). Etwa sechs Stunden nach der Anheftung keimt die Konidie, welche zuvor durch ein Septum quergeteilt wird (Mercure *et al.*, 1994; Politis und Wheeler, 1973). Ausgehend von einer der beiden Zellen wird ein Keimschlauch gebildet (Politis und Wheeler, 1973). Die Differenzierung hochspezialisierter Appressorien ist für die Infektion von intaktem Wirtsgewebe essentiell (Mendgen und Deising, 1993; Mendgen *et al.*, 1996; Deising *et al.*, 2000). Durch die Synthese und Akkumulation von Osmolyten wird ein beträchtlicher Turgordruck in dem Appressorium generiert. Bechinger *et al.* (1999) zeigten mittels Messungen mit optischen Wellenleitern, dass ein einzelnes Appressorium von *C. graminicola* eine Kraft von durchschnittlich 17 Mikronewtons erzeugen konnte. Das entspricht in etwa einem Turgordruck von 53 bar (5,3 MPa), der ausreichend physikalische Energie bietet, um die Kutikula und die Zellwand der Wirtszelle mechanisch zu durchdringen (De Jong *et al.*, 1997; Bechinger *et al.*, 1999; Deising *et al.*, 2000). Die Penetration der Wirtszelle erfolgt etwa 24 bis 36 Stunden nachdem die Konidie auf die Blattoberfläche gelangte (Mims und Vaillancourt, 2002). Möglicherweise spielen auch zellwandabbauende Enzyme für die Penetration eine Rolle (Deising *et al.*, 2000). In die Appressorien-Zellwand wird nah an der Plasmamembran Melanin eingelagert (Bailey *et al.*, 1992). Lediglich eine dünne, kreisrunde Zone am Boden des Appressoriums, die appressoriale Pore, durch die eine Penetrationshyphe austritt, ist nicht melanisiert (Bergstrom und Nicholson, 1999). Zum Zeitpunkt der Appressorien-Melanisierung sind die Transkriptmengen der Gene, welche in die Biosynthese von Melanin involviert sind, wie z.B. das Poliketidsynthase-Gen *PKSI* und das Scytalondehydratase-Gen, signifikant erhöht (Sugui und Deising, 2002; Ludwig *et al.*, 2014).

In der anschließenden Besiedlungsphase ernährt sich *C. graminicola* biotroph (Bergstrom und Nicholson, 1999). Die primären biotrophen Hyphen wachsen zwischen den Zellwänden und Plasmamembranen (Bergstrom und Nicholson, 1999; Wharton und Julian, 1996; Wharton *et al.*, 2001; Mims und Vaillancourt, 2002). Nach der Penetration spielen die Polysaccharide der pilzlichen Zellwand

eine bedeutende Rolle bei der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze (Boller und Felix, 2009). Diese Zellwandbestandteile sind in einem großen Umfang in Pilzen konserviert und dienen als sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), welche durch PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt werden und die sofortige angeborene Immunantwort einleiten (Nürnberger *et al.*, 2004; Altenbach und Robatzek, 2007; Zipfel, 2009; Boller und Felix, 2009; Ryan und Farmer, 1991). Um die pflanzliche Abwehrreaktion, welche durch PAMPs ausgelöst wird, zu umgehen, sind die Expression des  $\beta$ -1,3-Glucan-Synthase-Gens *GLS1* sowie der  $\beta$ -1,3- und  $\beta$ -1,6-Glucan-Anteil der biotrophen Hyphen drastisch reduziert (Oliveira-Garcia und Deising, 2013; Oliveira-Garcia und Deising, 2016a). Zum Schutz vor der Erkennung durch die Wirtspflanze nutzt *C. graminicola* eine Maskierungsstrategie. Um die Menge an Elicitor-aktiven Chitinfragmenten zu verringern, werden Chitin-Deacetylasen sekretiert, welche die Chitinpolymere der pilzlichen Zellwand zu Chitosan deacetylieren. Somit werden der Abbau des Chitins durch pflanzliche Chitinasen und die Freisetzung abwehrauslösender Chitinfragmente verhindert (El Gueddari *et al.*, 2002).

Die Sekretion von Effektor-Proteinen, welche die Wirtszelle beeinflussen, stellt eine weitere Möglichkeit dar, die pflanzliche Abwehr zu manipulieren und die Infektion zu erleichtern. In *C. graminicola* wurden 177 Gene identifiziert, welche für putative sekretierte Effektoren kodieren (O'Connell *et al.*, 2012). Die Effektor-Gene werden verstärkt zu den spezifischen biotrophen und nekrotrophen Stadien der Pathogenese exprimiert (Krijger *et al.*, 2008).

Nach einer kurzen biotrophen Phase von 24 bis 36 Stunden, beginnt die nekrotrophe Phase mit der Ausbildung von sekundären Hyphen (Bergstrom und Nicholson, 1999). Die sekundären Hyphen durchdringen die Plasmamembranen und Zellwände benachbarter Zellen (Bergstrom und Nicholson 1999). In dieser Phase kommt es zum Abbau der Pflanzenzellwände sowie zur Nekrotisierung des Gewebes. *C. graminicola* besitzt ein breites Spektrum an Genen, welche für CAZymes (*carbohydrate-active enzymes*) kodieren (O'Connell *et al.*, 2012). CAZymes können die pflanzliche Zellwand abbauen und die pilzliche Zellwand modifizieren (O'Connell *et al.*, 2012). Während der nekrotrophen Phase ist eine hohe Anzahl der Gene, welche für CAZymes kodieren, aktiviert (O'Connell *et al.*, 2012). Auf dem nekrotischen Blattgewebe werden Acervuli gebildet, welche als Ursprung für ein sekundäres Inokulum dienen (Horbach *et al.*, 2011; Crouch und Beirn, 2009). Aus den Acervuli ragen melanisierte, sterile, nadelförmige Setae heraus. Die Funktion dieser für *Colletotrichum* charakteristischen Strukturen ist noch unbekannt (Crouch und Beirn, 2009).

### 1.3 Chromatinstruktur und epigenetische Modifikationen

Die Epigenetik ist die Studie von Veränderungen der Genfunktion, die mitotisch und/oder meiotisch vererbbar und auf keine Änderung in der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Wu und Morris, 2001; Dupont *et al.*, 2009). Der Wissenschaftsbereich der Epigenetik hat sich in der modernen Biologie zu einem der innovativsten Forschungsgebiete entwickelt (Allis und Jenuwein, 2016). Im Verlauf der letzten 20 Jahre führten Entdeckungen von Chromatin-modifizierenden Enzymen und Mechanismen, die das Chromatin als Reaktion auf physiologische oder pathologische Signale hin ändern, zu einem besseren Verständnis der epigenetischen Regulation der Genexpression und des *Silencings* (Allis und Jenuwein, 2016).

In eukaryotischen Zellkernen ist die DNA in Form von Chromatin organisiert (Nishioka *et al.*, 2002). Ein Hauptbestandteil und eine sich wiederholende Einheit von Chromatin sind Nukleosome (Dillon *et al.*, 2005; Zhang und Reinberg, 2001). Ein Nukleosom besteht aus 146 bp doppelsträngiger DNA, die als Superhelix um ein Octamer gewunden ist. Das Octamer wird von je zwei *core* Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gebildet (Luger *et al.*, 1997; Zhang und Reinberg, 2001). Mit Hilfe des *linker* Histons H1 werden je sechs Nukleosome pro Windung in eine Solenoid-Struktur verpackt (Zhang und Reinberg, 2001). Die positiv geladenen N-terminalen Amino-Schwänze der Histone, bestehend aus 20-35 hauptsächlich basischen Aminosäuren, werden an der Außenseite der Nukleosome exponiert (Dillon *et al.*, 2005; Zhang und Reinberg, 2001). Die Histon-Schwänze sind für die Nukleosom-Nukleosom-Interaktion essentiell (Luger *et al.*, 1997; Zhang und Reinberg, 2001). An ihnen können durch spezifische Enzyme Modifikationen wie Acetylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, ADP-Ribosylierung und Methylierung vorgenommen werden (Dillon *et al.*, 2005; Sakaguchi *et al.*, 2008; Jenuwein und Allis, 2001; Lachner *et al.*, 2003). Auch die DNA-Methylierung bzw. das Zusammenspiel von DNA-Methylierung und Histon-Modifikation sind in die Heterochromatin-Entstehung und das Gen-*Silencing* involviert (Honda und Selker, 2008). Diese reversiblen Modifikationen gewährleisten die Zugänglichkeit der DNA durch eine dynamische Regulation des Verpackungsgrads zwischen transkriptionsaktiven und -inaktiven Chromatinzuständen (Turner, 2007; Allis und Jenuwein, 2016). Das genreiche Euchromatin liegt dekodensiert vor und ist transkriptionsaktiv (Lachner und Jenuwein, 2002; Grewal und Jia, 2007). Das transkriptionsinaktive Heterochromatin liegt kondensiert vor und wird in zwei Typen unterteilt (Brown, 1966; Lachner und Jenuwein, 2002; Kourmouli *et al.*, 2004). Das konstitutive Heterochromatin ist an den Centromeren und Telomeren in jeder Zelle zu finden und besteht aus repetitiven Sequenzen (Kourmouli *et al.*, 2004; Saksouk *et al.*, 2015). Fakultatives Heterochromatin spielt eine Rolle bei der Regulation von Genen (Saksouk *et al.*, 2015). Es kann in einem zeitlichen und räumlichen Zusammenhang euchromatische Eigenschaften erlangen und in einer dekodensierten Form vorliegen und dadurch transkriptionell aktiv werden oder eine kompakte, kondensierte Form annehmen (Trojer und Reinberg, 2007).

### 1.3.1 Histon-Lysin-Methylierung

Histone können nur an ihren Arginin- und Lysin-Resten methyliert werden (Zhang und Reinberg, 2001). Arginin (Symbol: R) kann entweder mono- oder dimethyliert werden. Lysin (Symbol: K) kann mono-, di-, oder trimethyliert werden (Zhang und Reinberg, 2001). Eine der wichtigsten Regulationsmechanismen der Genexpression und Heterochromatin-Funktion ist die Histon-Lysin-Methylierung (Sanders *et al.*, 2004). Bereits 1964 beschrieb Murray Histone als Substrat für Methylierung (Murray, 1964). Methylierungen wurden bei einer großen Anzahl von Lysin-Resten in verschiedenen Histonen gefunden (Dillon *et al.*, 2005). Die methylierten Lysin-Reste der Histone H3 und H4 wurden am häufigsten untersucht (Bannister und Kouzarides, 2005). Es sind insgesamt fünf methylierbare Lysin-Reste in den N-terminalen Enden der Histone H3 und H4 bekannt (Lachner *et al.*, 2003). In Histon H3 können K4, K9, K27 und K36, in Histon H4 kann der Lysin-Rest K20 methyliert werden (Lachner *et al.*, 2003). Auch K79 in der *Histone fold*-Domäne des Histons H3 kann methyliert werden (Lachner *et al.*, 2003). Während es sich bei H3K4, H3K36 und H3K79 um transkriptionsaktivierende Markierungen handelt, sind H3K9, H3K27 und H4K20 repressive Markierungen (Allis *et al.*, 2007a).

Die Methylierung spezifischer Lysin-Reste der Histon-Schwänze wird durch Lysin-Methyltransferasen, welche entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) Kmt genannt werden, katalysiert. Alle bekannten Kmt, bis auf eine Ausnahme, Dot1 (entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) Kmt4), verfügen über eine SET-Domäne (Cheng, 2014; Dillon *et al.*, 2005). Tschiersch *et al.* (1994) entdeckten eine circa 130 aa umfassende konservierte Sequenz in den drei *Drosophila melanogaster*-Proteinen Su(var)3-9 (*suppressor of variegation*), E(z) (*enhancer of zeste*) und Trx (*trithorax*), welche sie SET-Domäne nannten. SET-Domäne-Proteine wurden in allen bisher untersuchten eukaryotischen Organismen gefunden (Dillon *et al.*, 2005). Neben den sieben Hauptfamilien der SET-Domäne-Proteine Suv39-, Set1-, Set2-, E(z)-, Riz-, Smyd- und die Suv4-20-Familie, gibt es auch Set7/9- und Set8 (auch PrSet7)-Familien (Dillon *et al.*, 2005). Die SET-Domäne katalysiert den Transfer einer Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin auf die Aminogruppe eines Lysin-Restes in einem Histon oder auch anderem Protein (Dillon *et al.*, 2005). Es entsteht ein methylierter Lysin-Rest und das Produkt S-Adenosyl-L-Homocystein (Dillon *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Die Bedeutung von Histon-H4K20-Methyltransferasen

Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass die Histon-H4K20-Methylierung eine Rolle für biologische Prozesse, wie DNA-Reparatur, DNA-Replikation und Chromatin-Verdichtung, welche die Genom-Integrität gewährleisten, spielen (Jorgensen *et al.*, 2013). Das Lysin 20 des Histons H4 (H4K20) stellt eine Besonderheit dar, da die vorherigen Lysin-Reste in dem Histon H4-Schwanz acetyliert und nicht methyliert werden (Allis *et al.*, 2007a; Sakaguchi *et al.*, 2008). Die H4K20-Methylierung wird spezifisch durch die Histon-H4K20-Methyltransferase Kmt5, einem SET9-Domäne-Protein der Suv4-20-Familie katalysiert (Schotta *et al.*, 2008; Veerappan *et al.*, 2008) und ist von

*Schizosaccharomyces pombe* bis zum Mensch evolutionär konserviert (Lachner *et al.*, 2004). Besonders ausführlich wurden die Histon-H4K20-Methyltransferasen in den Modellorganismen *Mus musculus*, *D. melanogaster* und *S. pombe* untersucht (Schotta *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2008; Sanders *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009).

Wie alle anderen Lysin-Reste kann H4K20 mono-, di- und trimethyliert (me1, me2, und me3) werden (Yang *et al.*, 2008; Sakaguchi *et al.*, 2008). Die verschiedenen Methylierungsstufen haben unterschiedliche Verteilungen und Funktionen (Schotta *et al.*, 2008). So scheint bspw. H4K20me1 in *D. melanogaster* essentiell für eine normale Entwicklung während des Zellzyklus zu sein (Sakaguchi und Steward, 2007; Sakaguchi *et al.*, 2008). H4K20me2 hingegen dient möglicherweise der Rekrutierung von DNA-Reparatur-Faktoren (Botuyan *et al.*, 2006). Das im perizentrischen Heterochromatin lokalisierte H4K20me3 spielt in Wirbeltieren eine fundamentale Rolle im Gen-Silencing (Schotta *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2008). H4K20me1 kann durch eine Demethylase oder alternativ durch die Umsetzung in die höheren Methylierungs-Stadien entfernt werden (Jorgensen *et al.*, 2013). Ob H4K20me2 und H4K20me3 aktiv entfernt werden können, ist derzeit unklar (Jorgensen *et al.*, 2013).

In Säugerzellen wird H4K20me1 durch PrSet7 (entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) Kmt5A) induziert und reprimiert die Transkriptionsaktivität (Schotta *et al.*, 2008). Der Verlust von H4K20me1 in Mäuse-Embryonen ist letal (Huen *et al.*, 2008; Schotta *et al.*, 2008). Die Funktion von H4K20me2 in Säugetieren ist unbekannt (Schotta *et al.*, 2008). Jedoch konnte mittels Röntgenkristallographie und Kernresonanzspektroskopie nachgewiesen werden, dass der DNA-Reparatur-Faktor 53BP1 aus Säugetieren mit Hilfe spezifischer Domänen H4K20me2 bindet und somit einen Komplex mit Histon H4 bilden kann (Botuyan *et al.*, 2006). H4K20me3 ist an perizentrisches Heterochromatin gebunden und wird durch Suv4-20h1 (entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) Kmt5B) und Suv4-20h2 (entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) Kmt5C), welche ebenfalls im perizentrischen Heterochromatin lokalisiert sind, katalysiert (Schotta *et al.*, 2008). Voraussetzung für die Etablierung von H4K20me3 ist die Anwesenheit von H3K9me3 (Schotta *et al.*, 2004). Ein Grund für die H3K9me3-Abhängigkeit könnte eine *in vitro* nachgewiesene Interaktion des Heterochromatin Proteins 1 HP1, welches H3K9me3 bindet, mit Kmt5C sein (Schotta *et al.*, 2004). Suv4-20h-Doppel-Knockout-Mäuse, welchen sowohl Kmt5B als auch Kmt5C fehlten, waren perinatal letal. Ihr Chromatin verlor H4K20me3 und H4K20me2. Stattdessen konnte H4K20me1 genomweit nachgewiesen werden (Schotta *et al.*, 2008).

In Säugetieren wurde ein Zusammenspiel von verschiedenen Methylierungs- und Acetylierungs-Systemen beschrieben (Schotta *et al.*, 2004; Sarg *et al.*, 2004). Ausgehend von Untersuchungen in einem *in vitro* Assay zum Nachweis einer Interaktion des Chromodomänen-Proteins HP1 (Heterochromatin Protein 1) und Kmt5C beschreiben Schotta *et al.* (2004) ein Modell, bei dem die Etablierung von H3K9me3 im perizentrischen Heterochromatin durch die Histon-Methyltransferase Suv39h (entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) Kmt1A) eine Voraussetzung für H4K20me3

ist. HP1 bindet an H3K9me3 und rekrutiert Kmt5B und Kmt5C, sodass infolge dessen H4K20 trimethyliert wird. Sarg *et al.* (2004) beschreiben eine Wechselwirkung von H4K20-Methylierung und -Acetylierung in *M. musculus*, welche die Grundlage für ein Modell zur Umwandlung des transkriptionell aktiven Euchromatins in kondensiertes inaktives Heterochromatin bildet. Während Histon-Hypoacetylierung und -Methylierung eine Rolle im Gen-Silencing spielen, ist Histon-Acetylierung für die Transkription von Genen wesentlich (Sarg *et al.*, 2004). Eine H4K20-Hypotrimethylierung korreliert mit einer H4-Hyperacetylierung. Eine H4K20-Hypertrimethylierung hingegen korreliert mit einer H4-Hypoacetylierung. Das bedeutet, dass H4K20me3 nur mit nicht acetyliertem Histon H4 hochkompatibel und im geringeren Grad mit monoacetyliertem Histon H4 kompatibel ist. Demnach schließen sich die Histon-H4-Hyperacetylierung und H4K20me3 gegenseitig aus. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse, schlugen Sarg *et al.* (2004) folgendes Modell vor: Zunächst wird hyperacetyliertes H4 durch spezifische HDACs deacetyliert. Anschließend wird H4K20 durch eine Histon-H4K20-Methyltransferase trimethyliert. Im folgenden Schritt bindet HP1 H4K20me3, was zu einer Chromatin-Verdichtung führt.

Wie auch in Vertebraten wird H4K20me1 in *D. melanogaster* durch Kmt5A etabliert und ist ebenfalls essentiell (Sakaguchi *et al.*, 2008). H4K20me1 dient als Voraussetzung für die Etablierung von H4K20me2 und H4K20me3. Der Verlust von Kmt5A resultiert in der Abwesenheit aller drei H4K20-Methylierungsstufen (Karachentsev *et al.*, 2005) und führt bei *D. melanogaster*-Larven in dem Übergangsstadium zur Puppe zum Tod (Sakaguchi *et al.*, 2008). Auch in *D. melanogaster* spielen H4K20me2 und H4K20me3 eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Gen-Regulation (Sakaguchi *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Säugetieren, wurde in *D. melanogaster* nur Kmt5B als einzelnes Protein identifiziert, welches die Di- und Trimethylierung von H4K20 katalysiert (Schotta *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2008). Larven, denen das Enzym Kmt5B fehlt, sind lebensfähig und entwickeln signifikant erhöhtes H4K20me1, wobei H4K20me2 und H4K20me3 stark reduziert oder abwesend sind (Sakaguchi *et al.*, 2008). Dies lässt vermuten, dass H4K20me1 als Substrat für das Enzym Kmt5 dient (Sakaguchi *et al.*, 2008).

In der einzelligen Spaltheife *S. pombe* werden die Mono-, Di- und Trimethylierung von H4K20 durch das SET9-Domäne-Protein SpKmt5 katalysiert (Sanders *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). Der Verlust von SpKmt5 beeinträchtigte weder die Genexpression noch die Heterochromatin-Funktion. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die H4K20-Modifikation durch die Rekrutierung des Checkpoint Protein Crb2 zur Aktivierung des DNA-damage-checkpoints eine essentielle Rolle bei DNA-Reparatur-Mechanismen einnimmt (Sanders *et al.*, 2004). Eine Interaktion von SpKmt5 mit dem PWWP (Prolin-Tryptophan-Tryptophan-Prolin)-Domäne-Protein 1 Pdp1 ist die Voraussetzung für die Etablierung der drei Methylierungsstufen und die Aktivierung eines DNA-Damage-Checkpoints (Wang *et al.*, 2009). Die N-terminale PWWP-Domäne des Pdp1 erkennt H4K20me1 und bindet somit SpKmt5 an das Chromatin (Wang *et al.*, 2009). Eine Mutation der PWWP-Domäne führte zum Verlust von H4K20me3, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Funktion des DNA-Damage-Checkpoints (Wang *et al.*,



2009). Das deutet darauf hin, dass Pdp1 an H4K20me1 bindet, um die Konzentration von SpKmt5 am Chromatin zu erhöhen, sodass H4K20me3 etabliert werden kann (Wang *et al.*, 2009). In den Pdp1-Mutanten ist SpKmt5 allein ausreichend für die Etablierung von H4K20me1 und H4K20me2 (Wang *et al.*, 2009). Das Ergebnis, dass H4K20me3 für die *DNA-damage-checkpoint* Funktion entbehrlich ist, stimmt mit den Erkenntnissen struktureller Studien überein, die zeigten, dass der DNA-Reparatur-Faktor Crb2 aus *S. pombe*, wie dessen Ortholog 53BP1 aus Säugern, spezifische Domänen besitzt, um mit H4K20me2 zu interagieren (Botuyan *et al.*, 2006).

In filamentösen Ascomyceten wurde die Rolle der Histon-H4K20-Methyltransferase bisher nur in dem Reisbrand-Erreger *Magnaporthe oryzae* untersucht. Die Deletion des Gens *KMT5* führte zur signifikanten Reduzierung des H4K20me3 (Pham *et al.*, 2015). Die Deletionsmutante  $\Delta kmt5$ , welcher die Histon-H4K20-Methyltransferase fehlte, zeigte keine Unterschiede zum Wildtyp (Pham *et al.*, 2015).

## 2 Ziele der Arbeit

Der hemibiotrophe Pilz *C. graminicola* durchläuft während seiner vegetativen und pathogenen Entwicklung des Infektionsprozesses bei der Bildung vegetativer Hyphen sowie beim Übergang vom oberflächlichen Wachstum auf der Pflanze über das biotrophe Wachstum zum nekrotrophen Stadium tiefgreifende Veränderungen der Zellmorphologie und Ernährungsweise. Während des Infektionsprozesses werden 2619 Gene, was 22 % aller proteinkodierenden Gene entspricht, in *C. graminicola* differentiell exprimiert (O'Connell *et al.*, 2012). Über die Regulationsmechanismen der transkriptionellen Dynamik, welche die stadienspezifische Genexpression koordinieren, ist wenig bekannt. Die Histon-Lysin-Methylierung, welche zu den wichtigsten epigenetischen Regulationsmechanismen zählt (Sanders *et al.*, 2004), wurde in Pilzen ausführlich in den Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *S. pombe* sowie in dem filamentösen Ascomyceten *Neurospora crassa* untersucht (Freitag, 2017). Die Beeinflussung der Virulenz durch KMTs, welche die Methylierung der Lysine K4, K9, K27 und K36 des Histons H3 katalysieren, konnte für die phytopathogenen Pilze *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Leptosphaeria maculans* gezeigt werden (Freitag, 2017). Trotz der essentiellen Bedeutung für die regulatorischen Prozesse wie Gen-Silencing, Entwicklung und Aufrechterhaltung von Heterochromatin und DNA-Reparatur, ist über den Einfluss der H4K20-Methylierung auf die Kontrolle der Genexpression und die Differenzierung von pathogenen und vegetativen Pilzstrukturen bisher wenig bekannt.

Um einen wertvollen Beitrag zur Aufklärung der Bedeutung der Histon-H4K20-Methylierung in phytopathogenen Pilzen zu leisten, ist das Ziel der vorliegenden Dissertation die funktionelle Charakterisierung des SET9-Domäne-Proteins Kmt5 der SUV4-20-Familie in dem Modellorganismus *C. graminicola*. Durch die gezielte Deletion des *KMT5*-Gens sollen Mutanten generiert werden, die phänotypisch im Vergleich zum Wildtyp-Isolat charakterisiert werden. Zur Lokalisation des Gen-Produkts Kmt5 wird ein GFP-Reporterkonstrukt generiert. Um die Funktion von Kmt5 für die Histon-H4K20-Methylierung zu beurteilen, werden die Methylierungsstufen mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die genomweite RNA-Seq in vegetativen Hyphen, Sporen und nekrotrophen Hyphen soll Informationen über die Regulation der Transkriptmengen nach dem Verlust von *KMT5* liefern. Wachstumsversuche auf unterschiedlichen Medien und mikroskopische Studien zur Untersuchung der Morphologie vegetativer Hyphen geben Aufschluss über die Bedeutung von Kmt5 für die vegetative Entwicklung von *C. graminicola*. Infektionsversuche mit Maisblattsegmenten lassen Rückschlüsse auf die Rolle von Kmt5 bei der Virulenz und der Differenzierung von Infektionsstrukturen ziehen. Dabei wird auch die pflanzliche Abwehr untersucht.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Biologisches Material

#### 3.1.1 Bakterien

*Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) wurde auf LB-Agar (Bertani 1951) in Petrischalen bei 37 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden erstellt, indem LB-Flüssigmedium mit Einzelkolonien angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) kultiviert wurde. Zur selektiven Kultivierung transformierter Bakterien, welche eine Ampicillin-Resistenzkassette besaßen, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugesetzt.

#### 3.1.2 Pilze

Das Wildtyp-Isolat CgM2 von *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson (teleomorph *Glomerella graminicola* [Politis]), welches von Ralph L. Nicholson (Purdue University, Indiana, USA) bereitgestellt wurde, diente als Referenzobjekt und wurde als Ausgangsmaterial für die Transformation zur Erstellung von Deletionsmutanten verwendet. Die Kultivierung erfolgte auf Haferflockenagar (OMA, modifiziert nach Koneman *et al.*, 1997) in Petrischalen bei 23 °C im Kultivierungsschrank KBW720 (Binder, Tuttlingen). Flüssigkulturen wurden zur Gewinnung von Myzel in Kompletmedium angesetzt und sieben Tage bei 23 °C und 110 rpm auf einem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) kultiviert. Zur Gewinnung ovaler Konidien wurde Hefeextrakt-Saccharose-Flüssigmedium inokuliert und drei Tage bei 23 °C und 110 rpm auf einem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Zur Erstellung von Dauerkulturen wurden Konidien in sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> von einer OMA-Kultur aufgenommen und in 25 % (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert.

#### 3.1.3 Pflanzen

##### 3.1.3.1 *Zea mays*

Die Interaktion von *C. graminicola* mit Mais sowie die Vergleiche aller in dieser Arbeit erzeugten Pilz-Transformanten hinsichtlich ihrer Pathogenität bzw. Virulenz wurden im Rahmen dieser Dissertation mit der Sorte Mikado (KWS, Einbeck) untersucht. Pro Topf (9 cm x 9 cm x 9,5 cm; Lamprecht-Verpackungen GmbH, Göttingen) wurden drei Pflanzen in Einheitserde ED73 (Einheitserde Werkverband e.V., Sinntal-Altengronau) mit 4 l Vermakulit (≥ 4 mm) pro 70 l Erde angezogen. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte für 14 Tage im Tag-Nacht-Verhältnis von 16 zu 8 Stunden. Am Tag herrschte eine Temperatur von 25 °C, in der Nacht herrschte eine Temperatur von 20 °C. Die Belichtung von 90000 Lumen erfolgte mittels des Flächenstrahlers SILL 9004737199 mit dem Leuchtmittel PLANTASTAR 600 W, E40 (Osram GmbH, München).

### 3.1.3.2 *Allium cepa*

Weitere Infektionsversuche wurden mit Küchenzwiebeln (*Allium cepa* cv. Grano) durchgeführt, welche als unbehandeltes Bioprodukt im Lebensmitteleinzelhandel erworben wurden.

## 3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Enzyme sowie Reagenzien für molekularbiologische Experimente von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen. Zentrifugenröhrchen und Petrischalen lieferte Greiner Bio-One (Frickenhausen).

### 3.2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen

#### 3.2.1.1 Nährmedien

##### **LB-Flüssigmedium, *Lysogeny Broth*** (Bertani 1951)

10 g Bacto-Trypton

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Zur selektiven Kultivierung transformierter Bakterien mit einer Ampicillin-Resistenzkassette wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin zugefügt.

##### **LB-Agar**

LB-Flüssigmedium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar.

##### **OMA, *Oat Meal Agar*, *Haferflockenagar*** (modifiziert nach Koneman *et al.*, 1997)

25 g zermahlene Haferflocken

7,5 g Agar-Agar

*ad* 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Dieses Gemisch wurde für 45 min autoklaviert.

##### **Komplettmedium, *Complete Medium*, CM** (modifiziert nach Leach *et al.*, 1982)

10 ml Stammlösung A

10 ml Stammlösung B

10 g Glucose

1 g Hefeextrakt

1 g Caseinhydrolysat (Difco Laboratories, Augsburg)

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Hefeextrakt-Saccharose-Medium**

Flüssigmedium mit 0,5 M Saccharose und 0,1 % (w/v) Hefeextrakt.

**PDB, *Potato Dextrose Broth***

24 g PDB (Difco Laboratories, Augsburg)

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**PDA, *Potato Dextrose Agar*, Kartoffeldextrose-Agar**

24 g PDB (Difco Laboratories, Augsburg)

15 g Agar-Agar

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Regenerationsmedium, Top-Agar**

342,3 g Saccharose

1 g Hefeextrakt

1 g Casein

6 g Agar-Agar

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Selektionsmedium**

Regenerationsmedium mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar und 400 µg/ml eines geeigneten Fungizids (Hygromycin B, Nourseothricin oder Genitacin)

**Minimalmedium** (modifiziert nach Tonukari *et al.*, 2000)

10 ml Stammlösung A

10 ml Stammlösung B

0,01 g Hefeextrakt

15 g Agarose

20 g Glucose

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Wasseragar**

15 g Agar-Agar

*ad* 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

Sämtliche Medien wurden, falls nicht anders angegeben, für 25 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Die Zugabe von hitzesensitiven Bestandteilen wie Antibiotika, Fungiziden, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Bengalrosa, Calcofluor Weiß und Kongorot erfolgte nach dem Abkühlen auf ca. 60 °C.

### **3.2.1.2 Puffer**

#### **DNA-Extraktionspuffer I**

7 M Harnstoff

2 % (w/v) SDS

5 mM EDTA

pH 8,0

#### **DNA-Extraktionspuffer II**

150 mM NaCl

5 mM EDTA

50 mM Tris-HCl

pH 8,0

#### **1x TAE-Puffer**

20 mM Natriumacetat

1 mM EDTA

40 mM Tris-HCl

pH 8,3

#### **1x Natriumborat-Puffer**

20 mM Natriumborat

pH 6,7

#### **6x DNA-Ladepuffer**

30 % (v/v) Glycerin

60 % (v/v) 10x TAE-Puffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

#### **20x SSC-Transferpuffer**

3 M NaCl

0,3 M Natriumacetat

pH 7,5

**Maleinsäurepuffer**

150 mM NaCl

100 mM Maleinsäure

pH 7,5

**2x Waschpuffer**

2x SSC

0,1 % (w/v) SDS

**0,5x Waschpuffer**

0,5x SSC

0,1 % (w/v) SDS

**0,25x Waschpuffer**

0,25x SSC

0,1 % (w/v) SDS

**Hybridisierungspuffer**

5x SSC

0,1 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin

0,02 % (w/v) SDS

1 % (w/v) Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim)

**Waschpuffer M**

150 mM NaCl

0,3 % (v/v) Tween20

100 mM Maleinsäure

pH 7,5

**Blocking-Puffer**

1 % (w/v) Blocking-Reagenz in Maleinsäurepuffer

**Detektionspuffer**

100 mM NaCl

100 mM Tris-HCl

pH 9,5

**STC-Puffer**

1 M Sorbitol

50 mM CaCl<sub>2</sub>

50 mM Tris-HCl

pH 8,0

Der STC-Puffer wurde für 25 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

**PEG-Puffer**

40 % (w/v) Polyethylenglykol 4000

600 mM KCl

50 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Tris-HCl

pH 8,0

**Puffer I (Plasmidpräparation)**

50 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

pH 8,0

**Puffer II (Plasmidpräparation)**

0,2 M NaOH

1 % (w/v) SDS

**Puffer III (Plasmidpräparation)**

2,55 M Kac

pH 4,8

**Lysis-Puffer**

200 mM Tris-HCl

200 mM NaCl

1 % (w/v) N-Lauroylsacrosin

50 mM EDTA

pH 8,0



**1x PBS**

140 mM NaCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O

2,7 mM KCl

1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,3

**McIlvaine-Puffer**

0,1 M Citronensäure

0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

pH 7

**Mounting Medium**

McIlvaine-Puffer:Glycerol für Fluoreszenzmikroskopie im Verhältnis 2:1

**3.2.1.3 Lösungen**

**Stammlösung A**

50 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

*ad* 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Stammlösung B**

10 g KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>

12,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O

2,7 g NaCl

*ad* 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**Depurinierungslösung**

0,25 M HCl

**Denaturierungslösung**

0,4 M NaOH

**TSS-Lösung**

LB-Medium mit

10% (w/v) PEG 6000

5% (v/v) DMSO

50 mM MgSO<sub>4</sub>

pH 6,5

Die TSS-Lösung wurde für 25 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

**Protoplastierungslösung**

400 mg *Trichoderma harzianum* Lysing Enzyme (Sigma-Aldrich, München)

20 µl β-Mercaptoethanol

ad 20 ml 0,7 M NaCl

**DAPI-Lösung**

0,01 mg gelöst in 1 ml Mounting Medium

**Blocking-Lösung**

3 % (w/v) BSA gelöst in 1 x PBS

**Entfärbelösung**

Ethanol:Essigsäure im Verhältnis 3:1

**Methylenblau-Färbelösung**

0,02 g Methylenblau

ad 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

**3.2.2 Vektoren****pAN7-1** (Punt *et al.*, 1987)

Der Vektor pAN7-1 trägt das Hygromycin-Phosphotransferase-Gen *hph* aus *E. coli* unter Kontrolle des *Aspergillus nidulans* *gpd*-Promoters, terminiert durch den *A. nidulans* *trpC*-Terminator. In *E. coli* vermittelt er Resistenz gegenüber Ampicillin und in Pilzen gegenüber Hygromycin B.

**pDONR221** (Invitrogen, Karlsruhe)

Dieser Vektor enthält *attP*-Sequenzen. Basierend auf dem Prinzip der Rekombination des λ-Phagen werden im Gateway-System *attB* flankierte PCR-Produkte kloniert. Er vermittelt Kanamycinresistenz in *E. coli*.

**pNR1** (Malonek *et al.*, 2004)

Dieses *pBluescript*-II-KS-Derivat mit dem *nat1*-Gen aus *Streptomyces noursei* unter Kontrolle des *A. nidulans oliC*-Promotors, terminiert durch den *Botrytis cinerea tub1*-Terminator vermittelt Resistenz gegenüber Ampicillin in *E. coli* und Nourseothricin in Pilzen.

**pJET1.2/blunt** (Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

In diesen linearisierten Vektor können *blunt-end* PCR-Produkte ligiert und in *E. coli* amplifiziert werden. Es entstehen nur rekombinante Klone, die das Insert tragen, da durch den rezirkularisierten Vektor eine letale Restriktionsendonuklease exprimiert wird und somit die Bakterien ohne Insert absterben. pJET1.2/blunt vermittelt eine Ampicillinresistenz.

**3.2.3 Oligonukleotide**

Synthetische Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) und Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen.

**Tabelle 1: Primer zur Generierung des Deletionskonstrukts**

Primer	Sequenz (5' → 3')
GLRG_11114-LF.F1	GGCTGACGTACATCTGATTG
GLRG_11114-LF.F2	CGCCTTCCAAACTTGGTCTG
GLRG_11114-LF-uni.R1	GTGCAACTGACAGTCGTACACTTGAGGTGGTTCTTGTAGC
GLRG_11114-RF.F1	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGGAGAAGAGGCGTACGAAGC
GLRG_11114-RF.R1	GGTCTTGGTGGTTATGACTG
GLRG_11114-RF.R2	GAGGGCAAGGTGAGGCAGAC
Uni-nours.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACATTCGGGCCGGATTG
Uni-nours.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACACCGATGAAACGATTCTCAAC

**Tabelle 2: Primer zur Generierung des Komplementationskonstrukts**

Primer	Sequenz (5' → 3')
GLRG_11114-LF.F1	GGCTGACGTACATCTGATTG
GLRG_11114-LF.F2	CGCCTTCCAAACTTGGTCTG
SUV4-20-T-TrpC.R1	GACATGGAGCTATTAAATCATCACGGACATGCCACTTTG
T-trpc.F1	TGATTTAATAGCTCCATGTCAACAAG
Uni-nours-T-trpc.R1	GTGCAACTGACAGTCGTACACGATGAATGTGTGTCCTGTAGGC
Uni-hyg.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACTGACCGGTGCCTGGATCTTC
Uni-hyg.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACGGTTCGGCATCTACTCTATTCC
GLRG_11114-RF.F1	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTGGAGAAGAGGCGTACGAAGC
GLRG_11114-RF.R1	GGTCTTGGTGGTTATGACTG
GLRG_11114-RF.R2	GAGGGCAAGGTGAGGCAGAC

**Tabelle 3: Primer zur Generierung des eGFP-Reporterkonstrukts**

Primer	Sequenz (5' → 3')
Pgpd.F1	TACCGAGCTCCCAAATCTGTC
Pgpd-SUV4-20.R1	GCAGCGCAGGAGGGCGGCATGGTGATGTCTGCTCAAGCGG
GLRG_11114.F1	ATGCCGCCCTCCTGCG
LF-GLRG_11114-mCherry-Gly.R1	TCCACCCCCGCCTCCCCCGGACATGCCACTTTG
Gly-mCherry.F1	GGGGGAGGCGGGGGTGGAGTGAGCAAGGGCGAGGAG
T-nours-R	ACTATAGGGCGAATTGGG
Pgpd.F2	TGACCGGTGCCTGGATCTTC
T-nours_R1_nested	AGCGGCACTGGCAATAAC

**Tabelle 4: Primer für qPCR-Analysen**

Primer	Sequenz (5' → 3')
ITS2-qPCR-Fw	CGTCGTAGGCCCTTAAAGGTAG
ITS2-qPCR-Rv	TTACGGCAAGAGTCCCTC
M13_For	GTAAAACGACGGCCAGTGC
M13_Rev	CACAGGAAACAGCTATGACC

**Tabelle 5: RT-qPCR-Primer der Referenzgene in *C. graminicola***

Primer	Sequenz (5' → 3')
CgH3-qRT.F1	CGAGATCCGTCGCTACCAGA
CgH3-qRT.R1	GGAGGTTCGACTTGAAGTCCT
CgACT-qRT.F1	TCCTACGAGCTTCCTGACGG
CgACT-qRT.R1	CCGCTCTCAAGACCAAGGAC

**Tabelle 6: RT-qPCR-Primer der Referenzgene in *Zea mays***

Primer	Sequenz (5' → 3')
ZmH2B F1	GGCCATGTCCATCATGGAC
ZmH2B R1	GTGATGGTGGGCTTCTTG
ZmTubG_F1	GATGGTGTCGTCCAACCTTAC
ZmTubG_R1	CCTATTAAGAGCCGTATTGTCAAG

**Tabelle 7: RT-qPCR-Primer von *KMT5***

Primer	Sequenz (5' → 3')
Suv4-20.F1	AGTGGTCAAGAGGAGTATCG
Suv4-20.R1	CGTGACAAGCAAGTCGAAAG

**Tabelle 8: RT-qPCR-Primer von CAZymes-Genen**

Primer	Sequenz (5' → 3')
EGL1.F1	CAGGTGGCAAGCCTGTATTC
EGL1.R1	CACCAGACATTGCGCTGTCC
PGN1.F1	TTGACATGACGGGCCTCAAG
PGN1.R1	TGGTGCCGTCAATGATGATG

**Tabelle 9: RT-qPCR-Primer von Hydrophobin-Genen**

Primer	Sequenz (5' → 3')
HFB1.F1	CACCGAGACCGAAACTTCTG
HFB1.R1	ACAGATCTTGCCGAAGTTGG
HFB2.F1	ACATCCTCGGCATCGCGAAC
HFB2.R1	GGGTGTTGCAGAGAATACCC
HFB3.F1	CCTAGAGGACGTGCCTATTG
HFB3.R1	GGCCTCGAAGCCAGCAATAG

**Tabelle 10: RT-qPCR-Primer von Sekundärmetabolismus-Genen**

Primer	Sequenz (5' → 3')
PKS32.F1	CGCCCACTTTATCAAAGACG
PKS32.R1	GGGCTACCTCTGAGGTCTTC
PKS1 for	TCAATCTGAGCCCTGGACAC
PKS1 rev	GTCCTGAGATCGCCAAGCTG
HYP14.F1	CAAACCTGGACTGCCAAGAG
HYP14.R1	TGGGAAGGCCTCGGCTGATG
MCO18.F1	GGGCCCAAGAGATGCCATTC
MCO18.R1	CGTCGTCCGTTGCTCTATGC
MCO19.F1	TCAACACCGCTTACGAGGAG
MCO19.R1	GCATGGCGGTATTCTTGTC
BLM1.F1	CAGCTCCAGGGTACGAACAC
BLM1.R1	AGCACATGCGTGATGATGAG
MPR1.F1	CGCCATCATCTTCCTGAACG
MPR1.R1	CCGATGACCCAGTACATCAG
PCD34.F1	TAAGAAGGCGGGTGATCAGC
PCD34.R1	CAAGAACCACGGCATGATTG
OXR42.F1	AGAGGTGCTGCCGTTCTTTG
OXR42.R1	TCGACGGGCTATTTGCTTTC

**Tabelle 11: RT-qPCR-Primer von Transkriptionsfaktor-Genen**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
XPP1.F1	CAATCCCCTCCTAACTACC
XPP1.R1	GGGCGGTGTCATCCATAAAG
VOS1.F1	CAACCAACGCAAAGGTAGCC
VOS1.R1	CATAGAAGCTGCGGTCAAAG
VEL1.F1	AACACCAGCCTGATCATCAC
VEL1.R1	CGGTTGGTAATGCTGATACG

**Tabelle 12: RT-qPCR-Primer von Abwehrgenen in *Zea mays* 36 hpi**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
HSP82.F1	TGCTCTCCCTCATCATCAAC
HSP82.R1	CGAAGCGGATCTTGTCAAGC
CAP.F1	GTCCATTCGGCACGATGAAG
CAP.R1	GGTAGAAATCGGCGTAAGAG
RPL35A.F1	GTTAGCAAACCCGTATACCG
RPL35A.R1	CTCTGCTCGATGTACCATCC
MLO.F1	CTCTCATCGTGCTCCTCTCG
MLO.R1	AGAGCGGCTTCTGGTTCTTC
PO.F1	GGCTCATCCGCATCTTCTTC
PO.R1	GCTCGCTGTTGGAACCAGAC
CMB.F1	TCTTAGCGGACAAGCCTCAG
CMB.R1	TTCATGGTGCTGCGTCCAAG
RP1-4.F1	CCAAAGATTTCGCACCTTCG
RP1-4.R1	CTGGAGCTTCAAGAGGAGAG

**Tabelle 13: RT-qPCR-Primer putativer Abwehrgene in *Zea mays* 72 hpi**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
ZmTerpS07_RT-Fw	TGTACAATGCGGCTCACATGGC
ZmTerpS07_RT-Rv	CTGACCTCGCCTTTGCTGATG
ZmTerpS02_RT-Fw	GTCCGTACTTTGGCGGCATCATC
ZmTerpS02_RT-Rv	TCCGTTTGACGTCCGTCGTCAG
ZmGermLP1_RT-Fw	AGGCCATCGCCATGACGCTCTTC
ZmGermLP1_RT-Rv	TGGGTGCGAAGTTTGCCTTGATG
ZmCelluSynt8/631_RT-Fw	CATCCTGCTGGCCTCGATCTTCTC
ZmCelluSynt8/631_RT-Rv	CAGTTGCAGTCCAGGCCACACTC
ZmChit633_RT-Fw	GTCACCGGCTCCTTCTTCAAC
ZmChit633_RT-Rv	GCTCCGGGTGTAGAAGTTCTTG
ZmGlucP15_RT-F2	GCACGGTCACCACCTTCTAC
ZmGlucP15_RT-R2	TGCACCCGTCGTCAGAAACC
Zm2G065617_RT-F1	ACGACCTGCCGACGTTCTTC
Zm2G065617_RT-R1	CGGCTCCAAGTCGTAGAATG
Zm2G093346_RT-F1	CCTGGACTACGAACCCTTTG
Zm2G093346_RT-R1	TTCAGCTGCCAGTAATGAC
ZmPerox365_RT-Fw	GAGATGACGACCGCTCCCATTG
ZmPerox365_RT-Rv	AGCGGGCTTATGTTGCCCATC

**Tabelle 14: Primer zur Sequenzierung von PCR-Produkten in dem Vektor pJET1.2/blunt**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
pJET1.2 For	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGCC
pJET1.2 Rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

**Tabelle 15: Primer zur Generierung der Southern Blot-Sonden**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
Nours_F02	CTCTTGACGACACGGCTTAC
Nours_R02	GGCAGGGCATGCTCATGTAG
Sonde-GLRG_11114-Nours.F	TCAGTGGACACCTGCGATAC
Sonde-GLRG_11114-Nours.R	CCTTGCTACGGGCCAATTGC

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

##### 3.3.1.1 Maxi-Präparation genomischer DNA

Zur Isolation genomischer DNA von *C. graminicola* nach Döbbeling *et al.* (1997) wurde das Myzel einer sieben Tage alten CM-Flüssigkultur auf saugfähigem Papier getrocknet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das homogene, noch gefrorene Pulver wurde in vorgekühlte 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in 800 µl DNA-Extraktionspuffer I aufgenommen. Nach der Zugabe von 800 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und sorgfältigem Mischen erfolgte die Trennung in Phasen durch Zentrifugation (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, Schwerte) für 10 min bei 14000 x g und 4 °C. Die obere, wässrige Phase, wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurde analog dem vorhergehenden Schritt extrahiert und zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA aus der wässrigen Phase mit 800 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 6800 x g, 4 °C) sedimentiert. Das Pellet wurde in 700 µl DNA-Extraktionspuffer II aufgenommen. Nach Zugabe von 3,5 µl RNase A (10 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die RNA 30 min bei 37 °C abgebaut. Durch die Zugabe von 17,5 µl 20 % SDS (w/v) wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde 60 min bei 60 °C ein Proteinase K-Verdau mit 10 µl einer Proteinase K-Lösung (20 mg/ml, Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Es erfolgte erneut eine Extraktion mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol und Chloroform:Isoamylalkohol mit darauffolgender Isopropanolfällung. Nach Zentrifugation (10 min, 14500 x g, 4 °C) wurde das DNA-Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (10 min, 14500 x g, 4 °C). Das Pellet wurde getrocknet, in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

##### 3.3.1.2 Mini-Präparation genomischer DNA

Die Gewinnung von genomischer DNA aus infizierten Maisblättern, welche für qPCR-Analysen verwendet werden sollte, wurde nach Weihmann *et al.* (2016) und mit Hilfe des peqGOLD Plant DNA Mini Kit (PEQLAB, Erlangen) durchgeführt. Am vierten Tag nach der Inokulation wurden die Inokulationspunkte auf dem Blatt mit Hilfe eines Korkbohrers (Durchmesser: 9 mm) ausgestanzt. Jeweils acht Blattscheiben wurden in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit zwei 3 mm Stahlkugeln (HECHT Kugellager GmbH & Co. KG, Winnenden) vereint und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die DNA-Isolierung wurde bis auf folgende Abweichungen nach Herstellerangaben durchgeführt: Das Gewebe wurde für 30 s bei 30 Hertz in der Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan) aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Zugabe des im Kit enthaltenen Resuspensionspuffers. Um mögliche schwankende Verluste bei den folgenden Aufreinigungsschritten zu bestimmen und einen probenspezifischen Korrekturfaktor zu ermitteln, wurden 10 µl des externen Standards (pUC18-



Plasmid, Thermo Scientific, Schwerte) in einer Konzentration von 5 pg/μl hinzugefügt. Die DNA wurde in 100 μl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Die DNA-Konzentration wurde mit dem Nano-Drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) bestimmt.

### 3.3.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

*E. coli*, welche das gewünschte Plasmid trugen, wurden in Kulturröhrchen mit 2 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Kulturschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgte mittels GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben. Die Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.3.1.4 Präparation von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung spezifischer Fragmente aus Reaktionsgemischen wurden die Reaktionsansätze in TAE-Gelen mit einer Agarosekonzentration von 0,5 % (w/v) bei einer konstanten Spannung von 60 V aufgetrennt. Nach einer zweistündigen Inkubation der Agarosegele in 0,02%iger (w/v) Methylenblau-Färbelösung, wurde die gewünschte Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend wurde mittels GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Schwerte) eine Agarosegelreinigung nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 3.3.1.5 Aufreinigung von DNA-Amplifikaten

Mit dem GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Schwerte) wurden Primer, Nukleotide, Salze und die Polymerase aus dem PCR Ansatz entfernt. Die Vorgehensweise entsprach den Herstellerangaben.

### 3.3.1.6 Präparation von RNA

Für RT-qPCR-Experimente wurde RNA aus infizierten Maisblättern und vegetativen Hyphen isoliert. Zur Probenahme von infiziertem Blattmaterial wurden mit Hilfe eines Korkbohrers (Durchmesser: 3 mm) 0, 24, 36 und 72 hpi die Inokulationspunkte auf dem Blatt ausgestanzt. Zur RNA-Isolierung aus vegetativen Hyphen wurde *C. graminicola* auf Nylonmembranen unter Verwendung von PDA (*Potato Dextrose Agar*) kultiviert. Pro Probe wurden 50 Blattscheiben bzw. 800 μg vegetatives Pilzmyzel in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit zwei 3 mm Stahlkugeln (HECHT Kugellager GmbH & Co. KG, Winnenden) zusammengefasst und sofort in flüssigem Stickstoff fixiert. Die Homogenisierung der Proben erfolgte 2 min bei 30 Hertz in der Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan) mit vorgekühlten Probenadaptern. Zu dem so erhaltenen Pulver wurden 450 μl RLT-Puffer (Qiagen, Hilden), welcher mit 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol versetzt wurde, gegeben. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte mittels peqGOLD Plant RNA Kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben. Die RNA wurde in 50 μl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> gelöst. Anschließend wurde eine

Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) durchgeführt. Die RNA-Integrität wurde mittels Agilent 2100 Pico6000 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) nach Herstellerangaben überprüft.

### 3.3.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden TAE- und Natriumborat-Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,7 % (w/v) bzw. 1,5 % (w/v) hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose (Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) in 1x TAE- bzw. Natriumborat-Puffer gegeben, durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in einen Gelträger mit Gelkamm gegossen. In der Elektrophoresekammer (Modell 2, Mechanikwerkstatt Universität Konstanz bzw. Modell HU13, biostep, Jahnsdorf), die mit dem entsprechenden Puffer gefüllt war, wurden die mit 6x DNA-Ladepuffer (30 % (v/v) Glycerin, 60 % (v/v) 10x TAE-Puffer, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) versetzten DNA-Proben in die Geltaschen gefüllt. Als Größenstandard dienten DNA-Fragmente definierter Länge (GeneRuler DNA Ladder Mix und GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Scientific, Schwerte). Bei einer konstanten Spannung von 250-300 V für Natriumborat-Gele und 60-140 V für TAE-Gele wurden die Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Färbung des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1,2 µg/ml). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe des Geldokumentationssystems UVsolo TS (Biometra GmbH, Göttingen) aufgezeichnet.

### 3.3.3 PCR-Anwendungen

#### 3.3.3.1 Standard-PCR

Alle Reaktionen wurden in den Geräten Biometra TProfessional Thermocycler oder Biometra TPersonal Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme und Enzympuffer wurden von Thermo Scientific (Schwerte) bezogen. Ein 50 µl Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 16: Standard-PCR ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ )**

PCR Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
DreamTaq <i>Buffer</i>	10x	5 µl
dNTP Mix	10 mM	2 µl
Primer <i>forward</i>	10 µM	1 µl
Primer <i>reverse</i>	10 µM	1 µl
DreamTaq DNA Polymerase	5 U/µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 50 µl
1-50 ng <i>Template</i> -DNA		

Das Standard-PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

**Tabelle 17: Standard-PCR-Bedingungen**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	95 °C	∞	-
2	Initiale Denaturierung	95 °C	1–3 min	1
3	Denaturierung	95 °C	30 s	
4	<i>Annealing</i>	$T_m - 5 \text{ °C}$	30 s	30
5	Elongation	72 °C	1 min/kb	
6	Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1
7	Pause	16 °C	∞	-

Zur Generierung DIG-markierter DNA-Fragmente für Southern-Hybridisierungen, wurde die Taq DNA Polymerase von New England Biolabs (Ipswich, Vereinigtes Königreich) verwendet. Die Dauer der initialen Denaturierung war abhängig von der Art der verwendeten *Template*-DNA. Als *Annealing*-Temperatur ( $T_m$ ) wurde die niedrigste Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Die Schmelztemperatur für eine PCR mit Taq-Polymerase wurde nach folgender Formel berechnet:  
 $T_m = 69,3 \text{ °C} + (0,41 \times \text{GC-Gehalt in \%}) - (650 / \text{Anzahl der Basen des Primers})$ .

Die Schmelztemperatur für eine PCR mit Phusion-Polymerase wurde mit Hilfe des *T<sub>m</sub> calculators* von Thermo Scientific ([www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/](http://www.thermoscientificbio.com/webtools/tmc/), Stand: 21.05.2018) bestimmt. Die Elongationsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments (Phusion: ~3 min/kb; Dream-Taq: ~1 min/kb). Die effektivsten Bedingungen wurden durch Variation der einzelnen Parameter empirisch ermittelt.

### 3.3.3.2 Double-Joint PCR

Die Methode der *Double-Joint* PCR (DJ PCR) nach Yu *et al.* (2004) diente zur Erzeugung von Transformationskassetten für die Mutagenisierung von *C. graminicola*. Durch mehrere nacheinander durchgeführte PCR-Reaktionen wird ein rekombinantes DNA-Molekül konstruiert, welches sich aus drei DNA-Fragmenten zusammensetzt. Im ersten Schritt der DJ PCR wurden die einzelnen Komponenten des gewünschten Konstrukts durch separate PCRs amplifiziert. Im darauffolgenden Schritt wurden drei Fragmente der ersten PCR ohne die Verwendung von Primern fusioniert. Die Primerfunktion wurde dabei von komplementären Überhängen der Fragmente an den Fusionsstellen übernommen. Das fusionierte PCR-Produkt der zweiten PCR diente als Template in einer dritten PCR. Mit Hilfe von nested Primern, welche von den in der ersten PCR verwendeten Primern um einige Basen nach innen versetzt liegen, wurde ein um wenige Basen verkürztes, innerhalb des Fusionsprodukts liegendes Fragment amplifiziert. Die PCR-Reaktionen zur Generierung der Transformationskonstrukte wurden mit Phusion DNA Polymerase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific,

Schwerte) durchgeführt, welche aufgrund ihrer 3' → 5' Exonukleaseaktivität eine 50-fach geringere Fehlerrate als Taq-Polymerasen aufweist.

### 3.3.3.2.1 Generierung des Deletionskonstrukts

Die Generierung des spezifischen Deletionskonstrukts für die vollständige Deletion von *KMT5* erfolgte mittels DJ PCR. Die Sequenzhomologie der Flanken des Deletionskonstrukts ermöglicht eine basengenaue Integration der Deletionskassette im Ziellocus durch homologes Doppel-*crossover*. Somit wird der ORF (*open reading frame*) des Zielgens vollständig deletiert. Die Primer, welche zur Generierung des Deletionskonstrukts verwendet wurden, sind in Tabelle 1 aufgeführt. Zunächst wurden in separaten PCR-Ansätzen 1117 bp des 5'- und 863 bp des 3'-flankierenden Bereichs des ORFs von *KMT5* von genomischer DNA (gDNA) sowie die Nourseothricin-Resistenzkassette (*oliC*-Promotor und *nat1*, 1473 bp) vom Vektor pNR1 amplifiziert. Ein 50 µl Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 18: PCR-Ansatz zur Amplifikation des Selektionsmarkers ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ )**

PCR Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
Phusion HF <i>Buffer</i>	5x	10 µl
dNTP Mix	10 mM	2 µl
Primer <i>forward</i>	10 µM	2,5 µl
Primer <i>reverse</i>	10 µM	2,5 µl
<i>Template</i> (Plasmid-DNA)	0,1 ng/µl	2 µl
Phusion DNA Polymerase	2 U/µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 50 µl

**Tabelle 19: PCR-Ansatz zur Amplifikation der 5'-und 3'-Flanke des Zielgens ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ )**

PCR Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
Phusion HF <i>Buffer</i>	5x	10 µl
dNTP Mix	10 mM	2 µl
Primer <i>forward</i>	10 µM	2,5 µl
Primer <i>reverse</i>	10 µM	2,5 µl
<i>Template</i> (gDNA)	10 ng/µl	5 µl
Phusion DNA Polymerase	2 U/µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 50 µl

Die PCR-Programme umfassten folgende Schritte:

**Tabelle 20: PCR-Bedingungen zur Amplifikation des Selektionsmarkers**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	98 °C	$\infty$	-
2	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
3	Denaturierung	98 °C	30 s	30
4	<i>Annealing</i>	60 °C	30 s	
5	Elongation	72 °C	30 s	
6	Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1
7	Pause	16 °C	$\infty$	-

**Tabelle 21: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der 5'-Flanke und 3'-Flanke des Zielgens**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	98 °C	$\infty$	-
2	Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	1
3	Denaturierung	98 °C	30 s	30
4	<i>Annealing</i>	60 °C	30 s	
5	Elongation	72 °C	30 s	
6	Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1
7	Pause	16 °C	$\infty$	-

Zur Amplifikation der 5'-Flanke diente GLRG\_11114-LF.F1 als *forward* und GLRG\_11114-LF-uni.R1 als *reverse* Primer. Der 3'-flankierende Bereich von *KMT5* wurde mit GLRG\_11114-RF.F1 und GLRG\_11114-RF.R1 amplifiziert. Die Primer, welche verwendet wurden um das 3'-Ende der 5'-flankierenden Region (GLRG\_11114-LF-uni.R1) und das 5'-Ende der 3'-flankierenden Region des Zielgens (GLRG\_11114-RF.F1) zu amplifizieren, trugen einen Überhang von je 20 Basen, welcher jeweils komplementär zu 5' und 3' des Selektionsmarkers sind. Die Nourseothricin-Resistenzkassette wurde mit den Primern Uni-nours.F1 und Uni-nours.R1 amplifiziert.

Im zweiten Schritt wurden die Produkte der ersten PCR fusioniert. Die 5'-flankierende Region, die Nourseothricin-Resistenzkassette und die 3'-flankierende Region wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3:1 als *Template* verwendet. Dabei wurde die Primerfunktion von den komplementären Überhängen an den Fusionsstellen von 5'-Flanke und Promotor der Resistenzkassette bzw. 3'-Flanke und 3'-Terminus des Markergens übernommen. Reaktionsansatz und PCR-Bedingungen waren wie folgt:

**Tabelle 22: PCR-Ansatz der Fusion von 5'-Flanke des Zielgens, Resistenzkassette und 3'-Flanke des Zielgens ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ )**

PCR Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
Phusion HF <i>Buffer</i>	5x	10 $\mu\text{l}$
dNTP Mix	10 mM	2 $\mu\text{l}$
Phusion DNA Polymerase	2 U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 50 $\mu\text{l}$

5'-Flanke, Resistenzkassette, 3'-Flanke im molaren Verhältnis 1:3:1

**Tabelle 23: PCR-Bedingungen der Fusions-PCR**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	98 °C	$\infty$	-
3	Denaturierung	98 °C	30 s	
4	Annealing	60 °C	30 s	20
5	Elongation	72 °C	1 min	
6	Pause	16 °C	$\infty$	-

Das fusionierte PCR-Produkt der zweiten PCR diene als Template einer dritten PCR, bei welcher mit Hilfe der nested Primer GLRG\_11114-LF.F2 und GLRG\_11114-RF.R2 die Deletionskassette amplifiziert wurde. Reaktionsansatz (50  $\mu\text{l}$ ) und PCR-Bedingungen der *nested* PCR waren wie folgt:

**Tabelle 24: PCR-Ansatz der *nested* PCR ( $\Sigma = 50 \mu\text{l}$ )**

PCR Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
Phusion HF <i>Buffer</i>	5x	10 $\mu\text{l}$
dNTP Mix	10 mM	2 $\mu\text{l}$
Primer <i>forward</i>	10 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{l}$
Primer <i>reverse</i>	10 $\mu\text{M}$	2,5 $\mu\text{l}$
<i>Template</i> (Fusionsfragment)	-	0,25 $\mu\text{l}$
Phusion DNA Polymerase	2 U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 50 $\mu\text{l}$

**Tabelle 25: PCR-Bedingungen der *nested* PCR**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	98 °C	$\infty$	-
2	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
3	Denaturierung	98 °C	30 s	
4	<i>Annealing</i>	67 °C	30 s	30
5	Elongation	72 °C	1 min 30 s	
6	Abschließende Elongation	72 °C	5 min	1
7	Pause	16 °C	$\infty$	-

Die amplifizierten Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, um ihre Qualität zu kontrollieren. Die 3365 bp umfassende *KMT5*-Deletionskassette wurde nach Methylenblau-Färbung des Agarosegels mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Schwerte) isoliert und in pJET1.2/*blunt* kloniert.

### 3.3.3.2 Generierung des Komplementationskonstrukts

Die Generierung des Komplementationskonstrukts für  $\Delta kmt5$  erfolgte mittels DJ PCR. Die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen wurden analog zu den in 3.3.3.2.1 aufgeführten gewählt. Die Primer, welche zur Generierung des Komplementationskonstrukts verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Das Konstrukt besteht aus 1069 bp der Promotorregion von *KMT5*, gefolgt von *KMT5*-ORF, *trpC*-Terminator, HygromycinB-Resistenzkassette (*gpd*-Promotor und *hph*) und der 3'-Flanke von *KMT5*. In einer ersten PCR wurde mit den Primern GLRG\_11114-LF.F1 und SUV4-20-T-TrpC.R1 von gDNA ein 3573 bp langes Fragment amplifiziert, das die 5'-Flanke von *KMT5* sowie die kodierende Region von *KMT5* enthielt. In einer weiteren PCR wurde mit den Primern T-*trpC*.F1 und Uni-nours-T-*trpC*.R1 der 410 bp lange *trpC*-Terminator vom Vektor pAN7-1 amplifiziert. Die HygromycinB-Resistenzkassette (*gpd*-Promotor und *hph*) wurde mit den Primern Uni-hyg.F1 und Uni-hyg.R1 von dem Vektor pAN7-1 amplifiziert. Der 863 bp umfassende 3'-flankierende Bereich des ORFs von *KMT5* wurde mit GLRG\_11114-RF.F1 und GLRG\_11114-RF.R1 von gDNA amplifiziert. Zunächst wurden der *trpC*-Terminator, die HygromycinB-Resistenzkassette und die 3'-Flanke von *KMT5* in einer PCR über komplementäre Überhänge der Fragmente an den Fusionsstellen verbunden. Der Reaktionsansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Methylenblau-Färbung wurde das 3329 bp lange Fusionsprodukt aus dem Agarosegel mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kits (Thermo Scientific, Schwerte) isoliert. In einer weiteren PCR wurden die 5'-Flanke und die kodierende Region von *KMT5* mit dem zuvor aus dem Gel aufgereinigtem Fusionsprodukt über komplementäre Überhänge fusioniert. Mit den *nested* Primern GLRG\_11114-LF.F2 und GLRG\_11114-RF.R2 wurde das 6831 bp lange Komplementationskonstrukt amplifiziert und nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel aufgereinigt.

### 3.3.3.2.3 eGFP-Fusion

Die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen zur Generierung des  $P_{gpd}:KMT5:eGFP$ -Konstrukts wurden analog zu den in 3.3.3.2.1 aufgeführten gewählt. Die Primer, welche zur Generierung des eGFP-Reporterkonstrukts verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Zunächst wurde mittels der Primer P<sub>gpd</sub>.F1 und P<sub>gpd</sub>-SUV4-20.R1 der 1073 bp lange *gpd*-Promotor aus *A. nidulans* von dem Plasmid pAN7-1 amplifiziert. Das 2471 bp umfassende *KMT5* wurde mit Hilfe der Primer GLRG\_11114.F1 und LF-GLRG\_11114-mCherry-Gly.R1 von einem pDONR221-Plasmid, in welches der *KMT5*-ORF kloniert wurde, amplifiziert. Das pJET-Plasmid P<sub>AGS2</sub>:eGFP (Haufe, 2015) diente als Template zur Amplifikation des 3322 bp langen Fragments aus *eGFP*, terminiert durch den *nos*-Terminator mit der

Nourseothricin-Resistenzkassette (*oliC*-Promotor, *nat1* und *tub1*-Terminator) mit den Primern Gly-mCherry.F1 und T-nours-R. Anschließend wurden die Produkte der ersten PCR durch komplementäre Überhänge fusioniert. Der *gpd*-Promotor, *KMT5* und *eGFP* mit der Nourseothricin-Resistenzkassette wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3:1 als Template verwendet. Das fusionierte PCR-Produkt diente als Template in einer weiteren PCR, bei welcher mit Hilfe der *nested* Primer P<sub>gpd</sub>.F2 und T-nours\_R1\_nested die P<sub>gpd</sub>:*KMT5*:*eGFP*-Kassette amplifiziert wurde. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das 6672 bp lange Produkt aus dem Agarosegel aufgereinigt.

### 3.3.3.3 qPCR

Die pilzliche Biomasse in infiziertem Blattgewebe wurde mittels quantitativer PCR (qPCR) nach Weihmann *et al.* (2016) ermittelt. Hierbei wurde der Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) eingesetzt. Die qPCRs erfolgten mit dem MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Die Primer, welche zur Bestimmung der pilzlichen Biomasse eingesetzt wurden, sind in Tabelle 4 aufgeführt.

### 3.3.3.4 RT-qPCR

Mittels RT-qPCR wurde die relative Quantifizierung von Transkriptmengen vorgenommen. Als Template diente Gesamt-RNA von infizierten Maisblättern oder Myzel aus *in vitro*-Kulturen. RT-qPCRs erfolgten unter der Verwendung des Power SYBR® Green RNA-to-CT™ Kits (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) in dem MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, München) mit der Software iQ5-Standardsoftware (Version 2.0, Bio-Rad Laboratories, München).

**Tabelle 26: PCR-Ansatz der RT-qPCR ( $\Sigma = 20 \mu\text{l}$ )**

PCR Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
RT-PCR Mix	2 x	10 $\mu\text{l}$
Primer <i>forward</i>	10 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{l}$
Primer <i>reverse</i>	10 $\mu\text{M}$	0,4 $\mu\text{l}$
RT Enzyme Mix	125 x	0,16 $\mu\text{l}$
<i>Template</i> RNA	25 ng/ $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 20 $\mu\text{l}$



**Tabelle 27: PCR-Bedingungen der RT-qPCR**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Reverse Transkription	48 °C	30	1
2	Inaktivierung RT und Aktivierung Pol	95 °C	10 min	1
3	Denaturierung	95 °C	15 s	
4	Annealing und Elongation	60 °C	1 min	40
5	Pause	10 °C	∞	-

Um sicherzustellen, dass die PCR-Produkte die korrekte Größe aufweisen, wurden die Fragmente in einem 1,5%igem (w/v) Natriumborat-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge erfolgte die Normalisierung zu den Referenzgenen *CgH3* (Histon H3) und *CgACT* (Actin) (Krijger *et al.*, 2008) bzw. *ZmH2B* (Histon 2B) und *ZmTubG* ( $\gamma$ -Tubulin 1) (Behr *et al.*, 2010) nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die für RT-qPCR-Analysen eingesetzten Primer sind in den Tabellen 5 bis 13 aufgeführt.

### 3.3.4 DNA-Sequenzierung zur Identifikation von klonierten PCR-Fragmenten

#### 3.3.4.1 DNA-Sequenzierreaktion und Probenvorbereitung

Die verwendete DNA-Sequenziermethode beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Durch eine Fluoreszenzmarkierung der Didesoxynukleotide (ddNTPs) Didesoxyadenosintriphosphat (ddATP), Didesoxyguanosintriphosphat (ddGTP), Didesoxycytidintriphosphat (ddCTP) und Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP) wird eine Detektion von PCR-Fragmenten, welche zuvor in Vektoren kloniert wurden, ermöglicht. Die vier im Reaktionsmix (Applied Biosystems, Weiterstadt) enthaltenen ddNTPs werden durch die Markierung mit unterschiedlichen Chromophoren identifiziert. Als *Template* für die Sequenzierreaktion diente Plasmid-DNA. Zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten in dem Vektor pJET1.2/*blunt* wurden die Primer pJET1.2 For oder pJET1.2 Rev verwendet (Tabelle 14). Der Sequenzieransatz wurde mit dem BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) hergestellt. Jeder Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

**Tabelle 28: Reaktionsansatz der Sequenzierreaktion ( $\Sigma = 10 \mu\text{l}$ )**

Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
BigDye Reaktionsmix	-	1 $\mu\text{l}$
Sequenzierpuffer	5x	1,8 $\mu\text{l}$
Sequenzierprimer	2 $\mu\text{M}$	1,6 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	-	ad 10 $\mu\text{l}$
500 ng Template		

Das PCR-Programm umfasste folgende Schritte:

**Tabelle 29: PCR-Bedingungen der Sequenzierreaktion**

Schritt	Bezeichnung	Temperatur	Zeit	Zyklen
1	Vorheizen	96 °C	∞	-
2	Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	1
3	Denaturierung	96 °C	10 s	
4	<i>Annealing</i>	50 °C	5 s	35
5	Elongation	60 °C	1 min 40 s	
6	Pause	16 °C	∞	-

Im Anschluss wurden die Ansätze gereinigt. Zu dem Reaktionsansatz wurden 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 5 µl 125 mM EDTA und 60 µl 100 % Ethanol hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 16000 x g und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Fresco 17, Thermo Scientific, Schwerte), das Pellet mit ca. 60 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet getrocknet und bei -20 °C gelagert.

#### 3.3.4.2 DNA-Sequenzierung und Analyse der Daten

Sequenzanalysen wurden mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzauswertung und manuelle Korrektur der Sequenzdaten wurden mit den Programmen Chromas Lite Version 2.01 (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>, Stand 31.10.2015), BioEdit Version 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>, Stand 31.10.2017) und mit der Software Clone Manager 9 Professional Edition (Scientific & Educational Software, Denver, USA) vorgenommen.

#### 3.3.5 Klonierung von PCR-Produkten

##### 3.3.5.1 Gewinnung von DNA-Fragmenten

Zu klonierende *blunt end* PCR-Produkte wurden mittels einer Polymerase mit *Proofreading*-Funktion (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific, Schwerte) amplifiziert. Die generierten DNA-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit Methylenblau gefärbt. Die gewünschte Bande wurde mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die darauffolgende Gelelution der DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Schwerte).

### 3.3.5.2 Ligation in den Klonierungsvektor

Unter Verwendung des CloneJET PCR Cloning Kits (Thermo Scientific, Schwerte) wurden *blunt end* PCR-Produkte in den linearisierten Klonierungsvektor pJET1.2/*blunt* eingebracht. Ein Ligationsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

**Tabelle 30: Reaktionsansatz Ligation ( $\Sigma = 10 \mu\text{l}$ )**

Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
Reaktionspuffer	2x	5 $\mu\text{l}$
pJET1.2/ <i>blunt</i> Cloning Vektor	50 ng/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
T4 DNA Ligase	5 U/ $\mu\text{l}$	0,5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O, Nuklease-frei	-	ad 10 $\mu\text{l}$
Insert-DNA im molaren Verhältnis 3:1		

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt für die *E. coli*-Transformation eingesetzt.

### 3.3.6 Transformationstechniken

#### 3.3.6.1 Transformation von *E. coli*

##### 3.3.6.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung von kompetenten *E. coli*-XL1-Blue-Zellen orientierte sich an der TSS (*transformation and storage in the same solution*) Methode nach Chung *et al.* (1989). 2,5 ml einer Übernachtskultur wurden in 250 ml LB-Medium überführt und bis zu einem OD<sub>600</sub>-Wert von 0,3 bis 0,5 (exponentielle Wachstumsphase) angezogen. Anschließend wurden 100 ml dieser Suspension in sterile Zentrifugenbecher überführt und für 10 min bei 650 x g und 4 °C zentrifugiert (Sorvall RC-6, Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode/Harz). Das Zellpellet wurde in 10 ml eiskalter TSS-Lösung aufgenommen. Die Suspension wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen zu je 100  $\mu\text{l}$  aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

##### 3.3.6.1.2 Transformation und Selektion

Für die Transformation wurde ein 100  $\mu\text{l}$ -Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe des gesamten Ligationsansatzes zu den Zellen wurde die Suspension vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock (Thermo Mix 500, SERVA, Heidelberg) erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und anschließend die Zugabe von 900  $\mu\text{l}$  LB-Medium. Zur Regeneration wurden die Zellen 60 min bei 37 °C und 300 rpm (Thermo Mix 500, SERVA, Heidelberg) inkubiert. Daraufhin wurden die transformierten

Zellen in 900  $\mu\text{l}$ -, 90  $\mu\text{l}$ - und 9  $\mu\text{l}$ -Aliquots auf  $\text{LB}_{\text{amp}}$ -Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert (Kulturschüttler Classic C25, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA). Zur Identifizierung transformierter Zellen enthält der pJET1.2/*blunt*-Vektor das letale Gen *eco47IR*. Somit wird das Wachstum von Bakterien, die keine DNA aufgenommen haben, verhindert. Durch die Ligation eines DNA-Inserts in die *cloning site* wird das Gen unterbrochen. Daher vermehren sich nur Zellen, welche ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben.

### 3.3.6.1.3 Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide

Für die Restriktionsanalyse rekombinanter Plasmide wurden diese zunächst aus *E. coli* extrahiert und anschließend mit Restriktionsendonukleasen behandelt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

**Tabelle 31: Reaktionsansatz Restriktionsverdau rekombinanter Plasmide ( $\Sigma = 10 \mu\text{l}$ )**

Komponenten	Stammkonzentration	Volumen
Reaktionspuffer	10x	1 $\mu\text{l}$
Restriktionsendonukleasen	10 U/ $\mu\text{l}$	0,1 $\mu\text{l}$
Plasmid-DNA	-	1 $\mu\text{l}$
$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$	-	ad 10 $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde bei enzymespezifischen Temperaturen für zwei Stunden inkubiert. Falls notwendig, erfolgte im Anschluss eine Hitzeinaktivierung der Enzyme nach Herstellerangaben.

### 3.3.6.2 Transformation von *C. graminicola*

Das angewandte Verfahren orientierte sich an Epstein *et al.* (1998), wurde aber durch Werner *et al.* (2007) modifiziert.

#### 3.3.6.2.1 Sporengewinnung

Für die Anzucht einer Flüssigkultur wurden Sporen einer 14 Tage alten Kultur auf Haferflockenagar mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  unter sterilen Bedingungen ab gespült. Nach dem Animpfen von 100 ml Hefeextrakt-Saccharose-Flüssigmedium mit  $10^6$  Sporen, wurde die Kultur drei Tage bei Raumtemperatur und 110 rpm auf dem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) inkubiert. Die Flüssigkultur wurde durch autoklaviertes Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA) filtriert. Anschließend wurde das Filtrat 10 min bei 4 °C und 2500 rpm (Sorvall RC-6, Kendro Laboratory Products GmbH, Osterode/Harz) zentrifugiert, wodurch die darin enthaltenen ovalen Konidien sedimentiert wurden.

### **3.3.6.2.2 Protoplastierung ovaler Konidien**

Die gewonnenen ovalen Konidien wurden in 20 ml Protoplastierungslösung gegeben und für vier Stunden bei 30 °C und 60 rpm im Inkubationsschüttler (Classic C25, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der Protoplastierung wurden die Protoplasten durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 1200 rpm und 4 °C sedimentiert und mit 10 ml STC-Puffer gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Protoplasten in 1 ml STC-Puffer resuspendiert, in 100 µl Aliquots in 15 ml Greiner-Röhrchen aufgeteilt und auf Eis gelagert.

### **3.3.6.2.3 Transformation und Selektion**

Nach Zugabe von 1,5-5 µg des zu transformierenden DNA-Konstrukts zu je 100 µl Protoplasten-Suspension, wurden die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert. Parallel wurden zwei Ansätze mitgeführt, denen kein DNA-Konstrukt zugefügt wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 1 ml PEG-Puffer und eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zu jedem Aliquot wurden 3 ml 45 °C warmer Top-Agar gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Ansätze in mit Selektionsmedium gefüllte Petrischalen gegossen. Als Negativkontrolle wurde ein Aliquot, welchem keine DNA zugefügt wurde, auf eine Selektionsplatte gegeben. Als Lebendkontrolle wurde ein weiteres Aliquot, welchem keine DNA zugefügt wurde, auf eine Regenerationsplatte ohne Selektionszusatz gegeben. Nach sieben bis zehn Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die entstehenden Kolonien auf neue selektive Platten übertragen.

### **3.3.6.2.4 Gewinnung von Einzelsporisolaten**

Um genetisch einheitliche Einzelsporisolate zu erhalten, wurden die Kolonien auf Haferflockenagar überimpft, auf welchem die Transformanten zur Konidienbildung angeregt wurden. Die Sporen wurden in Verdünnung auf selektive PDA-Platten ausplattiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien isoliert und auf Haferflockenagar übertragen, um mit den darauf gebildeten Sporen Dauerkulturen herzustellen.

## **3.3.7 Southern-Hybridisierung**

### **3.3.7.1 Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden**

Die Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin-dUTP erfolgte in einer Standard-PCR, bei welcher ein DIG-dNTP-Mix, bestehend aus je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 1,9 mM dTTP und 0,1 mM DIG-dUTP (PCR DIG Labelling Mix, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet wurde. Als Matrize diente Plasmid-DNA mit den entsprechenden DNA-Sequenzen. Die zur Generierung der Sonden eingesetzten Primer sind in Tabelle 15 aufgelistet. Der Erfolg der Markierung wurde anhand des verzögerten Laufverhaltens der Sonde im Vergleich zu einer nicht markierten Probe

bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung geprüft. Die Sonde wurde mit Hilfe des GeneJET PCR Purification Kits (Thermo Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### **3.3.7.2 Restriktion und Gelelektrophorese**

Pro 25 µl Ansatz wurden jeweils 2,5 µg genomische DNA mit 0,5 µl des entsprechenden Restriktionsenzym und dem entsprechenden Volumen des zugehörigen Puffers versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die enzymatische Fragmentierung der DNA wurde durch elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem 0,7%igen (w/v) TAE-Gel bei 60 V für drei Stunden und anschließender Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht visuell kontrolliert.

### **3.3.7.3 Kapillartransfer**

Nach der erfolgreichen Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente wurde das Gel unter leichtem Schütteln zunächst 30 min in 0,25 M HCl und anschließend 30 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Die DNA wurde durch einen mindestens dreistündigen abwärts gerichteten Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Die Transfereinheit wurde folgendermaßen aufgebaut: Auf einen ca. 4 cm hohen Stapel Papiertücher wurden drei Lagen Filterpapier (Whatman 3MM, Göttingen), die Nylonmembran, das Gel und weitere drei Lagen Filterpapier übereinander gelegt. Die Größe von Membran und Filterpapier entsprachen der Gelgröße und wurden so angeordnet, dass alle Einheiten deckungsgleich aufeinander lagen. Den Abschluss bildeten lange Streifen Filterpapier in Gelbreite, die eine Verbindung zum Reservoir an 20x SSC-Transferpuffer herstellten. Im Anschluss an den Kapillartransfer erfolgte die kovalente Verknüpfung der DNA-Fragmente an die Membran durch 2-stündige Inkubation bei 80 °C im Hybridisierungssofen (Biozym Scientific, Oldendorf).

### **3.3.7.4 Hybridisierung und Nachweis der gebundenen Sonde**

Die Membran wurde in Hybridisierungsröhrchen (Biozym, Hessisch Oldendorf) überführt und für 30 min in 20 ml Hybridisierungspuffer bei 65 °C im Hybridisierungssofen (Biozym Scientific, Oldendorf) prähybridisiert. Nach 5-minütiger Denaturierung der Sonde bei 100 °C erfolgte eine sofortige Inkubation für 90 s in einer Eis-Kochsalz-Lösung, um die Reassoziaton der beiden DNA-Stränge zu verhindern. Anschließend wurde die Sonde in den Hybridisierungsansatz gegeben und bei 65 °C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal 5 min in 2x Waschpuffer bei Raumtemperatur und anschließend je 15 min in 0,5x Waschpuffer und 0,25x Waschpuffer bei 65 °C gewaschen. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Nach 1-minütiger Inkubation der Membran in Waschpuffer M erfolgte für eine Stunde das Blocken der Membran mit Blocking-Puffer, um ein unspezifisches Binden des Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde der Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) in einer Verdünnung von 1:10000 hinzugegeben und für 30 min

inkubiert. Durch dreimal 10 min Waschen der Membran mit Waschpuffer M wurden ungebundene Antikörper entfernt. Zur Vorbereitung der CSPD-Reaktion wurde die Membran 2 min mit Detektionspuffer behandelt. Nach Zugabe von 1 ml CSPD-Lösung (CSPD ready-to-use, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) wurde die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien (Folienhalbschlauch, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) 5 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm (Medical X-Ray Screen Film Blue sensitive, Agfa HealthCare NV, Mortsel, Belgien) in einer Filmkassette (X-Ray Cassette, MS Laborgeräte, Heidelberg) inkubiert. Die Belichtungsdauer richtete sich nach der Signalstärke. Der Film wurde mit Hilfe eines Röntgenfilmentwicklungssystems (OPTIMAX, PROTEC® Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld) entwickelt.

### 3.3.8 Immunzytologischer Nachweis von Histonmodifikationen

Zum Nachweis von spezifischen Histonmodifikationen im Zellkern von *C. graminicola* wurden Konidien von einer OMA-Platte in 40 µl 4 % (v/v) Formaldehyd in 1x PBS überführt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Suspension auf einen polylysinieren Objektträger (Thermo Scientific, Schwerte) gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt, welches mit Hilfe eines Filterpapiers (Whatman 3MM, Göttingen) festgedrückt wurde. Mit einem Bleistift wurde auf das Deckglas geklopft, damit die Konidien sich öffnen und den Zellkern freigeben. Zur Fixierung der Konidien wurde der Objektträger in flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach der Entfernung des Deckglases wurde das Präparat 15 min bei Raumtemperatur in 1x PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde das Präparat in 30-50 µl 3 % (w/v) BSA in 1x PBS für 30 min bei 37 °C in einer Feuchtekammer inkubiert. Anschließend wurde das Präparat 15 min in 1x PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (50 µl, 1:50 in 3 % (w/v) BSA in 1x PBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtekammer. Als primäre Antikörper dienten H4K20me1 *monoclonal antibody* (diagenode, Seraing, Belgien), Anti-dimethyl-Histone H4 (Lys20) *Antibody* (Merck, Darmstadt), sowie Anti-Histone H4 (tri methyl K20) *antibody* (abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich). Um nicht bzw. unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde das Präparat bei Raumtemperatur 15 min in 1x PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (30 µl, 1:100 in 1x PBS) zum Präparat und eine einstündige Inkubation bei 37 °C in einer Feuchtekammer. Als sekundäre Antikörper wurden Alexa Fluor® 488 *goat anti-rabbit IgG* bzw. Alexa Fluor® 488 *goat anti-mouse IgG* (Life Technologies, Eugene, USA) verwendet. Nach 15-minütigem Waschen in 1x PBS bei Raumtemperatur wurde das Präparat mit 15 µL DAPI-Lösung (0,01 mg/ml) gefärbt.

### 3.4 Infektionsversuche

#### 3.4.1 Gewinnung der Konidiensuspension zur Inokulation

*C. graminicola* wurde 14 Tage auf OMA kultiviert. Die Konidien der zu untersuchenden Stämme wurden mit 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> abgespült und in 900 µl 0,02 % (v/v) Tween20 aufgenommen. Die Sporenkonzentration der Suspensionen wurde lichtmikroskopisch durch Auszählen der Konidien mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf) bei 100-facher Vergrößerung im Hellfeld (Mikroskop Axiostar Plus, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) bestimmt. Die gewünschte Endkonzentration der Sporensuspension wurde durch Verdünnen der Stammlösung mit 0,02 %-igem (v/v) Tween20 hergestellt.

#### 3.4.2 Inokulation von Mais

Etwa 8 cm lange Segmente der dritten Folgeblätter 14 Tage alter Maispflanzen (*Zea mays* cv. Mikado) wurden mit Hilfe von Klebeband in quadratischen Petrischalen auf Filterpapier (Rotilabo®-Rundfilter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) fixiert. Das Filterpapier im Deckel der quadratischen Petrischalen wurde mit Wasser angefeuchtet. Die Inokulation erfolgte auf der Blattrippe mit mehreren 10 µl Tropfen einer Suspension von 10<sup>6</sup> Sporen/ml mit ca. 1 cm Abstand. Wurden die Infektionsexperimente anschließend für qPCR-Analysen genutzt, erfolgte die Inokulation mit nur zwei Tropfen in der Mitte des Blattsegments. Die Kontrollinokulation erfolgte mit 0,02 % (v/v) Tween20. Für die Inokulation verwundeter Maisblätter wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze an der Inokulationsstelle eine artifizielle Läsion erzeugt. Die Inkubation der Blattsegmenttests erfolgte bei 23 °C, 100 % Luftfeuchte und einer Lichtintensität von 10 µE im Inkubator (Infors AG, Bottmingen, Schweiz). Die Symptomentwicklung wurde täglich makroskopisch und mikroskopisch verfolgt und dokumentiert. Am vierten Tag nach der Inokulation wurden die Blattsegmenttests fotografiert.

##### 3.4.2.1 Mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen

Zur mikroskopischen Untersuchung der gebildeten Infektionsstrukturen wurden inokulierte Maisblattsegmente täglich vom ersten bis zum vierten Tag nach Inokulation geerntet und in einer Entfärbelösung, bestehend aus Ethanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1, über Nacht bei Raumtemperatur entfärbt. Anhand von Proben, die 48 hpi geerntet wurden, erfolgte die Bestimmung des prozentualen Anteils gekeimter Konidien an der Gesamtzahl der Konidien auf der Blattoberfläche. Der prozentuale Anteil gekeimter Konidien, die Appressorien differenzierten und der Anteil an Appressorien, die das Pflanzengewebe penetrierten, wurden ebenfalls bestimmt. Zur Quantifizierung der Infektionsstrukturen wurden je Pilzstamm drei biologische Wiederholungen durchgeführt. Pro biologischer Wiederholung wurden zur Bestimmung der Bildungsrate 100 der betreffenden Infektionsstrukturen gezählt. Aus den Werten der biologischen Wiederholungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Zusätzlich wurden Fotos der Infektionsstrukturen angefertigt.



### 3.4.2.2 Analyse der Papillenbildung als pflanzliche Abwehrreaktion

Die Papillenbildung als Abwehrreaktion der Pflanze wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie unter UV-Bestrahlung analysiert. Proben inokulierter Maisblattsegmente wurden täglich vom ersten bis zum vierten Tag nach Inokulation geerntet und anschließend in einer Entfärbelösung, bestehend aus Ethanol und Essigsäure im Verhältnis 3:1, über Nacht bei Raumtemperatur entfärbt.

Zur Bestimmung der Papillenbildungsrate wurden je Pilzstamm drei biologische Wiederholungen analysiert. Pro biologischer Wiederholung wurde die Anzahl an Papillen unter 100 Appressorien betrachtet. Aus den Werten der biologischen Wiederholungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Zusätzlich wurden Fotos der Infektionsstrukturen angefertigt.

### 3.4.3 Inokulation von Zwiebel

Die Inokulation von auf 1,5%igem (w/v) Wasseragar fixierten Zwiebelepidermen (ca. 1 x 1 cm) erfolgte mit 10 µl Tropfen einer Suspension von 10<sup>5</sup> Konidien/ml. Der gesamte Ansatz wurde bei 23 °C im Dunkeln inkubiert. Einzelne Proben wurden täglich vom ersten bis zum vierten Tag nach der Inokulation mikroskopisch analysiert. Zusätzlich wurden Fotos der Infektionsstrukturen angefertigt.

### 3.4.4 Inokulation von Polyesterfolie

Polyesterfolien (nobo OHP Transparency Film, Staples Deutschland GmbH & Co.KG, Berlin) wurden mit je 10 µl Tropfen einer Sporensuspension von 10<sup>6</sup> Konidien/ml inokuliert und 24 Stunden bei 23 °C und 100 % Luftfeuchte in verschlossenen Petrischalen inkubiert.

#### 3.4.4.1 Zytorrhizie

Der in den Appressorien generierte Turgordruck wurde mittels Zytorrhizie-Experimenten nach Howard *et al.* (1991) bestimmt. Polyesterfolien (nobo OHP Transparency Film, Staples Deutschland GmbH & Co.KG, Berlin) wurden mit Sporen der zu untersuchenden Pilzstämme inokuliert und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Anzahl kollabierter Appressorien in wässrigen Lösungen mit PEG 6000-Konzentrationen von 100-600 g/l erfolgte 24 hpi. Nach 10-minütiger Inkubation in der PEG 6000-Lösung bei Raumtemperatur wurden jeweils dreimal 100 Appressorien pro Pilzisolat gezählt. Der osmotische Druck  $\Pi$  der verwendeten PEG-Lösungen wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:  $\Pi = \alpha * C + \beta * C^2$  (Money 1989). Bei C handelt es sich um die Molarität und bei den Koeffizienten  $\alpha$  und  $\beta$  um spezifische Werte für die Molekülmasse der verwendeten PEG-Lösung (Money 1989).

### 3.5 Wachstumsversuche

#### 3.5.1 Axenisches Wachstum auf verschiedenen Medien

Zur Quantifizierung des vegetativen Wachstums wurden der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, je drei unabhängige Deletionsmutanten sowie je drei unabhängige komplementierte Isolate in Petrischalen (Durchmesser: 9 cm) unter Verwendung von festen Medien kultiviert. Die Medien wurden mit 5  $\mu$ l einer Konidiensuspension mit  $10^6$  Konidien je ml angeimpft und bei 23 °C im Kultivierungsschrank KBW 720 (Binder, Tuttlingen) inkubiert. Der Durchmesser der wachsenden Kolonien wurde täglich mit einem Lineal bestimmt. Nach zehntägigem Wachstum wurden die Kulturen fotografiert und der Versuch beendet.

Zur Untersuchung der Sensitivität der Isolate gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wurde dem PDA  $H_2O_2$  in einer Endkonzentration von 0,01 % (w/v) oder Bengalrosa in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugesetzt. Das PDA wurde mit Myzelstücken einer definierten Größe, welche mit Hilfe eines Korkbohrers (Durchmesser: 5 mm) von sieben Tage alten PDA-Kulturen entnommen wurden, angeimpft. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 23 °C und 10  $\mu$ E Lichtintensität. Der Zuwachs wurde täglich mit dem Lineal gemessen. Abschließend wurden die Kulturen fotografiert.

#### 3.5.2 Kultivierung von Myzel auf Nylonmembranen

Zur Isolierung von RNA aus vegetativen Hyphen wurden der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, je drei unabhängige Deletionsmutanten sowie je drei unabhängige komplementierte Isolate in quadratischen Petrischalen auf Nylonmembranen unter Verwendung von PDA kultiviert. Die Vorbereitung der Membran orientierte sich an Lange *et al.* (2014). Zunächst wurde die Nylonmembran in 70%igem (v/v) Ethanol sterilisiert. Die Membran wurde in vier Lösungen Ethanol-PDB (*Potato Dextrose Broth*) mit je 50 % (v/v), 25 % (v/v), 12,5 % (v/v), 6,25 % (v/v) Ethanol inkubiert. Abschließend folgten zwei Waschschriffe in PDB. Die Membran wurde 30 min auf dem PDA getrocknet, bevor sie mit 20 gleichmäßig verteilten 5  $\mu$ l-Tropfen einer Konidiensuspension mit einer Konzentration von  $10^6$  Sporen/ml inokuliert wurde. Nach sieben Tagen wurde das Myzel, das auf der Membran wuchs, geerntet.

#### 3.5.3 Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot

Calcofluor Weiß verhindert die Mikrofibrillen-Bildung, indem es an entstehende Chitinketten bindet und somit Enzyme, die Chitin mit  $\beta$ -1,3-Glucan und  $\beta$ -1,6-Glucan verbinden, inhibiert (Elorza *et al.*, 1983; Oliveira-Garcia und Deising, 2016b). Kongorot beeinträchtigt den Zellwandaufbau, da es vorrangig an  $\beta$ -1,3-Glucan bindet (Kopecká und Gabriel, 1992; Oliveira-Garcia und Deising, 2016b). Eine erhöhte Sensitivität gegenüber diesen anionischen Farbstoffen ist indikativ für Zellwanddefekte des Pilzes (Ram und Klis, 2006). Für *GPII2*-, *GAA1*- und *GPI8*-RNAi-Stämme von

*C. graminicola* konnten mit Hilfe von Wachstumsversuchen auf Calcofluor Weiß und Kongorot starke Zellwanddefekte nachgewiesen werden (Oliveira-Garcia und Deising, 2016b). Da auf PDA mit einer Konzentration von je 400 µg/ml Calcofluor Weiß und Kongorot die Wachstumsbeeinträchtigung des Wildtypisolats minimal war, wurde diese Konzentration für Sensitivitätsassays gewählt. Die Medien wurden wie in Ram und Klis (2006) beschrieben hergestellt. Als Kontrolle diente PDA ohne Zusatz von Farbstoffen. Die Medien wurden in quadratische Petrischalen gegossen und mit jeweils 5 µl Tropfen von Konidien suspensionen mit Konzentrationen von  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  und  $10^4$  Konidien je ml inokuliert. Um zu testen, ob die Wachstumsverzögerungen in Anwesenheit von Calcofluor Weiß und Kongorot auf eine beeinträchtigte Konidienkeimung zurückzuführen sind, wurden die verschiedenen Medien mit Myzel inokuliert. Hierfür wurden je 100 ml CM-Flüssigmedium mit  $10^6$  Sporen inokuliert. Nach siebentägiger Inokulation bei Raumtemperatur und 110 rpm auf dem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) wurde die Flüssigkultur durch autoklaviertes Miracloth (Calbiochem, San Diego, USA) filtriert. Jeweils 500 mg Myzel wurden in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 ml sterilem Wasser und zwei 3 mm Stahlkugeln (HECHT Kugellager GmbH & Co. KG, Winnenden) überführt und für 30 s bei 30 Hertz in der Schwingmühle (MM400, Retsch, Haan) aufgeschlossen. Die gleichmäßige Fragmentierung des Myzels wurde mikroskopisch geprüft. Anschließend wurden  $10^{-1}$ -,  $10^{-2}$ - und  $10^{-3}$ -Verdünnungen der Suspension hergestellt und jeweils 10 µl der Suspension und der Verdünnungen auf die Nährmedien aufgetragen. In dem Sensitivitätsassay wurden der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, je drei unabhängige Deletionsmutanten sowie je drei unabhängige komplementierte Isolate getestet. Es wurden je drei biologische Wiederholungen durchgeführt. Die inokulierten Platten wurden bei 23 °C und in Dunkelheit im Inkubator Unitron HT (Infors AG, Bottmingen, CH) inkubiert. Das Wachstum wurde täglich verfolgt und nach sieben Tagen fotografiert.

### 3.5.4 Sporulationsversuche

Zur Bestimmung des Sporulationsvermögens wurden OMA- und PDA-Platten (Durchmesser: 4,5 cm) mit 5 µl einer Konidien suspension mit  $10^6$  Konidien pro ml inokuliert. Es wurden je acht biologische Wiederholungen vom Wildtyp, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, je drei unabhängigen Deletionsmutanten sowie je drei unabhängigen komplementierten Isolaten angelegt. Nach 14 Tagen Inokulation bei 23 °C im Kultivierungsschrank KBW 720 (Binder, Tuttlingen) wurden die Sporen mit je 2 ml 0,02 % (v/v) Tween20 von den Platten abgespült. Die Konidienzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim) bei 100-facher Vergrößerung im Hellfeld (Mikroskop Axiostar Plus, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena) in drei Wiederholungen bestimmt. Aus den erhaltenen Werten der acht biologischen Wiederholungen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und mittels T-Test auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft.

### 3.5.5 Benetzbarkeitsassay

Für den Vergleich der Benetzbarkeit der zu untersuchenden Isolate wurde ein Assay, wie von Kim *et al.* (2005) beschrieben, angewendet. Der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, je drei unabhängige Deletionsmutanten sowie je drei unabhängige komplementierte Isolate wurden 14 Tage auf OMA und PDA kultiviert. Je ein 50 µl Wassertropfen bzw. 50 µl eines Detergens, bestehend aus 0,2 % (w/v) SDS und 50 mM EDTA, wurden auf jede Kultur gegeben. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Tropfen fotografiert und die Verhältnisse von Höhe zu Breite ermittelt.

### 3.6 RNA-Seq

Die RNA-Seq wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Knut Krohn bei Core Unit DNA-Technologien an der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig mit dem Illumina HiScanSQ System (Illumina, San Diego, USA) durchgeführt. Um einen Datenverlust zu vermeiden, wurden pro Isolat die Bibliotheken von je drei Replikaten gepoolt. Die Sequenzierung wurde ohne vorherige Poly(A)-Selektion durchgeführt. Mit dem Adapter AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-Index-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG wurden die sequenzierten Readbibliotheken am 3'-Ende der Sequenz geclippt. Nach dem Mapping gegen das annotierte Referenzgenom des *C. graminicola*-Stammes CgM2 wurde die Anzahl der gemappten Reads aller Exons pro Gen extrahiert und als Readcount pro Gen für die Expressionsanalyse genutzt. Clipping und Mapping wurden mit der CLC Genomics Workbench (CLC Genomics Workbench 7.0.3 2014, Qiagen, Aarhus, Dänemark) durchgeführt. Die Expressionsanalyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms R (R Core Team, <http://www.r-project.org/>; Stand: 01.07.2017) unter Nutzung des Paketes EdgeR (Robinson *et al.*, 2010). Die Expressionsdaten wurden mittels *trimmed mean of M-Values* (Robinson und Oshlack, 2010) normiert. Mittels der biologischen Replikate wurde die *common dispersion* bestimmt. Die differentiale Genexpression wurde mit dem exactTest (Robinson und Smyth, 2007) bestimmt. Mit Hilfe des R-Paketes Plotly (Sievert *et al.*, 2017) wurden Plots, welche die Transkriptkonzentrationen in  $\Delta tkm5$  im Vergleich zum Wildtyp zeigen, generiert. Die Gene von *C. graminicola* wurden in sieben funktionelle Kategorien unterteilt. Die Einteilung in CAZymes-Familie, Cytochrom-P450-Familie, Effektoren, sekretierte Proteasen, Sekundärmetabolit-Cluster, Transkriptionsfaktoren und Transporter wurde nach O'Connell *et al.* (2012) vorgenommen. Der Kategorie „ohne funktionelle Gruppe“ wurden Gene zugeteilt, die keiner vorher genannten Kategorien zugeordnet werden konnten. Die bioinformatische Analyse und RNA-Seq-Auswertung sowie die Erstellung von Säulendiagrammen und *Scatter Plots* wurden von Diplom-Bioinformatiker Gunnar Hönig ausgeführt.

#### 3.6.1 RNA-Seq infizierter Maisblätter

Während der Infektion von *Zea mays* cv. Mikado durch *C. graminicola* wurden in Blattsegmentassays die Transkriptabundanzen von Pilz- und Pflanzengenen mittels RNA-Seq bestimmt.

Dabei wurden die Transkriptome in Sporen und nekrotrophen Hyphen des Wildtyps CgM2 und der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  miteinander verglichen. Die Transkriptmengen im Maisgewebe, infiziert mit dem Wildtyp CgM2 oder der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$ , wurden 72 hpi im Vergleich betrachtet. Mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 3 mm) wurden in drei biologischen Wiederholungen 0 hpi und 72 hpi Proben entnommen. Die RNA-Extraktion erfolgte wie unter 3.3.1.6 beschrieben.

### 3.6.2 RNA-Seq vegetativer Hyphen

Für den Vergleich der Transkriptome von dem Wildtyp CgM2 und der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  wurde RNA aus sieben Tage alten vegetativen Hyphen (Kultivierung siehe 3.5.2) extrahiert. Die RNA-Extraktion erfolgte wie unter 3.3.1.6 beschrieben.

### 3.6.3 Genauswahl für RT-qPCR

Die relativen Transkriptmengen einzelner Gene wurden zusätzlich zu der RNA-Seq mittels RT-qPCR bestimmt (Anhang III,

Tabelle 33). Voraussetzung für anhand der RNA-Seq-Daten ausgewählter Kandidatengene war ein logarithmierter *fold change* (logFC) von  $\leq -2$  bzw.  $\geq 2$  und eine *false discovery rate* (FDR)  $\leq 0,05$  in vegetativen Hyphen bzw. ein p-Wert  $\leq 0,05$  in Sporen. Des Weiteren wurden Gene ausgewählt, die aufgrund ihrer Funktion eine Rolle bei der phänotypischen Ausprägung von  $\Delta kmt5$  spielen könnten. Da  $\Delta kmt5$ -Kolonien eine rote Färbung zeigten, sobald sie mit einer Nachbar-Kolonie in Kontakt kamen, wurden die Transkriptabundanz von Genen, die in die Sekundärmetabolit-Biosynthese involviert sind, als Kandidatengene ausgewählt. Aufgrund der erhöhten Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und der veränderten Zellwandoberfläche der  $\Delta kmt5$ -Appressorien wurden neben den Sekundärmetabolit-Genen die Transkriptkonzentrationen von Genen, welche bei der Modifikation der pilzlichen Zellwand eine Rolle spielen, untersucht.

## 3.7 Dokumentation

### 3.7.1 Lichtmikroskopie

Mit Hilfe des Eclipse E600-Forschungsmikroskops (Nikon, Düsseldorf) wurden mikroskopische Untersuchungen im Hellfeld und DIC-Modus durchgeführt. Mit einer digitalen Mikroskopkamera (Digital Sight DS-SM, Nikon, Düsseldorf) und mit dem Programm NIS-Elements D Version 3.22.11 (Nikon, Düsseldorf) wurden Bilder von Untersuchungsobjekten aufgenommen.

### 3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Objekte bzw. GFP-markierte Pilzstämmen wurden mit den Forschungsmikroskopen Eclipse E600 bzw. Eclipse 90i Confocal Laser Scanning-Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) untersucht. Entsprechend der Spezifikationen der verwendeten Fluorophore wurden

Anregungswellenlänge und Detektionsbereich gewählt. Es wurden folgende Filter der Firma Nikon verwendet: DAPI-Filter (Ex 340-380, DM 400, BA 435-485), GFP-Filter (Ex 480/40, DM 505, BA 535/50) bzw. GFP(R)-LP-Filter (460-500, DM 505, BA 510) und UV-2A-Filter (Ex 330-380, DM 400, BA 420). Digitale Bilder wurden mit der Mikroskopkamera (Digital Sight DS-SM, Nikon, Düsseldorf) aufgezeichnet.

### 3.7.3 Atomkraftmikroskopie zur Untersuchung der Appressorienoberfläche

Die Atomkraftmikroskopie wurde von Dr.-Ing. Andreas Kiesow und Matthias Menzel vom Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS durchgeführt. Die Probenvorbereitung wurde von M.Sc. Maximilian Groß vorgenommen. Für die atomkraftmikroskopische Untersuchung der Oberfläche von Appressorienzellwänden wurden Objektträger mit einer Sporensuspension von  $10^6$  Sporen/ml inokuliert und anschließend 48 Stunden bei 23 °C und 100 % Luftfeuchte in verschlossenen Petrischalen inkubiert. Die AFM-basierte Nanoindentierung (Nanowizard®II, JPK Instruments, Berlin) unter Verwendung des *Force-Mapping Mode* auf einer Fläche von  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  mit  $128 \times 128$  Messpunkten diente zur Aufnahme von topographischen Informationen und Bestimmung der lokalen mechanischen Eigenschaften der Appressorienoberfläche. Alle Messungen wurden in einer flüssigen Umgebung in destilliertem Wasser durchgeführt (*standard liquid cell*, JPKInstruments, Berlin). Youngsche Module wurden anhand der *load penetration curve* gemäß eines erweiterten Hertzschen Modells (Johnson, 1985) unter Verwendung der JPK-Data processing Software (JPK Instruments, Berlin) berechnet.

### 3.7.4 Fotografie

Fotos von Wachstums- und Infektionsversuchen wurden mit einer Cybershot DSC-HX100V (Sony, Berlin) aufgenommen. Die Bearbeitung digitaler Bilder erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop Version CS 8.0.1 (Adobe Systems, San Jose, USA).

## 3.8 Bioinformatische Analyse

### 3.8.1 Datenbankrecherche

Homologievergleiche wie BLAST *Search* (Altschul *et al.*, 1997) und Datenbankrecherchen erfolgten über die Internetseite des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/); Stand 19.10.2017). Proteindomänen wurden mit dem *ScanProsite Tool* des *Swiss Institute of Bioinformatics* (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>; Stand: 08.02.2017) ermittelt. Kernlokalisierungssignale (*nuclear localization signal*, NLS) wurden mit dem *cNLS Mapper* (Kosugi *et al.*, 2009) identifiziert ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi); Stand: 19.12.2017).

### 3.8.2 Phylogenetische Analyse

Der phylogenetische Stammbaum wurde mit MEGA7: *Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets* (Kumar *et al.*, 2016) generiert. Als Berechnungsgrundlage diente die *Maximum-Likelihood-Methode*, als Substitutionsmodell die WAG-Matrix (Whelan und Goldman, 2001). Es wurden 1000 *Bootstrap*-Wiederholungen durchgeführt (Felsenstein, 1985). Die NCBI-Zugangsnummern aller Proteine, die für phylogenetische Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden sind in Tabelle 32 aufgeführt.

**Tabelle 32: NCBI-Zugangsnummern der phylogenetisch analysierten Proteine**

<b>Organismus</b>	<b>NCBI-Zugangsnummer</b>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	EAL93147.1
<i>Aspergillus nidulans</i>	XP_663751.1
<i>Blumeria graminis f. sp. Hordei</i>	CCU81684.1
<i>Botrytis cinerea</i>	EMR90091.1
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	EQB43578.1
<i>Colletotrichum graminicola</i>	XP_008099990.1
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	XP_018163287.1
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	ENH87362.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	AAF45537.1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	KLO89536.1
<i>Fusarium graminearum</i>	XP_386705.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	EWY97598.1
<i>Fusarium poae</i>	OBS17737.1
<i>Fusarium pseudograminearum</i>	XP_009253123.1
<i>Magnaporthe oryzae</i>	XP_367482.2
<i>Mus musculus</i> (Kmt5B)	AAT00539.1
<i>Mus musculus</i> (Kmt5C)	AAT00540.1
<i>Neurospora crassa</i>	EAA33797.2
<i>Neurospora tetrasperma</i>	XP_009851452.1
<i>Rhizopus delemar</i>	EIE89418.1
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	NP_588078
<i>Trichoderma gamsii</i>	XP_018657666.1
<i>Trichoderma harzianum</i>	KKP01479.1
<i>Trichoderma reesei</i>	ETR97331.1
<i>Trichoderma virens</i>	XP_013949466.1
<i>Puccinia sorghi</i>	KNZ53361.1
<i>Puccinia triticina</i>	OAV92512.1
<i>Yarrowia lipolytica</i>	XP_504243.1
<i>Zymoseptoria tritici</i>	XP_003854447.1

### **3.9 Statistik**

Für statistische Analysen wurden das Programm Sigma Plot Version 11 (Systat Software GmbH, Erkrath) und das Statistik-*Tool* GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>; Stand: 29.11.2017) verwendet.



## 4 Ergebnisse

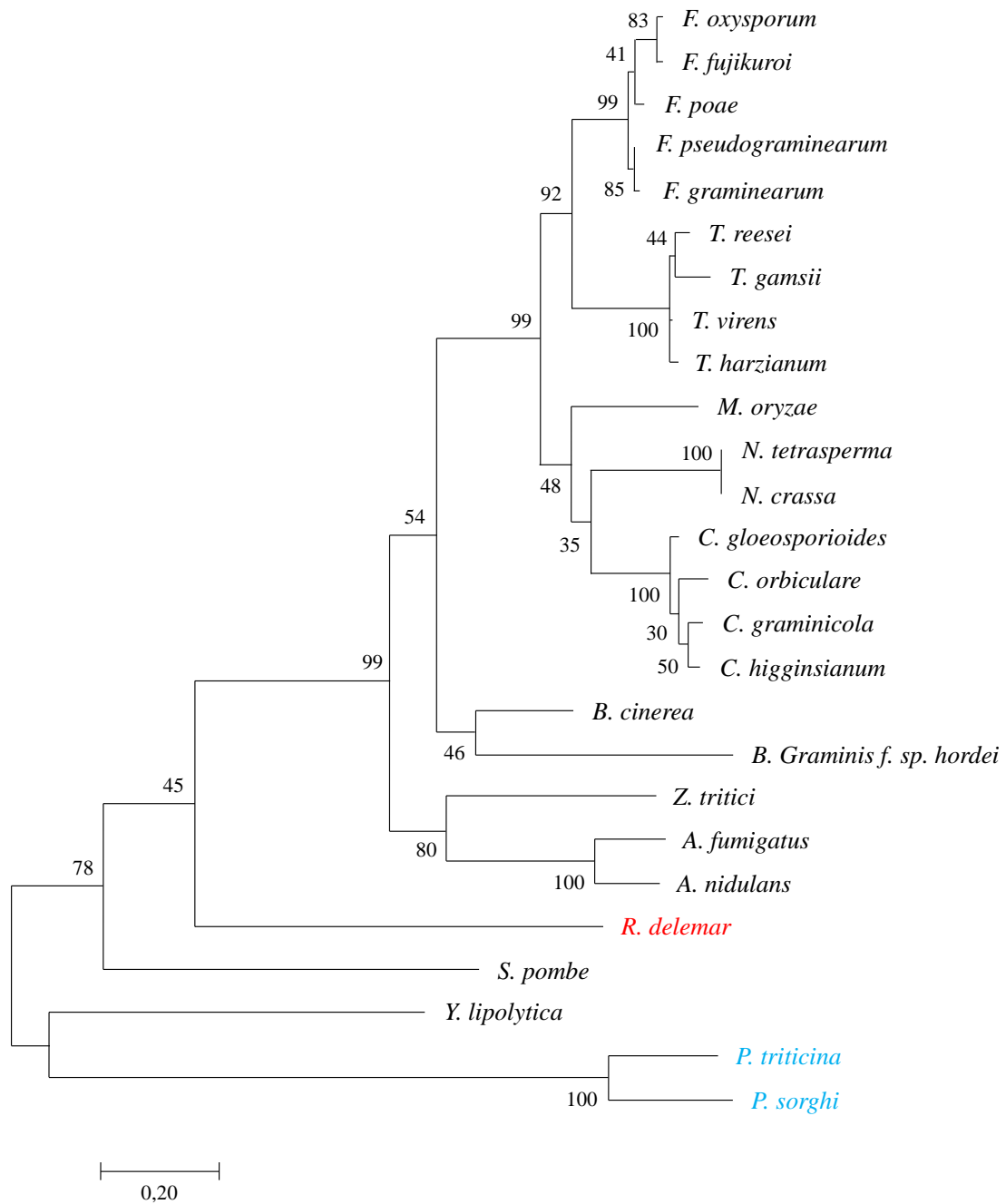
### 4.1 Das *single-copy*-Gen *KMT5* kodiert für eine Histon-H4K20-Methyltransferase

Durch BLASTp-Analysen mit den Proteinsequenzen der annotierten und ausführlich untersuchten Histon-H4K20-Methyltransferasen Kmt5B aus *D. melanogaster* sowie Kmt5B und Kmt5C aus *M. musculus* (Schotta *et al.*, 2004; Schotta *et al.*, 2008) konnte ein Protein mit einer SET9-Domäne in *C. graminicola* identifiziert werden. CgKmt5 zeigte gegenüber Kmt5B aus *D. melanogaster* eine Identität von 37 %. Gegenüber Kmt5B und Kmt5C aus *M. musculus* zeigte CgKmt5 jeweils eine Identität von 37 % und 30 %. Es konnte kein Ortholog von Kmt5A in dem Genom von *C. graminicola* identifiziert werden. Das Gen, welches für das identifizierte SET9-Domäne-Protein kodiert, wird entsprechend der Nomenklatur von Allis *et al.* (2007b) als *KMT5* bezeichnet. Durch Blast-Analysen mit Pilzarten aus den Abteilungen Ascomycota, Basidiomycota und dem Zygomyceten *Rhizopus delemar* wurden Orthologe von CgKmt5 identifiziert. Die Kmt5-Proteine der untersuchten nahe verwandten *Colletotrichum*-Arten *C. higginsianum*, *C. orbiculare* und *C. gloeosporioides* zeigen mit 78 %, 71 % und 74 % die höchsten Identitäten mit CgKmt5. Die Kmt5-Orthologe in den Modellorganismen *N. crassa* und *S. pombe* besitzen eine Identität von 54 % und 42 % mit CgKmt5 (Abbildung 1).

Zur Darstellung von evolutionären Verwandtschaftsverhältnissen wurde basierend auf den Aminosäuresequenzen der putativen Histon-H4K20-Methyltransferasen aus 26 Pilzarten ein phylogenetischer Baum berechnet (Abbildung 1, NCBI-Zugangsnummern: Tabelle 32). Neben Modellorganismen wie *N. crassa* wurden phytopathogene Pilze ausgewählt, welche laut Dean *et al.* (2012) aufgrund ihres wissenschaftlichen und ökonomischen Interesses zu den zehn wichtigsten pilzlichen Pflanzenpathogenen zählen.

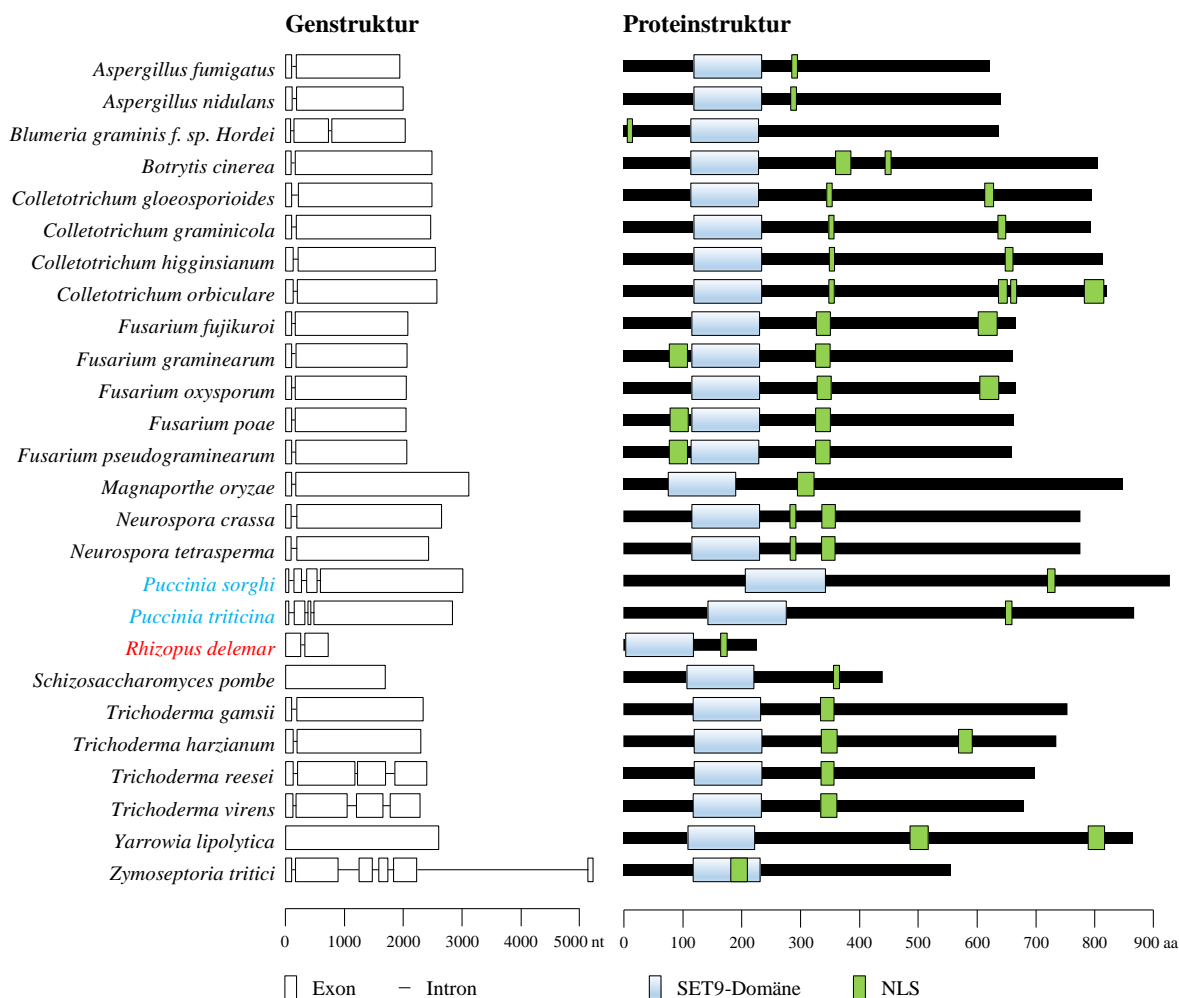
Zur weiteren Charakterisierung der Gen- und Proteinstrukturen der Histon-H4K20-Methyltransferasen der 26 untersuchten Pilzarten wurden mittels *in silico*-Analysen SET9-Domänen und Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) identifiziert (Abbildung 2). Die Domänen-Suche und NLS-Vorhersage ergaben, dass die Histon-H4K20-Methyltransferasen aller betrachteten Pilzarten eine N-terminale SET9-Domäne und mindestens ein Kernlokalisierungssignal besitzen (Abbildung 2).

Das 2456 Nukleotide umfassende *KMT5*-Gen in *C. graminicola* liegt auf Chromosom 4 auf dem Genlocus GLRG\_11114, Supercontig 1.75, Contig 1.312 und besitzt ein Intron (Abbildung 2). Das 794 Aminosäuren umfassende Protein besitzt eine N-terminale SET9-Domäne (Abbildung 2). Mittels NLS-Vorhersage wurden zwei putative Kernlokalisierungssignale identifiziert (Abbildung 2).



**Abbildung 1: Phylogenetische Analyse der Histon-H4K20-Methyltransferasen aus Ascomyceten, Basidiomyceten und einem Zygomyceten**

Phylogenetische Analyse der mittels Homologievergleichs identifizierte Histon-H4K20-Methyltransferasen aus den Ascomyceten *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Blumeria graminis f. sp. Hordei*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum higginsianum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium poae*, *Fusarium pseudograminearum*, *Magnaporthe oryzae*, *Neurospora crassa*, *Neurospora tetrasperma*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Trichoderma gamsii*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma virens*, *Yarrowia lipolytica* und *Zymoseptoria tritici*, den Basidiomyceten (blau) *Puccinia sorghi* und *Puccinia triticina* und dem Zygomyceten (rot) *Rhizopus delemar*.



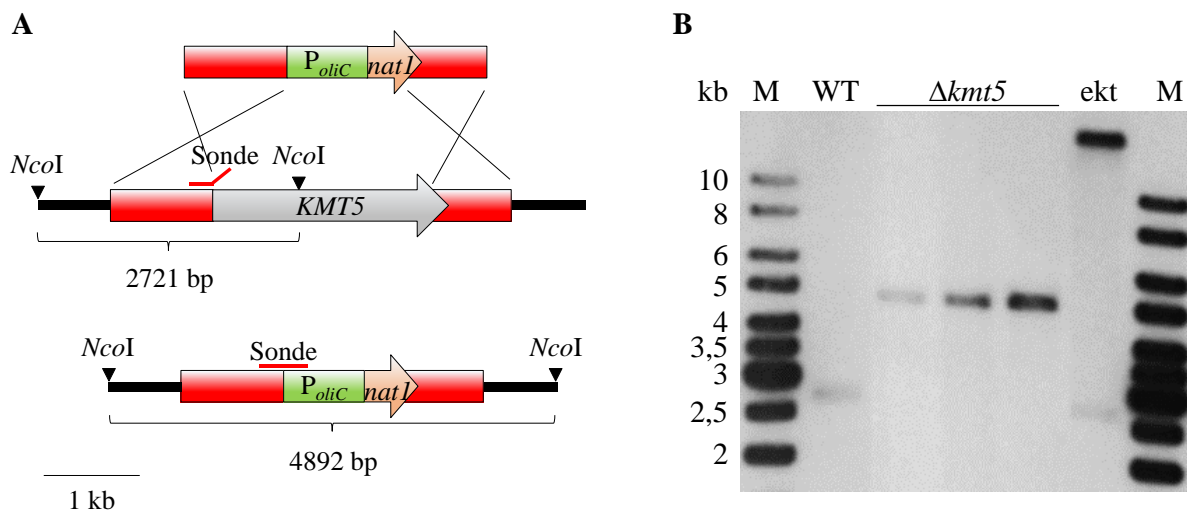
**Abbildung 2: Gen- und Proteinstruktur der Histon-H4K20-Methyltransferasen aus Ascomyceten, Basidiomyceten und einem Zygomyceten**

Dargestellt sind die Gen- und Proteinstrukturen von 23 Ascomyceten, zwei Basidiomyceten (blau) und einem Zygomyceten (rot). Die *KMT5*-Gene der filamentösen Ascomyceten zeigen hochkonservierte Sequenzen und Intron-Positionen. In der Spaltheife *S. pombe* und der Hefe *Y. lipolytica* sind keine Introns vorhanden. Exons sind als weiße Balken, Introns sind als schwarze Linien dargestellt. Die Domänen-Suche und NLS-Vorhersage ergaben, dass die Histon-H4K20-Methyltransferasen jeweils eine N-terminale SET9-Domäne (blaue Balken) und mindestens ein Kernlokalisationssignal (grüne Balken) besitzen. nt = Nukleotide; aa = Aminosäuren

#### 4.2 Deletion von *KMT5*

Durch die Inaktivierung des *KMT5*-Gens und die anschließende phänotypische Charakterisierung der Deletionsmutanten wurden umfangreiche Informationen zur Bedeutung und Funktion des Gens gewonnen. Für die Generierung von *KMT5*-Deletionsstämmen wurde ein Deletionskonstrukt mittels *Double-Joint* PCR generiert. Nach der Transformation des Deletionskonstrukts in Protoplasten des Wildtyps CgM2 wurden die Einzelsporisolate, welche auf Nourseothricin-haltigem Medium selektiert wurden, in Southern Blot-Analysen auf den Integrationsort des Deletionskonstrukts untersucht. Der gesamte 2456 bp umfassende ORF wurde bei einer erfolgreichen Deletion durch die 1473 bp große

Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt (Abbildung 3A). Die genomische DNA wurde vor der Southern Blot-Analyse durch einen Restriktionsverdau mit *NcoI* fragmentiert. Die Southern Blot-Analyse zeigte, dass für *KMT5* drei Deletionsstämme, sowie eine Transformante mit ektopischer Integration des Deletionskonstrukts erhalten wurden (Abbildung 3B). Die Integration der Deletionskassette geschah bei der Transformante an zufälliger Stelle im Genom, sodass weiterhin das intakte *KMT5*-Gen vorhanden ist. Für Untersuchungen zur Charakterisierung von  $\Delta kmt5$  wurden drei unabhängige Deletionsmutanten verwendet.



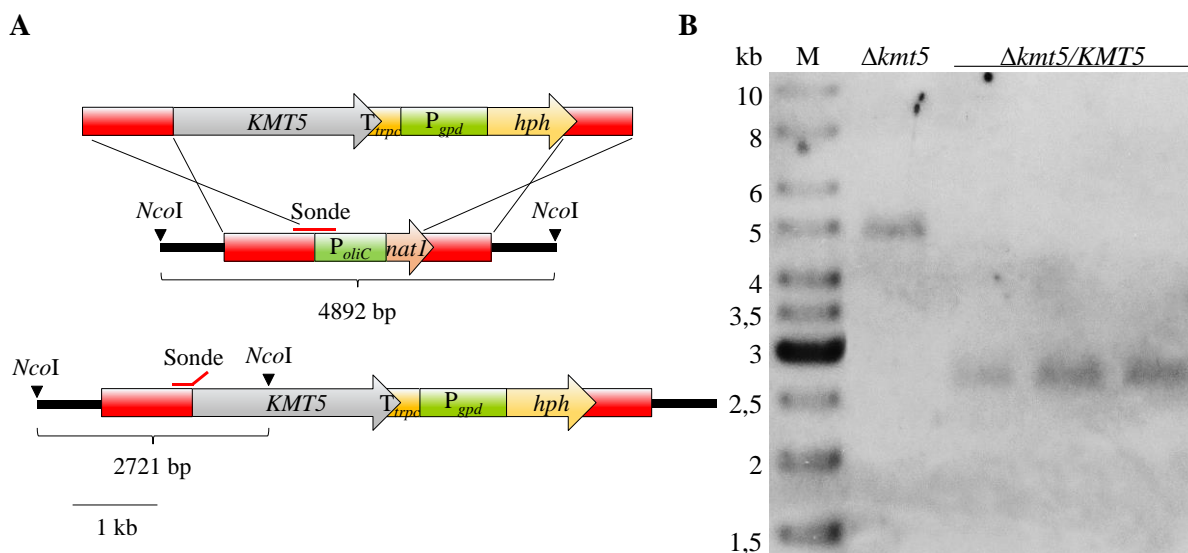
**Abbildung 3: *KMT5*-Deletion mittels homologer Rekombination und Southern Blot-Analyse**

(A) Prinzip des homologen Doppel-*crossover* zur Erzeugung von Deletionsmutanten. Das 2456 bp große Gen *KMT5* wurde durch die 1473 bp große Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt. Dargestellt sind die für die Southern Blot-Analyse verwendete Sonde sowie die *NcoI*-Restriktionsschnittstellen. *P<sub>oliC</sub>* = *oliC*-Promotor, *natI* = Nourseothricin-Resistenzgen. (B) Southern Blot-Analyse von Wildtyp (WT), drei unabhängigen Isolaten mit Integrationen der Nourseothricin-Resistenzkassette durch homologe Rekombinationsereignisse ( $\Delta kmt5$ ) und einem Isolat mit ektopischer Integration der Nourseothricin-Resistenzkassette (ekt). Der Restriktionsverdau genomischer DNA wurde mit *NcoI* durchgeführt. Eine Größenverschiebung von 2721 bp (WT) auf 4892 bp ( $\Delta kmt5$ ) wurde durch die Integration der Resistenzkassette verursacht. kb = Kilobasenpaare, M = Größenstandard

### 4.3 Genetische Komplementation von $\Delta kmt5$

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der  $\Delta kmt5$ -Deletionsmutanten auf ein definiertes Deletionsereignis zurückzuführen ist, wurde zur Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps eine genetische Komplementation durchgeführt (Abbildung 4A). Ein 6831 bp langes Konstrukt, bestehend aus dem *KMT5*-ORF unter Kontrolle des *KMT5*-Promotors und *trpC*-Terminators, der HygromycinB-Resistenzkassette (*gpd*-Promotor und *hph*) und dem *KMT5*-Terminator, wurde in Protoplasten von  $\Delta kmt5$  transformiert. Nach der Einzelsporisolation der Transformanten auf Selektionsmedium, wurde die Komplementation mittels Southern Blot-Analysen nachgewiesen (Abbildung 4B). Die 1473 bp

große Nourseothricin-Resistenzkassette in  $\Delta kmt5$  wurde mittels homologer Rekombination durch den *KMT5*-ORF und die HygromycinB-Resistenzkassette ersetzt. Nach der Fragmentierung der genomischen DNA durch einen Restriktionsverdau mit *NcoI*, wurde die Verschiebung des detektierten DNA-Fragments von 4892 bp in  $\Delta kmt5$  auf 2721 bp sichtbar. Außerdem konnten die komplementierten Isolate nicht auf PDA, welches mit Nourseothricin versetzt wurde, allerdings auf PDA mit Hygromycin, wachsen. Für anschließende Untersuchungen wurden drei unabhängige genetisch komplementierte Isolate  $\Delta kmt5/KMT5$  verwendet.



**Abbildung 4: Genetische Komplementation von  $\Delta kmt5$  mittels homologer Rekombination und Southern Blot-Analyse**

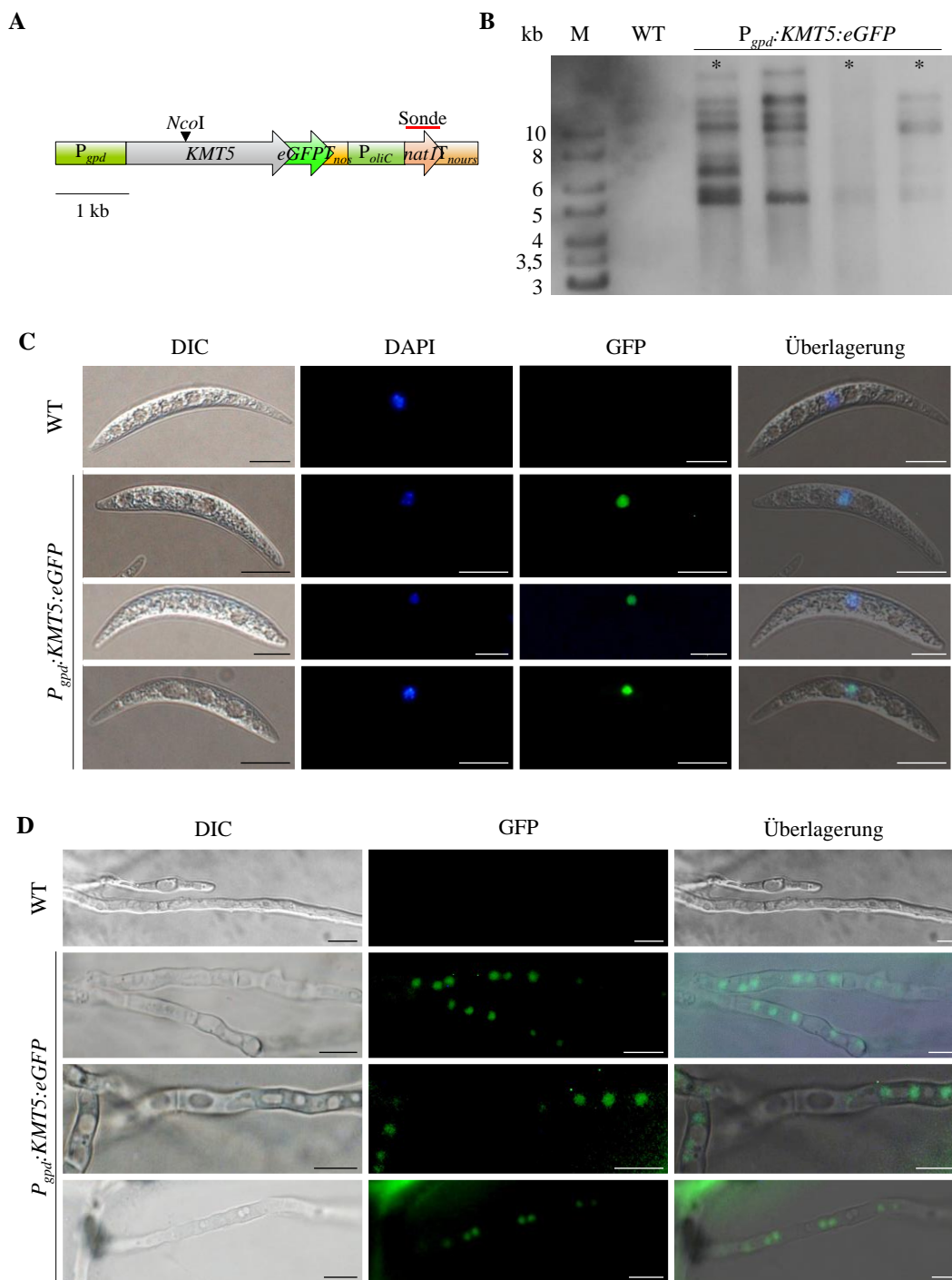
(A) Schema zur genetischen Komplementation von  $\Delta kmt5$ . Die 1473 bp große Nourseothricin-Resistenzkassette in  $\Delta kmt5$  wurde mittels homologer Rekombination durch den *KMT5*-ORF und die HygromycinB-Resistenzkassette ersetzt. Dargestellt sind die für die Southern Blot-Analyse verwendete Sonde und die *NcoI*-Restriktionsschnittstellen.  $T_{trpc}$  = *trpc*-Terminator;  $P_{gpd}$  = *gpd*-Promotor, *hph* = Hygromycin-Resistenzgen. (B) Southern Blot-Analyse von  $\Delta kmt5$  und drei unabhängigen, komplementierten Isolat ( $\Delta kmt5/KMT5$ ) mit Integration des Komplementationskonstrukts durch homologe Rekombinationsereignisse. Der Restriktionsverdau genomischer DNA erfolgte mit *NcoI*. Durch die Integration der Komplementationskassette am Ziellocus wurde eine Größenverschiebung von 4892 bp ( $\Delta kmt5$ ) auf 2721 bp ( $\Delta kmt5/KMT5$ ) verursacht. kb = Kilobasenpaare, M = Größenstandard

#### 4.4 Kmt5 ist im Zellkern lokalisiert

Die NLS-Suche ergab zwei putative Kernlokalisierungssignale in CgKmt5 (Abbildung 2). Zur Überprüfung der Zellkernlokalisierung wurde ein Konstrukt, bestehend aus eGFP fusioniert an CgKmt5 unter dem konstitutiv exprimierten Promotor  $P_{gpd}$ , generiert. Als Selektionsmarker diente die Nourseothricin-Resistenz (Abbildung 5A). Nach der Transformation der Kasette in Protoplasten des Wildtypisolats CgM2, wurde die Anzahl der ins Genom integrierten eGFP-Konstrukte mittels Southern Blot-Analyse nachgewiesen (Abbildung 5B). Es wurden drei Isolate, welche eine unterschiedliche Anzahl an ins Genom integrierter Konstrukte aufwiesen, fluoreszenzmikroskopisch untersucht (\* in Abbildung 5B). Die Bilder der Pilzstrukturen wurden auf und in unpigmentierten Zwiebelepidermen, die im Gegensatz zu Maisblättern nicht entfärbt werden müssen, aufgenommen. Die Zwiebelinfektion durch *C. graminicola*, bei welcher der Pilz den vollständigen Entwicklungszyklus durchlaufen kann, wurde bereits als Modellsystem etabliert (Horbach *et al.*, 2009). In Konidien, vegetativen Hyphen, Infektionsstrukturen und Acervuli wurde eine deutliche gleichmäßig verteilte GFP-Fluoreszenz im Zellkern detektiert (Abbildung 5C und D; Anhang II, Abbildung 19). Es konnte keine Anreicherung der GFP-Fluoreszenz an Chromozentren festgestellt werden. Die DAPI-Färbung der DNA im Zellkern bestätigte die Kernlokalisierung.

#### 4.5 Kmt5 ist für die Mono-, Di- und Trimethylierung von H4K20 unabdingbar

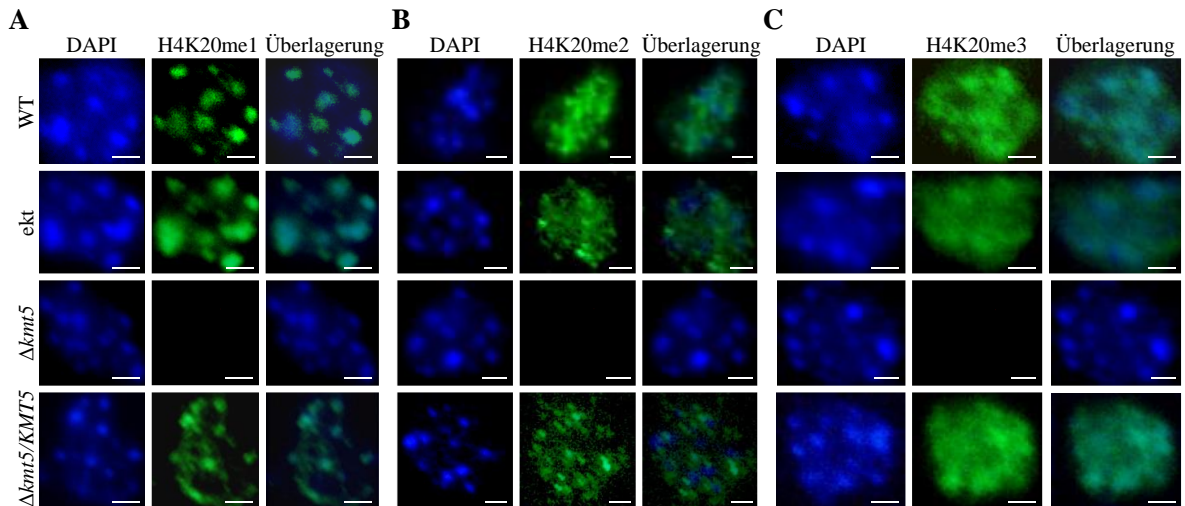
Zur Untersuchung der Bedeutung von Kmt5 für die Etablierung von H4K20-Mono-, Di-, und Trimethyl im Interphasekern der Konidien von *C. graminicola*, wurden immunzytologische Antikörperfärbungen mit dem Wildtyp, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskasette,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  durchgeführt. Die immunzytologischen Antikörperfärbungen zeigten, dass *KMT5* essentiell für die H4K20-Mono-, Di-, und Trimethylierung in *C. graminicola* ist. In den Konidien der Deletionsstämme  $\Delta kmt5$ , die keine Histon-H4K20-Methyltransferase exprimieren, konnte keine der drei Methylierungsstufen von H4K20 nachgewiesen werden (Abbildung 6). In den Konidien des Wildtyps, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskasette und  $\Delta kmt5/KMT5$  hingegen konnten alle drei Histon-H4K20-Methylierungsstufen nachgewiesen werden. H4K20me1 war in den heterochromatischen Chromozentren lokalisiert (Abbildung 6A). H4K20me2 und H4K20me3 zeigten eine Verteilung im Euchromatin (Abbildung 6B und C). Allerdings war für H4K20me3 eine Kolo-kalisierung im Heterochromatin nicht auszuschließen, da sich bei der Färbung ebenfalls Chromozentren abzeichneten (Abbildung 6C). Auch das Muster von H4K20me2 zeigte stärker gefärbte Stellen, die jedoch nicht mit den Chromozentren identisch waren. Um die Zellkerne zu identifizieren und zwischen Euchromatin und Heterochromatin differenzieren zu können, wurde die DNA mit DAPI gefärbt. Die DAPI-Färbung zeigte im Wildtyp, den komplementierten Isolaten und in der Deletionsmutante eine klare Abgrenzung der Chromozentren. Die Deletion von *KMT5* verursachte keine sichtbare Veränderung der Chromozentren im Zellkern.



### Abbildung 5: Zellspezifische Lokalisierung von Kmt5

(A)  $P_{gpd}::KMT5:eGFP$ -Reporterkonstrukt unter Kontrolle des konstitutiv exprimierten Promotors  $P_{gpd}$ , terminiert durch  $T_{nos}$ . Abgebildet sind die für die Southern Blot-Analyse verwendete Sonde sowie die *NcoI*-Restriktionsschnittstelle. (B) Southern Blot von Wildtyp und Isolaten mit Integration des  $P_{gpd}::KMT5:eGFP$ -Reporterkonstrukts. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden drei Isolate mit unterschiedlicher Anzahl integrierter  $P_{gpd}::KMT5:eGFP$ -Konstrukte, welche durch einen Stern (\*) markiert wurden, betrachtet. (C) Kernlokalisierung von Kmt5 in 14 Tage alten Konidien. Die Kernlokalisierung wurde durch DAPI-Färbung der DNA im Zellkern verifiziert. (D) Kmt5-Lokalisierung in primären Hyphen 36 hpi in infizierten Zwiebelepidermen. Maßstab = 10  $\mu$ m





**Abbildung 6: Lokalisierung der H4K20-Methylierung im Zellkern**

Immunzytologische Analyse der Interphasekerne von Konidien mit spezifischen Antikörpern gegen (A) Mono-, (B) Di- und (C) Trimethylierung von H4K20. Die DAPI-Färbung der DNA diente zur Identifikation der Zellkerne und zur Differenzierung zwischen Euchromatin und Heterochromatin. H4K20me1 = Antikörper gegen Monomethylierung von H4K20, H4K20me2 = Antikörper gegen Dimethylierung von H4K20, H4K20me3 = Antikörper gegen Trimethylierung von H4K20, Maßstab = 1  $\mu$ m

#### 4.6 Die Bedeutung von *KMT5* für die vegetative Entwicklung und die Bildung asexueller Sporen

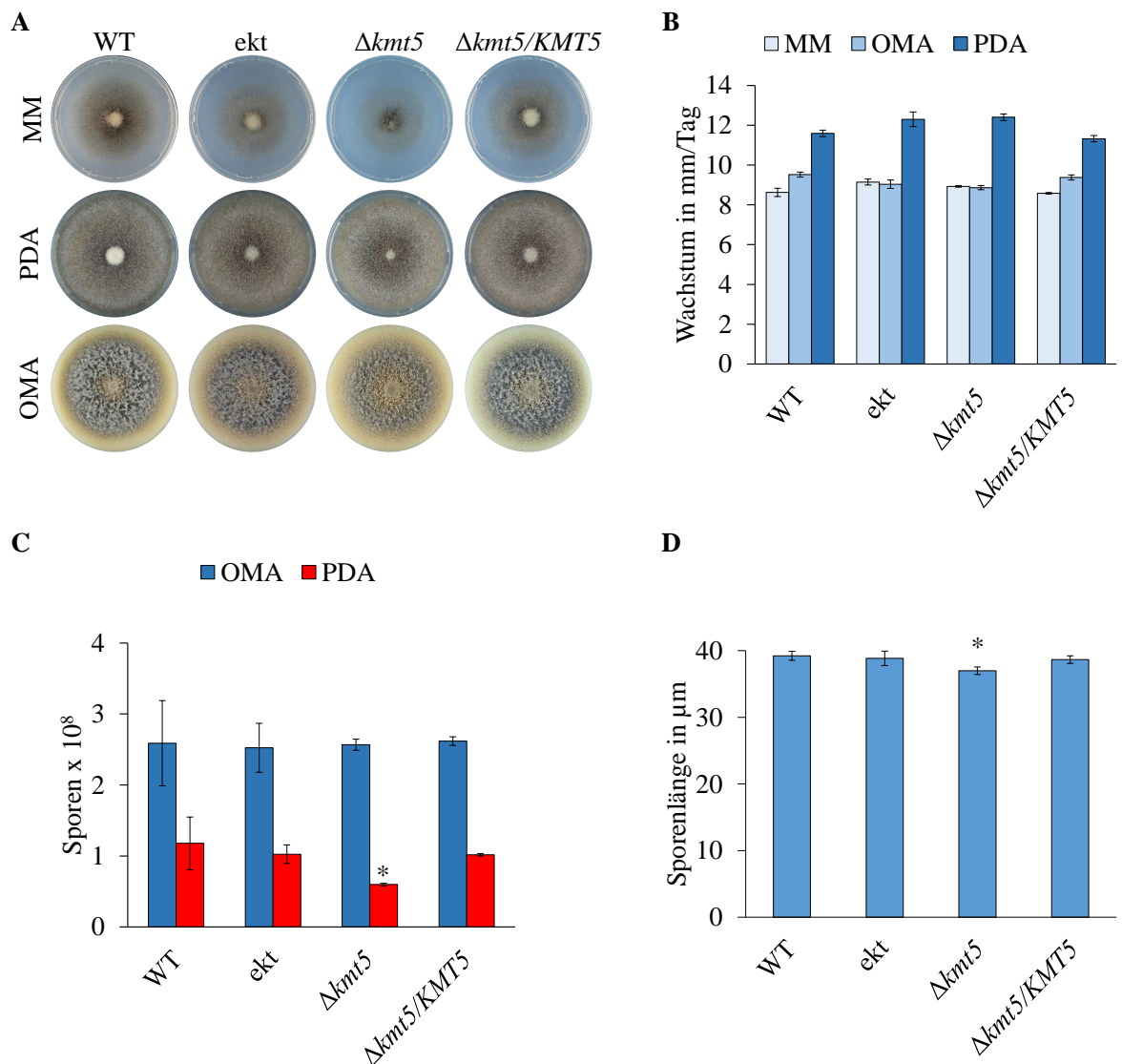
##### 4.6.1 Axenisches Wachstum und Sporulationsversuche

Um die Bedeutung von *KMT5* für das vegetative Wachstum von *C. graminicola* zu klären, wurden Wachstumsversuche auf Minimalmedium mit Zugabe von Glucose als einziger C-Quelle sowie auf den Kompletmediem OMA und PDA durchgeführt (Abbildung 7A). Es wurde der Wildtyp im Vergleich zur Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  untersucht. Vom dritten bis zum zehnten Tag wurden täglich die Durchmesser der Kolonien gemessen und das durchschnittliche tägliche Wachstum für den benannten Zeitraum ermittelt. Die ermittelten Wachstumsraten der Pilzisolat zeigten auf den drei getesteten Medien keine Unterschiede (Abbildung 7B). Auffällig war jedoch, dass die Deletionsmutanten weniger Luftmyzel als die restlichen Isolate bildeten, was besonders deutlich an der Inokulationsstelle in der Koloniemitte zu erkennen war (Abbildung 7A).

Zur Untersuchung der Bedeutung von *Kmt5* für das Vermögen asexuelle Sporen zu bilden, wurden Sporulationsassays auf OMA und PDA durchgeführt. Auf OMA bildeten alle Isolate eine nahezu identische Anzahl an Konidien. Demgegenüber war die Sporulation auf PDA durch die Deletion von *KMT5* beeinträchtigt (Abbildung 7C). Die Deletionsmutante bildete im Vergleich zum Wildtyp nur 50 % der Sporen. Die genetische Komplementation von  $\Delta kmt5$  stellte das Sporulationsvermögen wieder



vollständig her. Eine Vermessung der auf PDA gebildeten Sporen zeigte eine geringfügig reduzierte Länge der  $\Delta kmt5$ -Sporen im Vergleich zur Sporenlänge der anderen Isolate (Abbildung 7D).



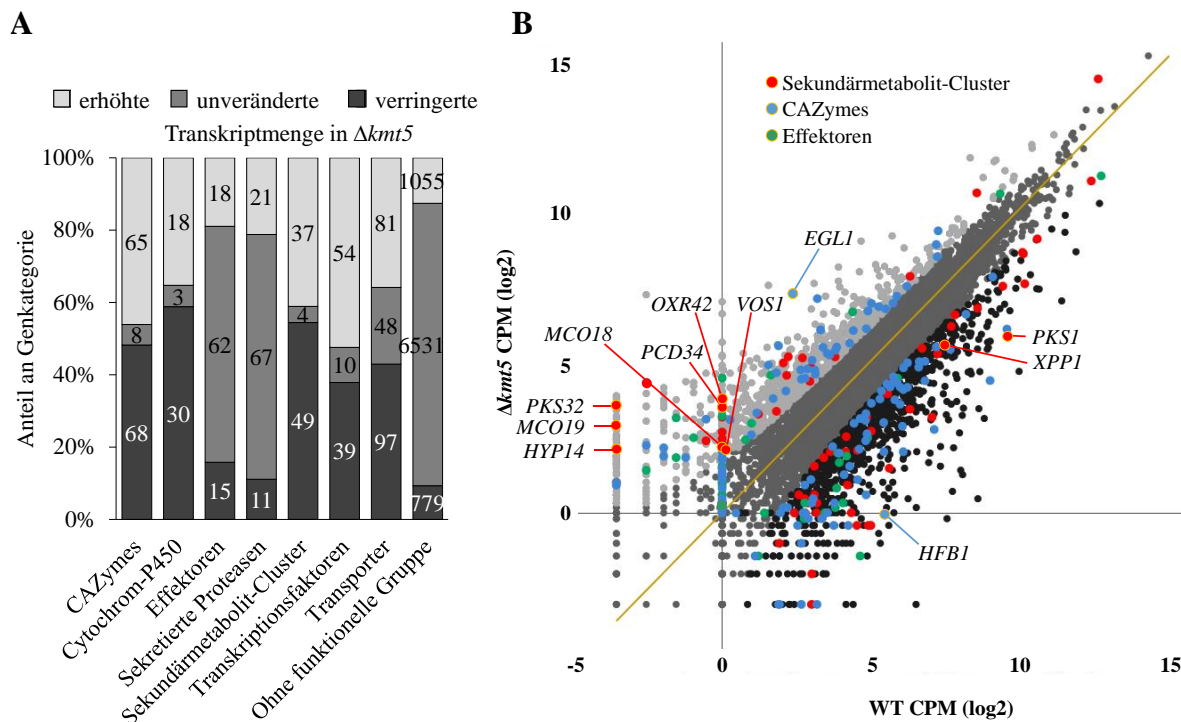
**Abbildung 7: Axenisches Wachstum und Sporulationsversuche**

(A) Phänotyp der axenischen Kolonien des Wildtyps (WT), der Transformante mit ektopischer Integration des Deletionskonstrukts (ekt), der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und des genetisch komplementierten Isolats  $\Delta kmt5/KMT5$  nach zehntägiger Kultivierung auf Minimalmedium mit Glucose (MM), Haferflockenagar (OMA) und Kartoffeldextroseagar (PDA). Besonders an der Inokulationsstelle in der Koloniemitte ist zu erkennen, dass  $\Delta kmt5$  weniger Luftmyzel als WT, ekt und  $\Delta kmt5/KMT5$  bildet. (B) Durchschnittliches tägliches Wachstum zwischen drei und zehn Tagen. (C) Sporenzahl von 14 Tage alten Kulturen auf OMA und PDA. (D) Längen von 14 Tage alten Sporen auf PDA (n = 8, T-Test, \* = p < 0,05).

#### 4.6.2 *KMT5* beeinflusst die Expression zahlreicher Gene in vegetativen Hyphen

Zur Identifizierung von Genen, die direkt oder indirekt durch Histon-H4K20-Methylierungen reguliert werden, wurden RNA-Seq-Analysen von vegetativen Hyphen des Wildtyps und der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  durchgeführt. Mittels RNA-Seq wurden Transkripte von 10440 verschiedenen Genen identifiziert. In vegetativen Hyphen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  wurden von 12006 proteinkodierenden Genen in *C. graminicola* (O'Connell *et al.*, 2012) 2418 Gene identifiziert, deren Transkriptmenge bei einer *false discovery rate* (FDR)  $\leq 0,05$  im Vergleich zu vegetativen Wildtyp-Hyphen verändert ist (Abbildung 8A). Dies entspricht 23,2 % der mittels RNA-Seq identifizierten transkribierten Gene in vegetativen Hyphen auf PDA. Die jeweils 250 Gene mit am meisten erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$  zeigten einen logarithmierten *fold change* (logFC) von 7,7 bis 13,2 bzw. -3,0 bis -11,7 (Tabelle 34). Die Deletion von *KMT5* führte zur Deregulation zahlreicher Transkriptionsfaktor-Gene, was wiederum zur veränderten Transkriptmenge anderer Gene aus den Kategorien CAZymes, Cytochrom-P450, Sekundärmetabolismus-Cluster und Transporter beitragen kann (Abbildung 8). Die Transkriptmengen eines Großteils der Gene aus den Kategorien Effektoren und Sekretierte Proteasen zeigten keine Veränderung nach der *KMT5*-Deletion (Abbildung 8). Besonders interessant ist, dass 133 CAZymes-Gene und 86 Sekundärmetabolit-Gene in vegetativen Hyphen dereguliert sind (Tabelle 35, Tabelle 36), da diese beiden Genkategorien eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielen.

Der *Scatter Plot* in Abbildung 8B zeigt die Transkriptmengen einzelner Gene in den vegetativen Hyphen in  $\Delta ktm5$  im Vergleich zum Wildtyp. Von besonderer Bedeutung unter den mutmaßlich durch *KMT5* kontrollierten Vertretern der CAZymes-Gene sind *EGL1*, das für eine GPI-verankerte Zellwand  $\beta$ -1,3-Endoglucanase kodiert, und *HFBI*, das für Hydrophobin 1 kodiert. Beide Gene spielen eine putative Rolle bei der Zusammensetzung der pilzlichen Zellwand (Liu und Free, 2016; Linder *et al.*, 2005; Abbildung 8B). Auch die deregulierten Transkriptionsfaktor-Gene *XPP1* und *VOS1* sind von besonderem Interesse, da sie den Sekundärmetabolismus und die pilzliche Entwicklung regulieren (Derntl *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015; Abbildung 8B).



**Abbildung 8: Mittels RNA-Seq ermittelte veränderte Transkriptmengen verschiedener Genkategorien in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen**

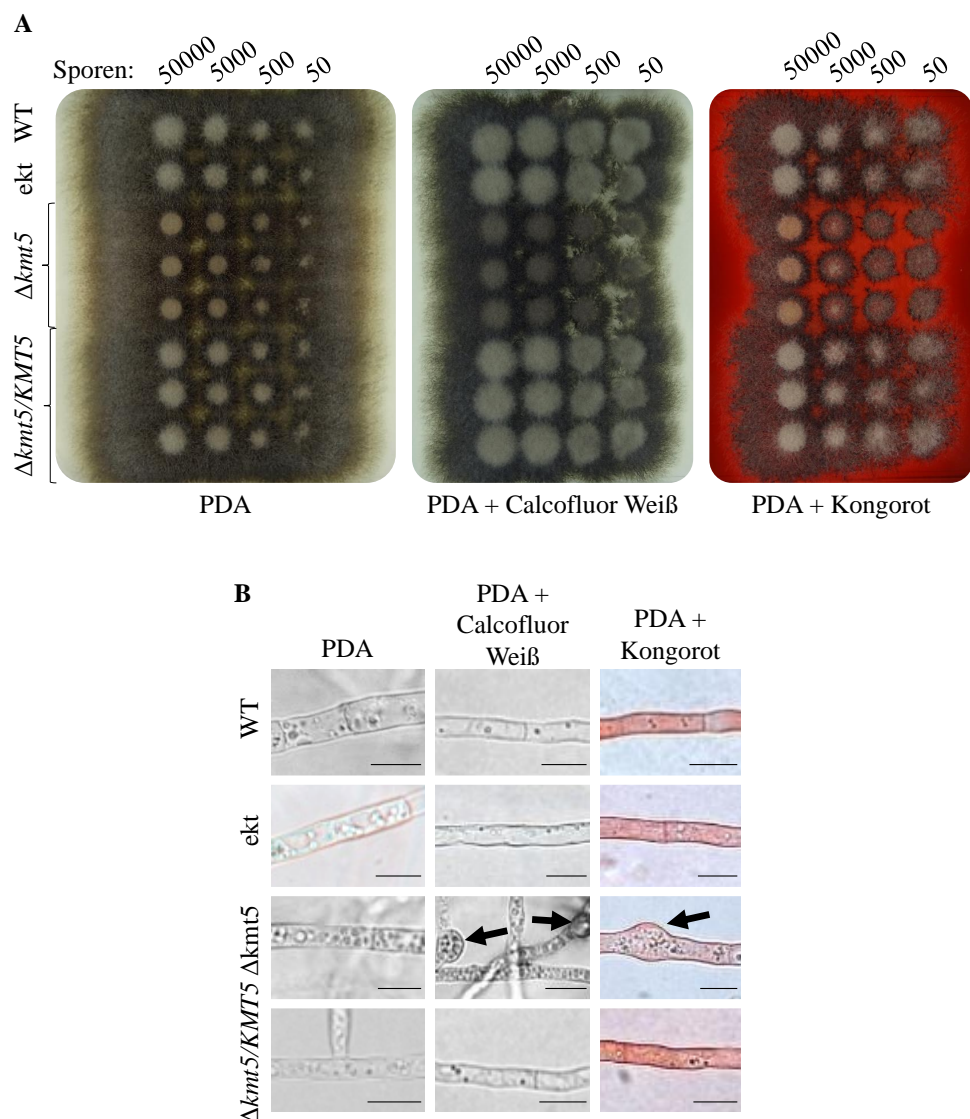
(A) Anzahl und prozentualer Anteil der Gene verschiedener Kategorien mit erhöhter (hellgrau), unveränderter (grau) oder verringerter (dunkelgrau) Transkriptmenge im vegetativen Myzel 7 dpi in der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp. Die Kategorisierung der Gene erfolgte nach O'Connell *et al.* (2012). Eine Transkriptmenge galt in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen als verringert oder erhöht im Vergleich zum Wildtyp-Myzel, wenn  $FDR \leq 0,05$ . (B) Vergleich der Transkriptabundanz in vegetativen Hyphen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und des Wildtyps (WT) 7 dpi. hellgrau = erhöhte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Myzel ( $FDR \leq 0,05$ ), grau = unveränderte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Myzel, dunkelgrau = verringerte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Myzel ( $FDR \leq 0,05$ ); die Transkriptmengen der Gene, die auch mittels RT-qPCR untersucht wurden, sind beschriftet: *MCO18* = Multicopper Oxidase (Cluster 18), *MCO19* = Multicopper Oxidase (Cluster 19), *OXR42* = Oxidoreductase, *PCD34* = *Phytanoyl-CoA dioxygenase*, *PKS1* = Polyketidsynthese 1, *PKS32* = Polyketidsynthese 32, *HYP14* = Hypothetisches Protein (Cluster 14), *VOS1* = Velvet, *XPPI* = *Xylanase promoter binding protein 1*, *EGL1* = GPI-verankerte Zellwand  $\beta$ -1,3-Endoglucanase, *HFB1* = Hydrophobin 1. Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq sowie die Erstellung des Säulendiagramms und des *Scatter Plots* wurden von Gunnar Hönig ausgeführt.

### 4.6.3 *KMT5* kontrolliert Zellwandintegrität und Sekundärmetabolismus vegetativer Hyphen

Die mittels RNA-Seq in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen ermittelten veränderten Transkriptmengen zahlreicher CAZymes-Gene, welche die pilzliche Zellwand modifizieren können (O'Connell *et al.*, 2012), deuten auf einen veränderten Zellwandaufbau hin. Zur Identifizierung von Zellwanddefekten in der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  wurde die Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot in einem von Ram und Klis (2006) beschriebenen Verfahren getestet. Durch die Bindung von Calcofluor Weiß an Chitin (Elorza *et al.*, 1983; Oliveira-Garcia und Deising, 2016b) und die Bindung von Kongorot an  $\beta$ -1,3-Glucan (Kopecká und Gabriel, 1992; Oliveira-Garcia und Deising, 2016b) verhindern sie die kovalente Verknüpfung von Chitin und  $\beta$ -Glucanen (Ram und Klis, 2006). Der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, drei unabhängige Deletionsmutanten sowie drei unabhängige genetisch komplementierte Isolate wurden auf PDA kultiviert, welches mit je 400  $\mu$ g/ml Calcofluor Weiß oder Kongorot versetzt wurde. Als Kontrolle diente PDA ohne Farbstoffzusatz. Wachstum und Morphologie des Wildtyps, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette und der drei genetisch komplementierten Isolate waren auf allen getesteten Medien vergleichbar (Abbildung 9A). Die Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  bildete auf PDA mit Calcofluor Weiß oder Kongorot kleinere Kolonien als der Wildtyp, wobei Kongorot einen besonders drastischen inhibitorischen Effekt auf die Koloniegröße von  $\Delta kmt5$  hatte (Abbildung 9A).

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Deletionsmutante auf Medium mit Farbstoffzusatz stark deformierte Hyphen bildete. Im Vergleich zum Wildtyp waren beträchtliche blasenförmige Verformungen der  $\Delta kmt5$ -Hyphen zu erkennen (Pfeile in Abbildung 9B). Die Hyphen der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette und der genetisch komplementierten Isolate zeigten auch mit Farbstoffzusatz die Hyphenmorphologie des Wildtyps (Abbildung 9B). Auf PDA ohne Farbstoffzusatz waren keine Unterschiede in den Koloniegrößen von  $\Delta kmt5$  und Wildtyp erkennbar (Abbildung 9A). Auch die mikroskopischen Untersuchungen der Hyphen auf PDA ohne Farbstoffzusatz zeigten keine Unterschiede in der Hyphenmorphologie zwischen den Isolaten (Abbildung 9B).

Um zu überprüfen, ob es aufgrund einer verzögerten Konidienkeimung zur Ausbildung kleinerer  $\Delta kmt5$ -Kolonien unter Farbstoffzusatz kam, wurden die verschiedenen Medien mit einer definierten Myzelmasse aus Flüssigkulturen inokuliert. Die Isolate auf den mit Myzel angeimpften Medien zeigten denselben Phänotyp wie auf den mit Sporen angeimpften Platten (Anhang IV, Abbildung 20). Der Wachstumsdefekt von  $\Delta kmt5$  war demnach nicht auf eine verzögerte Keimung der Konidien zurückzuführen.

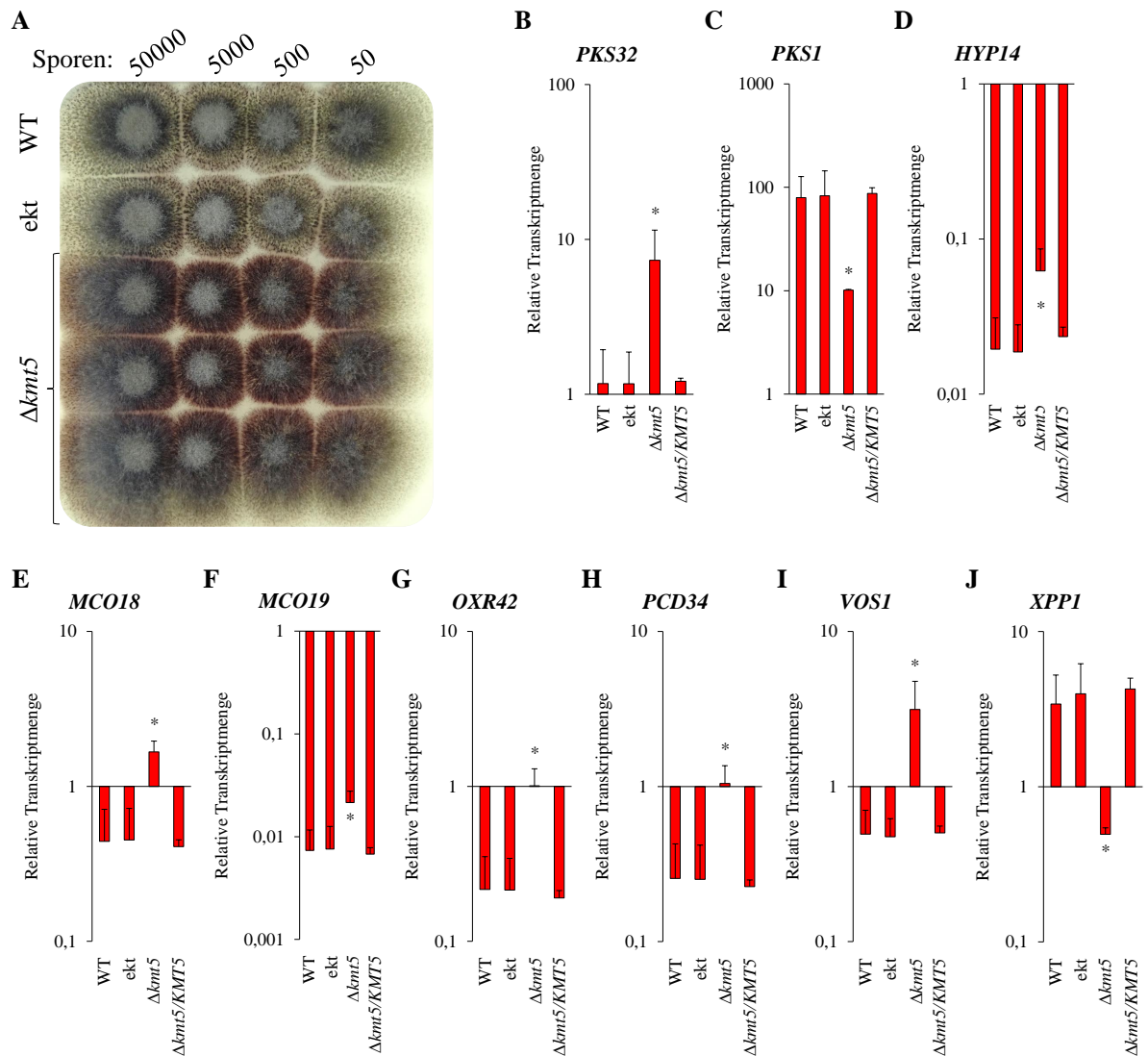


**Abbildung 9: Einfluss von Calcofluor Weiß und Kongorot auf das vegetative Wachstum**

(A) Phänotyp der Kolonien von Wildtyp (WT), Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), drei unabhängigen Deletionsmutanten ( $\Delta kmt5$ ) und drei unabhängigen genetisch komplementierten Isolaten ( $\Delta kmt5/KMT5$ ) auf PDA mit und ohne Calcofluor Weiß oder Kongorot nach sieben Tagen Kultivierung.

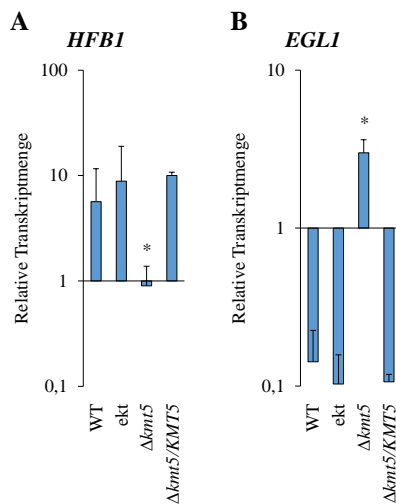
(B) Mikroskopische Untersuchung der Hyphenmorphologie von WT, ekt,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  auf PDA mit und ohne Calcofluor Weiß oder Kongorot. Pfeile markieren blasenförmige Veränderungen der Hyphen.

Maßstab = 10  $\mu\text{m}$



**Abbildung 10: Mittels RT-qPCR bestimmte relative Transkriptmengen von Sekundärmetabolit-Cluster-Genen in vegetativen Hyphen**

(A) Phänotyp der Kolonien von Wildtyp (WT), Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt) und drei unabhängigen Deletionsmutanten ( $\Delta kmt5$ ) nach sieben Tagen Kultivierung auf PDA. Die  $\Delta kmt5$ -Kolonien entwickeln aufgrund einer im Vergleich zum WT unterschiedlich regulierten Sekundärmetabolit-Biosynthese insbesondere an den Kontaktstellen zwischen den Kolonien eine rote Färbung. (B-J) Relative Transkriptmengen von Genen, die für den Sekundärmetabolismus von Bedeutung sind, in vegetativen Hyphen des Wildtyps (WT), der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und des genetisch komplementierten Isolats  $\Delta kmt5/KMT5$ . Diese beziehen sich auf die Transkriptkonzentration in Sporen des Wildtyps, welche im Wert gleich eins gesetzt wurden. Alle Werte wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *CgHiston H3* und *CgActin* normiert. (n = 3, T-Test, \* = p < 0,05). Die Skalierung der Ordinate erfolgte logarithmisch. *PKS32* = Polyketidsynthase 32, *PKS1* = Polyketidsynthase 1, *MCO18* = Multicopper Oxidase (Cluster 18), *MCO19* = Multicopper Oxidase (Cluster 19), *VOS1* = Velvet, *PCD34* = Phytanoyl-CoA dioxygenase, *OXR42* = Oxidoreductase, *XPP1* = Xylanase promoter binding protein 1



**Abbildung 11: Mittels RT-qPCR bestimmte relative Transkriptmengen von *HFB1* und *EGL1* in vegetativen Hyphen**

Relative Transkriptmengen von *HFB1* (A) und *EGL1* (B) in vegetativen Hyphen des Wildtyps (WT), der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und des genetisch komplementierten Isolats  $\Delta kmt5/KMT5$ . Diese beziehen sich auf die entsprechende Transkriptkonzentration in Sporen des Wildtyps, welche im Wert gleich eins gesetzt wurden. Alle Werte wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *CgHiston H3* und *CgActin* normiert (n = 3, T-Test, \* = p < 0,05). Die Skalierung der Ordinate erfolgte logarithmisch. *HFB1* = Hydrophobin 1, *EGL1* = GPI-verankerte Zellwand  $\beta$ -1,3-Endoglucanase

Das verzögerte Wachstum und die veränderte Hyphenmorphologie von  $\Delta kmt5$  unter dem Einfluss von Kongorot und Calcofluor Weiß deuten auf einen veränderten Zellwandaufbau von  $\Delta kmt5$  infolge einer geschwächten Zellwand aufgrund der Farbstoffanlagerung hin. Anhand von RNA-Seq wurden 141 exprimierte Gene der Kategorie CAZymes identifiziert, von denen 94 % eine veränderte Transkriptmenge in den vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen im Vergleich zu WT-Hyphen zeigten (Abbildung 8A). RT-qPCRs bestätigten für zwei Gene, welche bei Modifikationen der pilzlichen Zellwand eine Rolle spielen, veränderte Transkriptmengen in vegetativen Hyphen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 11A und B).

Wie bereits bei der axenischen Kultivierung beobachtet, bildete  $\Delta kmt5$  auch bei der Ko-Kultivierung mit anderen Stämmen weniger Luftmyzel als die anderen Pilzstämmen (Abbildung 7A und Abbildung 9A). Bemerkenswert ist, dass  $\Delta kmt5$  bei Ko-Kultivierung eine rote Färbung der Hyphen insbesondere an den Kontaktstellen zwischen den Kolonien entwickelte (Abbildung 9A, Abbildung 10A). Kolonieränder ohne Kontakt zu anderen Kolonien zeigte keine veränderte Pigmentierung. Die rote Färbung von  $\Delta kmt5$  deutet auf eine veränderte Sekundärmetabolit-Biosynthese hin. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurde mittels RNA-Seq in vegetativem Myzel für 86 Gene, was mehr als 95 % der identifizierten Sekundärmetabolit-Cluster-Gene entspricht, eine veränderte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Hyphen im Vergleich zu Wildtyp-Hyphen festgestellt (Abbildung 8A). Mittels RT-qPCR mit Wildtyp, Transformante mit ektopischer Integration der Deletionkassette,  $\Delta kmt5$



und  $\Delta kmt5/KMT5$  wurden für zwei Polyketidsynthase-Gene, zwei Multicopper Oxidase-Gene, ein *Phytanoyl-CoA dioxygenase*-Gen und ein Oxidoreductase-Gen abweichende Transkriptabundanzen in  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp bestätigt (Abbildung 10B-J). Von besonderer Bedeutung sind die deutlich deregulierten Transkriptionsfaktor-Gene *XPP1*, welches als Repressor des Sekundärmetabolismus agiert (Derntl *et al.*, 2017) und der Vertreter des Velvet-Komplexes *VOS1*, welcher die pilzliche Entwicklung und den Sekundärmetabolismus kontrolliert (Wang *et al.*, 2015). Als epigenetisch kontrollierte Regulatoren des Sekundärmetabolismus können diese beiden Transkriptionsfaktoren ebenfalls Einfluss auf die Expression der Sekundärmetabolit-Gene nehmen, was auch die hohe Anzahl an deregulierten Sekundärmetabolit-Cluster-Genen in  $\Delta kmt5$  erklären könnte.

Der Großteil der mittels RNA-Seq identifizierten Sekundärmetabolit-Cluster-Gene wird unterschiedlichen Clustern zugeordnet. Dies lässt vermuten, dass *KMT5* individuelle Sekundärmetabolit-Cluster-Gene und nicht ganze Cluster kontrolliert (Tabelle 36).

Die Untersuchungen der vegetativen Entwicklung des Wildtyps, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, der Deletionsmutante und des genetisch komplementierten Isolats zeigten, dass *KMT5* durch die Kontrolle der Expression zahlreicher CAZymes- und Sekundärmetabolit-Cluster-Gene das vegetative Wachstum von *C. graminicola* beeinflusst.

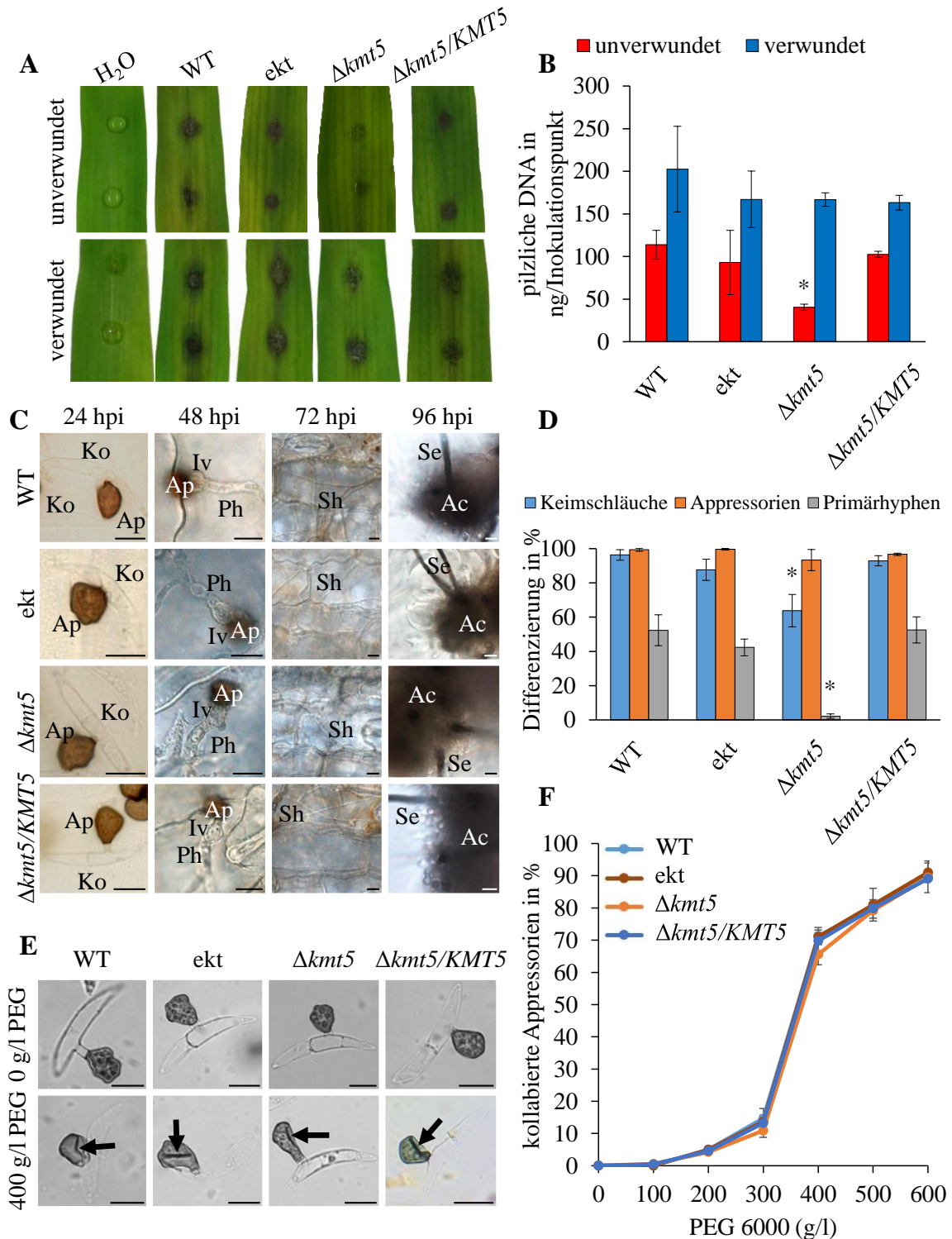
## 4.7 Die Bedeutung von *KMT5* für die pathogene Entwicklung

### 4.7.1 *KMT5* ist essentiell für die Virulenz

Infektionsassays verdeutlichten anschaulich die Bedeutung von *Kmt5* als essentiellen Faktor für die erfolgreiche Besiedlung intakter Maisblätter. Zur Untersuchung der Rolle von *KMT5* während der Pathogenese wurden intakte und verwundete Oberflächen von Maisblattsegmenten der Sorte Mikado mit 10  $\mu$ l Tropfen einer Suspension von  $10^6$  Sporen/ml inokuliert. Neben dem Wildtyp und drei unabhängigen Deletionsmutanten  $\Delta kmt5$ , wurden auch die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette und drei unabhängige genetisch komplementierte Isolate  $\Delta kmt5/KMT5$  getestet. Als Kontrolle dienten Blätter, die mit 0,02 % (v/v) Tween20 betropft wurden.

In Abbildung 12A ist die typische Ausprägung der Anthraknose-Symptome auf intakten Maisblättern vier Tage nach der Inokulation mit Wildtyp-Konidien deutlich sichtbar. Die mit  $\Delta kmt5$ -Konidien inokulierten unverwundeten Maisblätter dagegen zeigten deutlich reduzierte Anthraknose-Symptome (Abbildung 12A). Wurde die Blattoberfläche jedoch vor der Inokulation verwundet, so konnten keine Unterschiede zwischen Symptomen des Wildtyps und der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  erkannt werden (Abbildung 12A).





**Abbildung 12: Virulenztest, mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen und Zytorrhizie**

(A) Infektionsversuch mit dem Wildtyp (WT), der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und dem genetisch komplementierten Isolat  $\Delta kmt5/KMT5$  auf intakten und verwundeten Maisblättern 4 dpi. (B) Quantifizierung der pilzlichen Biomasse 4 dpi in unverwundeten und verwundeten Maisblättern mittels qPCR (n = 5, ANOVA, \* = p < 0,05). (C) Mikroskopische Aufnahmen von Infektionsstrukturen von WT, ekt,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  auf intakten Maisblättern zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion. Ko = Konidie, Ap = Appressorium, Iv = Infektionsvesikel,

Ph = Primärhyph, Sh = Sekundärhyph, Se = Seta, Ac = Acervulus, Maßstab = 10 µm (D) Quantifizierung von Infektionsstrukturen auf Mais (n = 300, T-Test, \* = p < 0,05). (E) Mikroskopische Aufnahmen von Appressorien auf Folien ohne und nach Zugabe von 400 g/l PEG 6000. Pfeile weisen auf kollabierte Appressorien. Maßstab = 10 µm (F) Anzahl kollabierter Appressorien von WT, *ekt*,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  auf Folie in PEG 6000-Konzentrationen von 0-600 g/l. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten ermittelt werden (n = 300, T-Test, p > 0,05).

Analysen mittels qPCR bestätigten die makroskopischen Beobachtungen der Symptom-Ausprägungen. Bei der Infektion intakter Maisblätter entwickelte  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant reduzierte DNA-Menge (Abbildung 12B). In verwundeten Blättern war jedoch die quantifizierte pilzliche Biomasse des Wildtyps und der Deletionsmutante gleich (Abbildung 12B). Mittels verwundeter Blattoberflächen kann der Pilz das Pflanzengewebe ohne Appressorien-vermittelte Penetration besiedeln. Da die Deletionsmutante das Wirtsgewebe verwundeter Blätter ähnlich effizient wie der Wildtyp besiedelt, kann eine Beeinträchtigung des invasiven Hyphenwachstums im Blattgewebe ausgeschlossen werden. Daher wird die reduzierte Virulenz von  $\Delta kmt5$  auf Maisblattsegmenten mit intakten Oberflächen auf einen Penetrationdefekt der Appressorien zurückgeführt.

Durch die Reintegration von *KMT5* in das Genom von *C. graminicola* konnte der ursprüngliche Phänotyp wiederhergestellt werden. Das genetisch komplementierte Isolat  $\Delta kmt5/KMT5$  verursachte auf intakten und verwundeten Maisblättern die gleiche Symptom-Ausprägung wie der Wildtyp (Abbildung 12A). Auch die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette verursachte typische Anthraknosen wie der Wildtyp. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Virulenzdefekt von  $\Delta kmt5$  einzig auf die Anwesenheit der Deletionskassette zurückzuführen ist. Die mit Hilfe von qPCR ermittelte pilzliche Biomasse der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette und  $\Delta kmt5/KMT5$  unterschieden sich quantitativ nicht von der des Wildtyps (Abbildung 12B).

#### 4.7.2 *KMT5* beeinflusst die Funktionalität von Appressorien

In Blattsegmenttests entwickelte  $\Delta kmt5$  auf intakten Maisblättern eine signifikant reduzierte Biomasse und abgeschwächte Anthraknose-Symptome im Vergleich mit den anderen getesteten Pilzstämmen (Abbildung 12A und B). Durch die mikroskopische Analyse der Infektionsstrukturen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Infektionsprozesses in infizierten Maisblättern sollte der Defekt identifiziert werden, der zur verringerten Virulenz von  $\Delta kmt5$  beiträgt. Des Weiteren sollten die Infektionsstrukturen auf morphologische Veränderungen untersucht werden (Abbildung 12C).

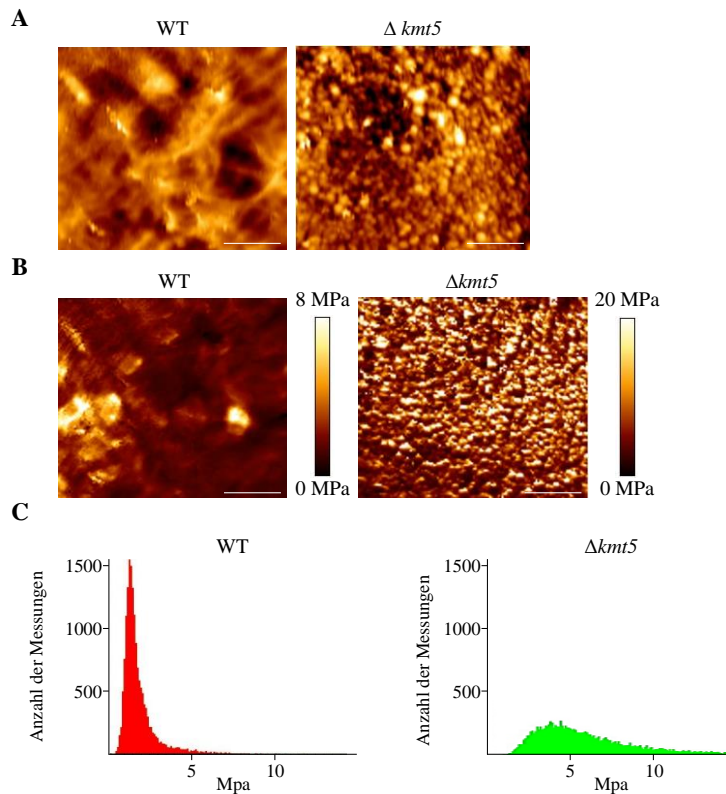
Maisblattsegmente mit intakter Oberfläche wurden mit Sporensuspensionen des Wildtyps, des Isolats mit ektopischer Integration der Deletionskassette, der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  sowie des genetisch komplementierten Isolats  $\Delta kmt5/KMT5$  inokuliert. Bis zum vierten Tag nach der Inokulation wurden täglich Proben geerntet und mikroskopiert (Abbildung 12C). Die einzelnen Stufen der Infektion wurden durch die Bildungsraten der jeweiligen Infektionsstrukturen charakterisiert (Abbildung 12D). Die Keimungs-, die Appressorienbildungs- und die Penetrationsrate wurden zwei Tage nach der

Inokulation bestimmt (Abbildung 12D). Der Anteil an Konidien, die auskeimten und einen Keimschlauch bildeten, war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den untersuchten Pilzisolaten. Die Anzahl an differenzierten Appressorien an den Keimschläuchen war für Wildtyp und  $\Delta kmt5$  nahezu identisch. Allerdings hatten zwei Tage nach der Inokulation bereits die Hälfte der Appressorien, die vom Wildtyp gebildet wurden, die Blattoberfläche penetriert und gut sichtbare Primärhyphen gebildet. Im extremen Gegensatz dazu waren zum selben Zeitpunkt nur 2,2 % der von  $\Delta kmt5$  differenzierten Appressorien in der Lage, die intakte Oberfläche des Maisblattes zu durchdringen und den Infektionsprozess fortzusetzen. Drei Tage nach der Inokulation waren die Pflanzenzellen, die vom Wildtyp infiziert wurden, von einer Vielzahl sekundärer Hyphen durchzogen. Der Pilz beendete seinen Entwicklungszyklus mit der Ausbildung von sporulierenden Acervuli auf der Blattoberfläche. In den äußerst seltenen Fällen, in denen der Deletionsmutante das Eindringen in die Wirtspflanze gelang, war sie ebenfalls in der Lage, den vollständigen Entwicklungszyklus zu durchlaufen (Anhang IX, Abbildung 22). Allerdings war eine deutlich schwächere Besiedlung des Blattgewebes im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten. Es wurden keinerlei morphologische Unterschiede zwischen den Infektionsstrukturen des Wildtyps und der Deletionsmutante festgestellt (Anhang IX, Abbildung 22).

Die genetische Komplementierung der Deletionsmutante führte zur vollständigen Wiederherstellung des Penetrationsvermögens der Appressorien (Abbildung 12C und D). Der Infektionsverlauf des Isolats mit ektopischer Integration der Deletionskassette wurde ebenfalls mikroskopisch untersucht. Hinsichtlich der Differenzierungsraten und der Morphologie der Infektionsstrukturen konnten keine Unterschiede zu denen des Wildtyps festgestellt werden (Abbildung 12C und D). Demnach wirkte sich die Integration des Deletionskonstrukts in das Genom von *C. graminicola* nicht auf die Differenzierung der Infektionsstrukturen aus und die Beeinträchtigung des Infektionsprozesses ist auf die Deletion von *KMT5* allein zurückzuführen.

Der in den Appressorien generierte Turgordruck ist essentiell für die Penetration der Pflanze (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). Um zu klären, ob der Verlust von *Kmt5* einen Einfluss auf den appressorialen Turgordruck hat, wurden Zytorrhizie-Experimente durchgeführt. Dazu wurden der Wildtyp, das Isolat mit ektopischer Integration der Deletionskassette,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  bis zur Appressorienbildung auf Polyesterfolien kultiviert und anschließend bei verschiedenen PEG 6000-Konzentrationen inkubiert (Abbildung 12E). Das osmotische Potential des Appressoriums wird durch die innerzelluläre Konzentration gelöster Moleküle bestimmt. Das PEG 6000 kann aufgrund seiner Teilchengröße nicht in die Appressorien eindringen (Ludwig *et al.*, 2014). Wasser hingegen passiert die semipermeable Zellmembran. Bei ausreichend großem extrazellulärem osmotischem Potential kollabiert das Appressorium aufgrund des Wasserverlustes. Mikroskopisch kann der Zellkollaps gut beobachtet werden, da eine dunkle Falte auf dem Appressorium zu erkennen ist (Abbildung 12E, Pfeile). Der externe osmotische Druck, bei dem 50 % der Appressorien kollabieren, entspricht dem Druck im Appressorium (Howard *et al.*, 1991). Die Anzahl kollabierter Appressorien stieg mit zunehmender PEG 6000-Konzentration (Abbildung 12F). Dabei konnten zwischen den

einzelnen Stämmen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die osmotischen Potentiale entsprachen nach Money (1989) 2,9 MPa für den Wildtyp und die Transformante mit ektopischer Integration des Deletionskonstrukts, 3 MPa für  $\Delta kmt5$  und 2,8 MPa für  $\Delta kmt5/KMT5$ . Die in Infektionsversuchen beobachteten Penetrationsdefekte sind somit nicht auf einen reduzierten Turgor in den Appressorien der Deletionsmutante zurückzuführen.

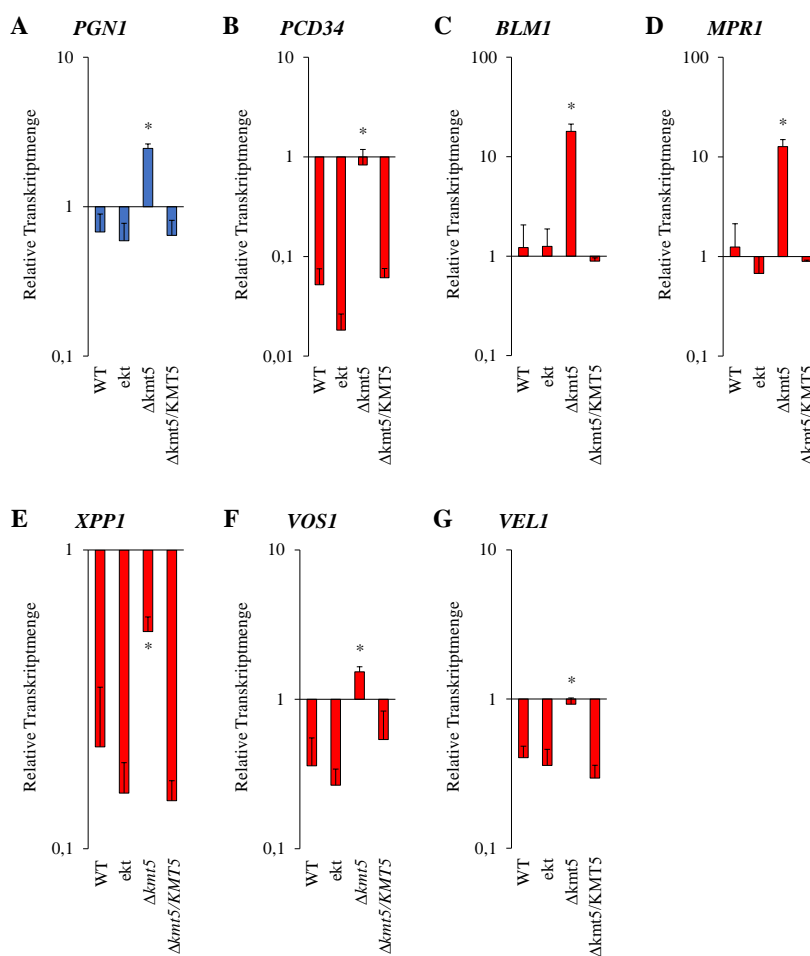


**Abbildung 13: Atomkraftmikroskopische Untersuchungen der Appressorien-Zellwand**

(A) Topographie und (B) Elastizitätsmodul (Youngscher Modul) der Oberfläche eines Wildtyp- und eines  $\Delta kmt5$ -Appressoriums. Maßstab = 500 nm (C) Anzahl der Messpunkte mit dem entsprechend verwendeten Druck zur Aufnahme des Elastizitätsmoduls ( $n = 4$ ). Die Aufnahme von topographischen Informationen und die Bestimmung der lokalen mechanischen Eigenschaften der Appressorienoberfläche wurden auf einer Fläche von  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  mit  $128 \times 128$  Messpunkten durchgeführt. Die Probenvorbereitung für die atomkraftmikroskopischen Untersuchungen wurde von Maximilian Groß durchgeführt. Die Durchführung der Atomkraftmikroskopie und die Erstellung der Bilder und Diagramme wurden von Dr.-Ing. Andreas Kiesow und Matthias Menzel vom Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS vorgenommen.

Wachstumsversuche mit Calcofluor Weiß und Kongorot deuteten auf Zellwanddefekte in den vegetativen Hyphen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  hin. Untersuchungen mit RNAi-Stämmen, deren Zellwand aufgrund einer gestörten  $\beta$ -Glucan- und GPI-Anker-Biosynthese geschwächt ist und welche unfähig sind, die Wirtszelle zu penetrieren, zeigten, dass eine intakte Zellwand für die Pathogenität von *C. graminicola* essentiell ist (Oliveira-Garcia und Deising, 2013; Oliveira-Garcia und Deising, 2016a; Oliveira-Garcia und Deising, 2016b). Um zu testen, ob der funktionelle Verlust der  $\Delta kmt5$ -Appressorien

auf veränderte mechanische oder strukturelle Eigenschaften der Appressorien-Zellwand zurückzuführen ist, wurde die Oberfläche von Wildtyp- und  $\Delta kmt5$ -Appressorien mittels Atomkraftmikroskopie (AFM) untersucht. Durch das Scannen der Appressorienoberfläche wurden signifikante Unterschiede zwischen den Appressorienzellwänden des Wildtyps und der Deletionsmutante sichtbar (Abbildung 13A). Die Oberfläche des Wildtyp-Appressoriums wies nur wenige großflächige Erhebungen und Vertiefungen auf, was der Oberfläche ein insgesamt glattes Erscheinungsbild verlieh. Die Oberfläche des  $\Delta kmt5$ -Appressoriums hingegen war uneben mit zahlreichen Erhebungen und Vertiefungen. Die Aufnahme von Elastizitätsmodulen zeigte, dass die Zellwände der  $\Delta kmt5$ -Appressorien deutlich weniger elastisch waren als die Zellwände der Wildtyp-Appressorien (Abbildung 13B und C). Die AFM-Untersuchungen weisen auf eine veränderte Zellwandzusammensetzung der  $\Delta kmt5$ -Appressorien hin.



**Abbildung 14: RT-qPCR in Appressorien 24 hpi auf Maisblättern**

Relative Transkriptmengen eines CAZymes-Gens (blau) und von Genen, die in die Sekundärmetabolit-Biosynthese involviert sind (rot) in Appressorien 24 hpi auf Maisblättern. Die relativen Transkriptmengen werden im Verhältnis zu der entsprechenden Transkriptmenge in Wildtyp-Konidien, deren Wert gleich eins gesetzt wurde, betrachtet. Alle Werte wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *CgHiston H3* und *CgActin* normiert (n = 3, T-Test, \* = p < 0,05). Die Skalierung der Ordinate erfolgte logarithmisch. *PGNI* = Endo-Polygalacturonase,

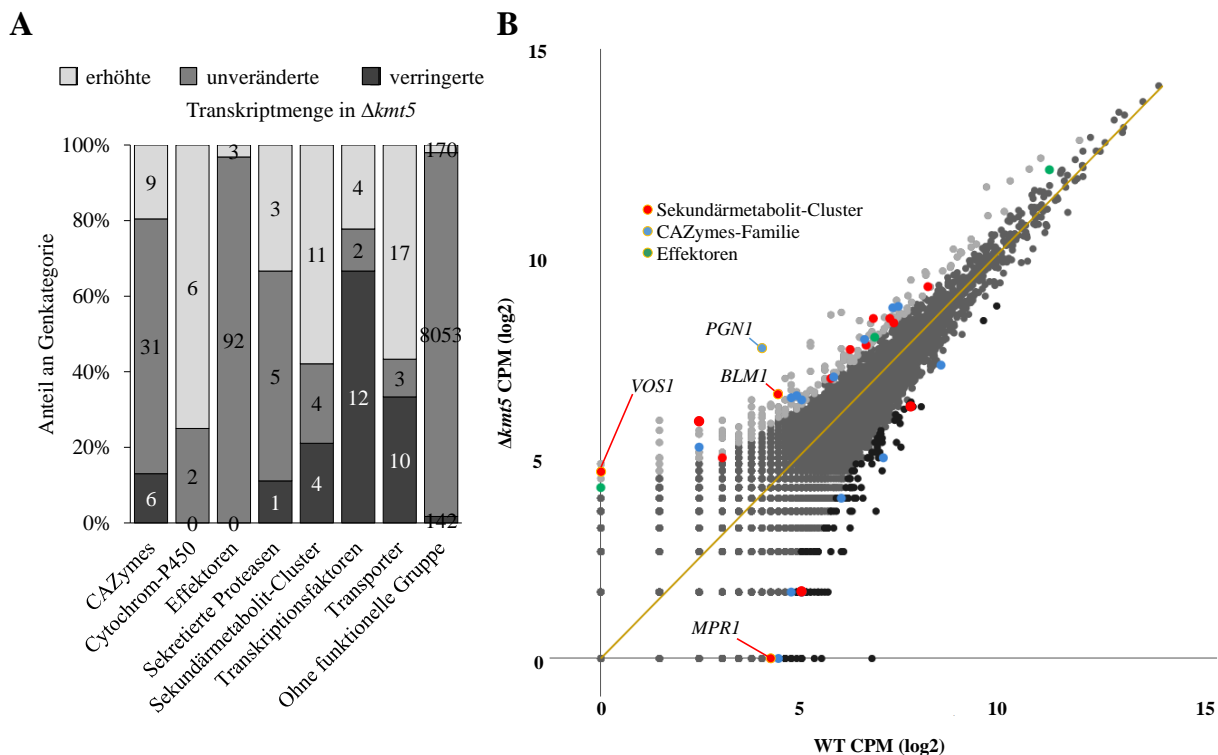
*PCD34* = *Phytanoyl-CoA dioxygenase*, *BML1* = Metallo- $\beta$ -Lactamase, *MPR1* = *High-affinity methionine permease*, *XPPI* = *Xylanase promoter binding protein 1*, *VOS1* = Velvet, *VEL1* = Velvet

Mittels RNA-Seq konnte in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen eine große Anzahl an signifikant deregulierten CAZymes-, Sekundärmetabolit-Cluster- und Transkriptionsfaktor-Genen festgestellt werden, welche eine Rolle für die Zellwandintegrität und Virulenz von *C. graminicola* spielen (Abbildung 8). Mit Hilfe von RT-qPCR in Wildtyp, Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette,  $\Delta kmt5$  und dem genetisch komplementierten Isolat  $\Delta kmt5/KMT5$  wurden in  $\Delta kmt5$ -Appressorien sechs signifikant deregulierte Gene, die eine Rolle bei der Sekundärmetabolit-Biosynthese spielen, identifiziert (Abbildung 14B-G). Neben den Genen *VEL1*, *VOS1* und *XPPI*, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, wurden für das *Phytanoyl-CoA dioxygenase*-Gen *PCD34*, das Metallo- $\beta$ -Lactamase-Gen *BML1* und das *High-affinity methionine permease*-Gen *MPR1* infolge der *KMT5*-Deletion in den Appressorien signifikant erhöhte Transkriptmengen ermittelt. Auch die Transkriptmenge des Endo-Polygalacturonase-Gens *PGN1* ist in  $\Delta kmt5$ -Appressorien im Vergleich zu den anderen untersuchten Pilzisolaten signifikant erhöht (Abbildung 14A). Die Endo-Polygalacturonase dient dem Abbau der pflanzlichen Zellwand und kann somit eine Rolle bei der Penetration der Wirtszelle spielen (Bergstrom und Nicholson 1999).

#### 4.7.3 *KMT5* spielt keine Schlüsselrolle bei der Genexpression in Infektionshyphen

Während des Infektionsprozesses werden beim Übergang vom Wachstum auf der Wirtsoberfläche zum invasiven biotrophen und nekrotrophen Wachstum zahlreiche Gene in *C. graminicola* differentiell exprimiert (O'Connell *et al.*, 2012). Um die Rolle von *KMT5* bei der Koordination der stadienspezifischen Genexpression zu untersuchen, wurden transkriptomweite RNA-Sequenzierungen in dem Wildtyp und der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  in Sporen 0 hpi auf und 72 hpi in Maisblattsegmenten durchgeführt. Im Vergleich zu der hohen Anzahl an deregulierten Genen in vegetativen Hyphen von  $\Delta kmt5$  wurden lediglich 394 Gene in Sporen und 332 Gene in den Infektionshyphen von  $\Delta kmt5$  mit im Vergleich zum Wildtyp veränderter Transkriptmenge identifiziert (Abbildung 15A, Abbildung 16A). Auffallend ist auch die geringe Anzahl deregulierter CAZymes-Gene. In Sporen wurden die Transkriptmengen von lediglich 15 der insgesamt 46 detektierten CAZymes-Gene infolge der *KMT5*-Deletion verändert. In den Infektionshyphen wurden die Transkriptmengen von nur 9 der insgesamt 172 detektierten CAZymes-Gene durch den *KMT5*-Verlust verändert. Auch die Anzahl an deregulierten Sekundärmetabolit-Cluster- und Effektor-Genen war in den Sporen und Infektionshyphen unerwartet gering (Abbildung 15A). In Sporen und Infektionshyphen wird, verglichen mit den Transkriptmengen in vegetativen Hyphen, die Expression einer geringeren Anzahl Gene durch die *KMT5* beeinflusst. Die RNA-Seq-Daten von Infektionshyphen 72 hpi stehen in Übereinstimmung mit den Blattsegmentassays verwundeter Blätter. Da *KMT5* eine unwesentliche Rolle bei der

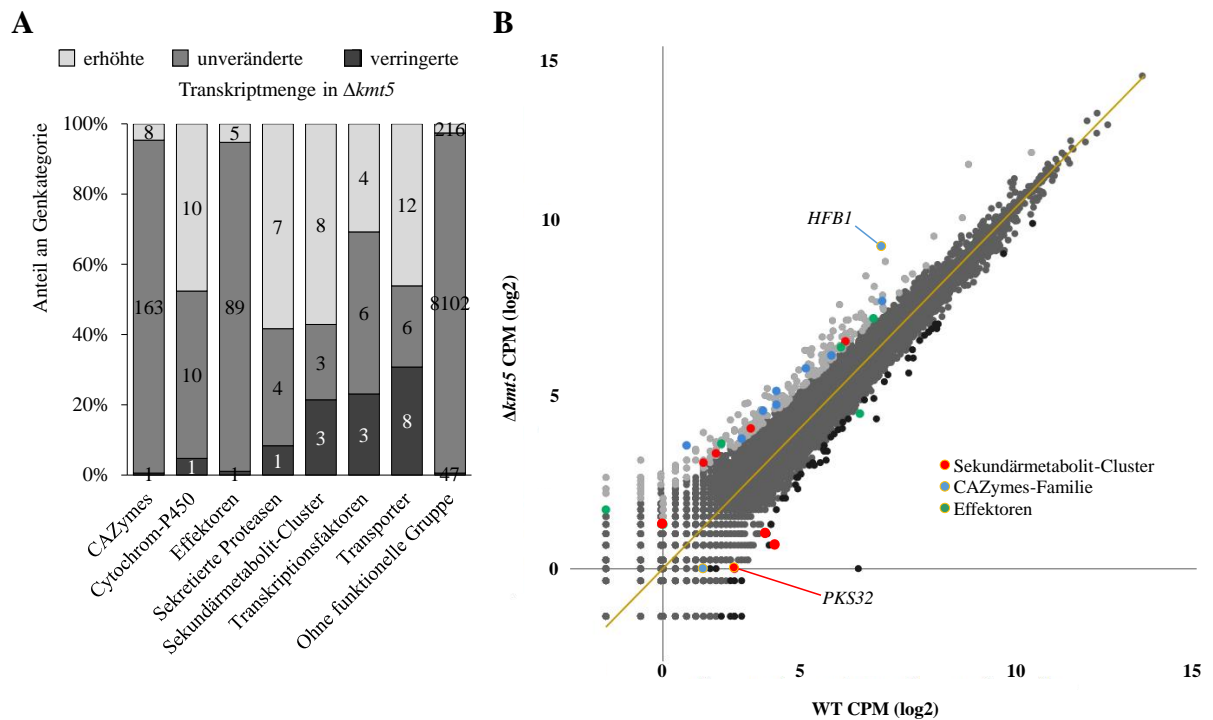
Ausbildung invasiver Infektionshyphen zu spielen scheint, zeigte  $\Delta kmt5$  keinerlei Beeinflussung des invasiven Wachstums und erzeugte Wildtyp-ähnliche Symptome.



**Abbildung 15: RNA-Seq-Untersuchungen von Sporen**

(A) Anzahl der Gene mit erhöhter, unveränderter und verringerter Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Sporen im Vergleich zu Wildtyp-Sporen 0 hpi auf Maisblättern und deren Anteil an der entsprechenden Genkategorie. Die Kategorisierung Gene erfolgte nach O'Connell *et al.* (2012). Eine Transkriptmenge galt in  $\Delta kmt5$ -Sporen als verringert oder erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Sporen, wenn  $p \leq 0,05$ . (B) Vergleich der Transkriptmengen in  $\Delta kmt5$ -Sporen und Wildtyp-Sporen 0 hpi auf Maisblättern. hellgrau = erhöhte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Sporen ( $p \leq 0,05$ ), grau = unveränderte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Sporen, dunkelgrau = verringerte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Sporen ( $p \leq 0,05$ ); *BLM1* = Metallo- $\beta$ -Lactamase, *MPR1* = *High-affinity methionine permease*, *PGN1* = Endo-Polygalacturonase, *VOS1* = Velvet; die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq sowie die Erstellung des Säulendiagramms und des *Scatter Plots* wurden von Gunnar Hönig ausgeführt.





**Abbildung 16: RNA-Seq-Untersuchungen von nekrotrophen Hyphen**

(A) Anzahl der Gene mit erhöhter, unveränderter und verringerter Transkriptmenge in nekrotrophen  $\Delta kmt5$ -Hyphen im Vergleich zu nekrotrophen Wildtyp-Hyphen 72 hpi in Maisblättern und deren Anteil an der entsprechenden Genkategorie. Die Kategorisierung der Gene erfolgte nach O'Connell *et al.* (2012). Eine Transkriptmenge galt in nekrotrophen  $\Delta kmt5$ -Hyphen als verringert oder erhöht im Vergleich zu nekrotrophen Wildtyp-Hyphen, wenn  $p \leq 0,05$ . (B) Vergleich der Transkriptmengen in nekrotrophen  $\Delta kmt5$ -Hyphen im Vergleich zu nekrotrophen Wildtyp-Hyphen 72 hpi in Maisblättern. hellgrau = erhöhte Transkriptmenge in nekrotrophen  $\Delta kmt5$ -Hyphen ( $p \leq 0,05$ ), grau = unveränderte Transkriptmenge in nekrotrophen  $\Delta kmt5$ -Hyphen, dunkelgrau = verringerte Transkriptmenge in nekrotrophen  $\Delta kmt5$ -Hyphen ( $p \leq 0,05$ ); *HFB1* = Hydrophobin 1, *PKS32* = Polyketidsynthase 32; die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq sowie die Erstellung des Säulendiagramms und des *Scatter Plots* wurden von Gunnar Hönig ausgeführt.

#### 4.7.4 $\Delta kmt5$ eliciert keine verstärkte pflanzliche Abwehr

Wachstumsversuche auf PDA mit Calcofluor Weiß und Kongorot sowie Transkriptanalysen wiesen darauf hin, dass die *KMT5*-Deletion zu einer Veränderung der Zellwandzusammensetzung vegetativer Hyphen geführt hat. Atomkraftmikroskopische Untersuchungen verdeutlichten, dass auch die Apressorienzellwände von  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp unterschiedliche Eigenschaften aufwiesen. Die Polysaccharide der pilzlichen Zellwand spielen eine bedeutende Rolle bei der Erkennung des Pathogens durch die Pflanze (Boller und Felix, 2009). Sie dienen als sogenannte PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), welche durch PRRs (*pattern recognition receptors*) erkannt werden (Nürnberg *et al.*, 2004; Altenbach und Robatzek, 2007; Zipfel, 2009; Boller und Felix, 2009; Ryan und Farmer, 1991). Die angeborene Immunantwort wird umgehend oder innerhalb einiger Stunden nach der Erkennung von PAMPs ausgelöst (Conrath *et al.*, 2006). Auch Moleküle beschädigter



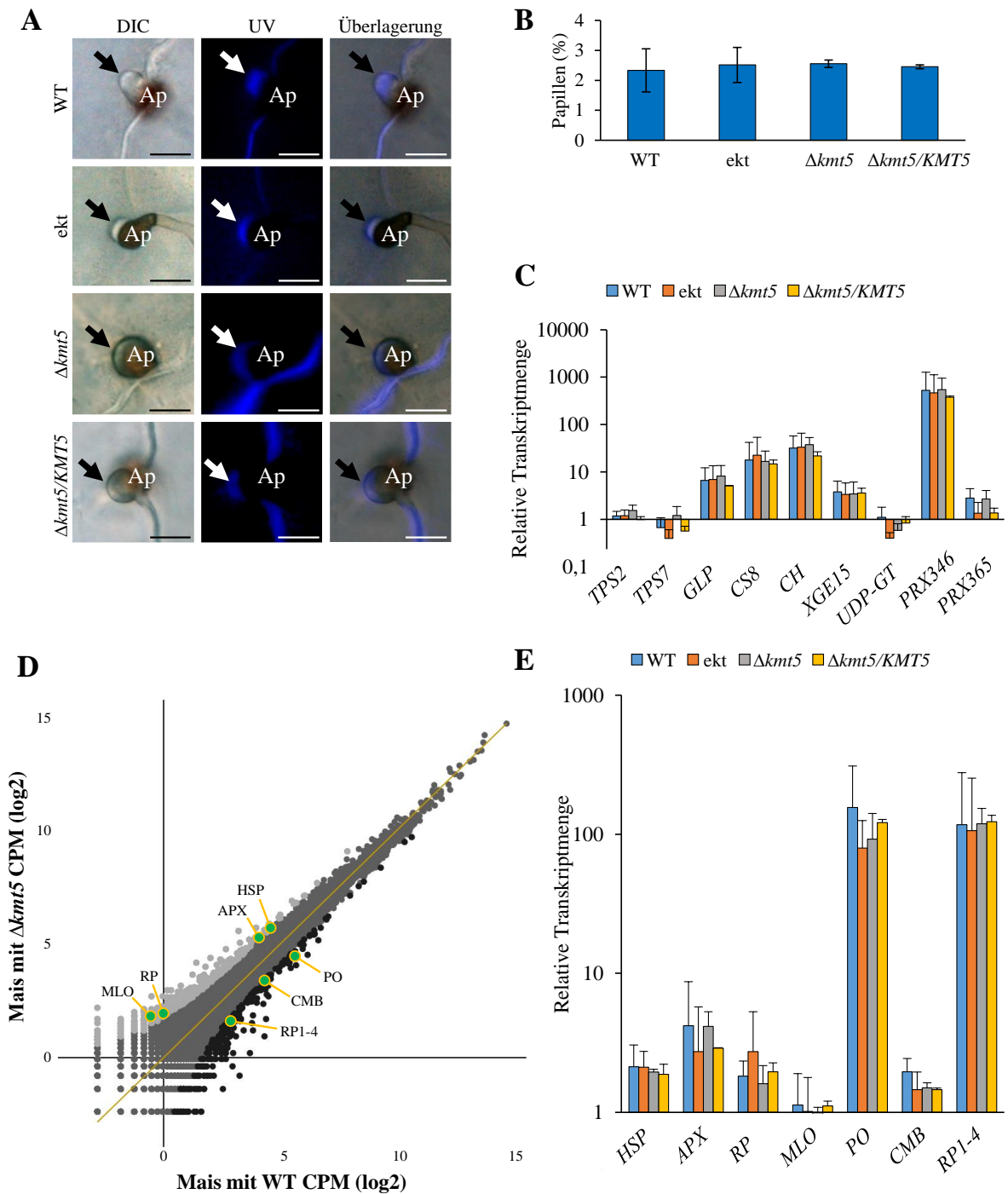
Wirtszellen, sogenannte DAMPs (*damage-associated molecular pattern*), welche für die Rezeptoren normalerweise nicht erreichbar sind, können von der Pflanze erkannt werden (Boller und Felix 2009). In Appressorien der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  wurde mittels RT-qPCR eine signifikant erhöhte Transkriptmenge des Endo-Polygalacturonase-Gens *PGNI* ermittelt. Polygalacturonasen spielen eine Rolle beim Abbau der Maiszellwand (Bergstrom und Nicholson 1999). Somit können sie zum Auslösen der pflanzlichen Abwehrreaktion durch die Freisetzung von DAMPs beitragen.

Um herauszufinden, ob die Maisblattinfektion durch  $\Delta kmt5$  eine verstärkte pflanzliche Abwehr aufgrund einer verstärkten PAMP-Exposition oder vermehrten DAMP-Freisetzung hervorruft, welche die Deletionsmutante an der Ausbildung einer Penetrationshyphse hindert, wurden mikroskopische Untersuchungen und Transkriptanalysen durchgeführt.

Eine der ersten sichtbaren nicht-spezifischen, generellen Abwehrreaktionen von *Poaceae* (Süßgräsern) auf eine versuchte Penetration durch einen Pilz ist die Bildung von Papillen in der äußeren Wand der epidermalen Zellen zwischen der Plasmalemma und der Zellwand unter dem Appressorium (Cadena-Gomez und Nicholson, 1987; Bergstrom und Nicholson, 1999; Mims und Vaillancourt, 2002). Um das Eindringen des Pilzes erfolgreich zu verhindern, ist entscheidend, dass die Papillen frühzeitig gebildet werden. Bereits 24 Stunden nach der Inokulation sind Papillen zu erkennen (Mims und Vaillancourt, 2002; Abbildung 17A, Pfeile). In den Papillen und in der umgebenden Zellwand konnten Callose, Phenole und Lignin nachgewiesen werden (Cadena-Gomez und Nicholson, 1987; Mims und Vaillancourt, 2002). Wie in Abbildung 17A zu erkennen, können Papillen aufgrund ihrer Autofluoreszenz unter UV-Licht leicht detektiert werden (Hückelhoven *et al.*, 1999).

Die Quantifizierung der Papillen unter den Appressorien des Wildtyps, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und des genetisch komplementierten Isolats  $\Delta kmt5/KMT5$  24 hpi in Maisblättern ergab für alle Pilzstämme eine sehr geringe Papillenbildungsrate von durchschnittlich 2,5 % (Abbildung 17B).

Eine ebenfalls sehr schnelle Abwehrreaktion der Pflanze ist der *oxidative burst* (Torres *et al.*, 2006; Boller und Felix, 2009). Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kann zur Abtötung des Schaderregers führen oder aufgrund ihrer zell- bzw. membranschädigenden Wirkung zum Absterben der Wirtszelle, zur sogenannten hypersensitiven Reaktion, führen (Boller und Felix, 2009). Die abgestorbene Pflanzenzelle ist unter UV-Bestrahlung aufgrund ihrer Autofluoreszenz deutlich von anderen Zellen des Gewebes zu unterscheiden (Hückelhoven *et al.*, 1999). In keinem der in dieser Arbeit untersuchten Blätter konnten Anzeichen für eine hypersensitive Reaktion gefunden werden. Wachstumsversuche auf PDA, welchem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Bengalrosa, das unter Lichteinwirkung Superoxidradikale bildet, zugesetzt wurden, zeigten, dass  $\Delta kmt5$  im gleichen Maße anfällig auf oxidativen Stress reagiert wie die weiteren Pilzisolat (Anhang X, Abbildung 23).



**Abbildung 17: Untersuchung der Papillenbildung und der Transkriptmengen pflanzlicher Abwehrgene**

(A) Papillen, die bereits 24 hpi unter den Appressorien (Ap) gebildet wurden, leuchten aufgrund ihrer Autofluoreszenz unter UV-Licht. Papillen sind mit einem Pfeil markiert. Im Durchlichtbild erscheinen Papillen als helle Strukturen unter den Appressorien (Ap). Maßstab = 10  $\mu$ m (B) Auszählung von Papillen in Maisblättern (Mikado) 24 hpi, die mit dem Wildtyp (WT), der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt),  $\Delta kmt5$  oder  $\Delta kmt5/KMT5$  inokuliert wurden. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Papillenbildung zwischen den Isolaten ermittelt werden (n = 300, T-Test, p > 0,05). (C) Die relativen Transkriptmengen von Abwehrgenen der Maispflanze 36 hpi in mit Wildtyp (WT), Transformante mit ektopischer Integration der Deletionkassette (ekt),  $\Delta kmt5$  oder  $\Delta kmt5/KMT5$  infizierten Blättern wurden im Verhältnis zu der

entsprechenden Transkriptmenge der Wasserkontrolle 36 hpi, deren Wert gleich eins gesetzt wurde, betrachtet. Alle Werte wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *ZmH2B* (Histon H2B) und *ZmTubG* ( $\gamma$ -Tubulin 1) normiert ( $n = 3$ , T-Test,  $p > 0,05$ ). Die Skalierung der Ordinate erfolgte logarithmisch. *TPS2* = Terpensynthase 2, *TPS7* = Terpensynthase 7, *GLP* = *Germin-like protein*, *CS8* = Cellulosesynthase 8, *CH* = Chitinase, *XGE* = Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 15, *UDP-GT* = UDP-Glycosyltransferase 74B1, *PRX346* = Peroxidase 1, *PRX365* = Peroxidase 2 (D) Vergleich der mittels transkriptomweiter RNA-Seq ermittelten Transkriptabundanzen in mit  $\Delta kmt5$  und mit Wildtyp (WT) infizierten Maisblättern 72 hpi. Die grünen Datenpunkte zeigen Gene, die in der pflanzlichen Abwehrreaktion von Bedeutung sein könnten und deren Transkriptmengen zusätzlich mittels RT-qPCR bestimmt wurden. Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq sowie die Erstellung des *Scatter Plots* wurden von Gunnar Hönig ausgeführt. hellgrau = erhöhte Transkriptmenge in mit  $\Delta kmt5$  infizierten Maisblättern ( $p \leq 0,05$ ), grau = unveränderte Transkriptmenge in mit  $\Delta kmt5$  infizierten Maisblättern, dunkelgrau = verringerte Transkriptmenge in mit  $\Delta kmt5$  infizierten Maisblättern ( $p \leq 0,05$ ); (E) Die relativen Transkriptmengen von putativen Abwehrgenen der Maispflanze 72 hpi in mit Wildtyp (WT), Transformante mit ektopischer Integration der Deletionkassette (ekt),  $\Delta kmt5$  oder  $\Delta kmt5/KMT5$  infizierten Blättern wurden im Verhältnis zu der entsprechenden Transkriptmenge der Wasserkontrolle 72 hpi, deren Wert gleich eins gesetzt wurde, betrachtet. Alle Werte wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *ZmH2B* (Histon H2B) und *ZmTubG* ( $\gamma$ -Tubulin 1) normiert ( $n = 3$ , T-Test,  $p > 0,05$ ). Die Skalierung der Ordinate erfolgte logarithmisch. *HSP* = *Heat shock protein 82*, *APX* = *Ascorbate peroxidase*, *RP* = *Ribosomal protein L35A*, *MLO* = *MLO-like protein*, *PO* = *Peroxidase*, *CMB* = *Calmodulin binding protein*, *RP1-4* = *Rust resistance-like protein*

Neben der zytologischen Untersuchung der pflanzlichen Abwehrreaktionen wurde mittels genomweiter RNA-Sequenzierung und RT-qPCR die pflanzliche Abwehr in Maisblättern, welche mit dem Wildtyp und mit  $\Delta kmt5$  infiziert waren, auf Transkriptebene untersucht. Aus den Arbeiten von Oliveira-Garcia und Deising (2013) und Albarouki *et al.* (2014) sind bereits Abwehrgene von *Zea mays* bekannt, welche während der *PAMP triggered immunity* (PTI) aktiviert werden, sobald *C. graminicola* biotrophe Hyphen etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die relativen Transkriptabundanzen einiger Kandidaten der bereits untersuchten Abwehrgene in der biotrophen Phase der Infektion analysiert. Neben Genen, die für PR-Proteine wie Chitinase (*CH*) und *Germin-like protein* (*GLP*) kodieren, wurden die Transkriptmengen von fünf Genen, deren Proteine eine Rolle bei der Modifizierung der pflanzlichen Zellwand spielen (*CS8*, *XGE*, *UDP-GT*, *PRX346* und *PRX365*), und zwei Terpensynthase-Genen (*TPS2* und *TPS7*), die möglicherweise in die Phytoalexin-Synthese involviert sind, bestimmt (Oliveira-Garcia und Deising, 2013). Die erhobenen RT-qPCR-Daten in Maisblättern infiziert mit dem Wildtyp, der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  zeigten keine signifikanten Unterschiede in den relativen Transkriptabundanzen der Gene, die für PR-Proteine kodieren (Abbildung 17C).

Um pflanzliche Abwehrgene während des Wechsels von *C. graminicola* von der biotrophen zur nekrotrophen Phase zu identifizieren, wurden 72 hpi in infizierten Maisblättern RNA-Seq-Analysen durchgeführt. Es wurden sieben putative Abwehrgene identifiziert, deren Transkriptmengen in mit  $\Delta kmt5$  infizierten Maisblättern allerdings nur leicht verändert waren (Abbildung 17D; Anhang XII,

Tabelle 38). Mittels RT-qPCR konnten keine signifikanten Unterschiede in den relativen Transkriptabundanz der ausgewählten Maisgene ermittelt werden (Abbildung 17E).

Die Untersuchungen der pflanzlichen Abwehr zeigen, dass die  $\Delta kmt5$ -Mutanten im Vergleich zum Wildtyp während des Infektionsverlaufs keine verstärkte Pflanzenabwehrreaktion elicitieren bzw. diese auch nicht effektiver unterdrücken. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass  $\Delta kmt5$  auf Maisblättern mit verwundeter Oberfläche Wildtyp-ähnliche Symptome erzeugen kann.

## 5 Diskussion

Die vegetative und pathogene pilzliche Entwicklung mit der Etablierung vegetativer Hyphen und stadienspezifischer, hochspezialisierter Infektionsstrukturen sowie unterschiedliche Ernährungs- und Lebensweisen unterliegen einer dynamischen Regulation der Genexpression. Untersuchungen von O'Connell *et al.* (2012) zeigten, dass in *C. graminicola* im Verlauf der Infektion 2619 Gene differentiell exprimiert werden. Bisher ist wenig über die Regulationsmechanismen der stadienspezifischen Genexpression in *C. graminicola* bekannt.

Aus Studien in phytopathogenen Pilzen wie z.B. *M. oryzae*, *F. graminearum*, *L. maculans*, *Cochliobolus carbonum* und *Ustilago maydis* sowie den Ascomyceten *S. pombe* und *N. crassa* ist bekannt, dass epigenetische Faktoren essentiell für die Ausbildung vegetativer Pilzstrukturen und den Infektionsverlauf sind (Izawa *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010; Baidyaroy *et al.*, 2001; Reichmann *et al.*, 2002; Torreblanca *et al.*, 2003; Soyer *et al.*, 2014; Freitag, 2017; Ivanova *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2001; Tamaru und Selker, 2001). Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen die Methylierung des Histons H3 und die Acetylierungszustände der Histone. Die Funktion der Histon-H4K20-Methylierung in Pilzen ist bisher kaum untersucht worden. Lediglich in der Spaltheife *S. pombe*, in der die Deletion von *KMT5* in einem Defekt des Zellzyklus und der DNA-Reparatur-Mechanismen resultierte, sowie in dem Reisbrand-Erreger *M. oryzae*, bei dem der *KMT5*-Verlust zu keiner phänotypischen Veränderung führte, wurden Untersuchungen zur Rolle der Histon-H4K20-Methylierung durchgeführt (Sanders *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009; Pham *et al.*, 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Funktion der Histon-H4K20-Methyltransferase in *C. graminicola* für die vegetative und pathogene Entwicklung untersucht. Ein mittels *Double-joint* PCR generiertes Deletionskonstrukt ermöglichte die gezielte vollständige Deletion des *KMT5*-Gens durch homologe Rekombination. Die Charakterisierung der Deletionsmutanten  $\Delta kmt5$  bezüglich ihrer vegetativen Entwicklung und der Differenzierung von Infektionsstrukturen auf und in Maisblättern ließ Rückschlüsse auf die Kmt5-Funktion zu. In vegetativen Hyphen führte die *KMT5*-Deletion zu veränderten Transkriptmengen einer großen Anzahl von Genen. Die Deletionsmutante entwickelte aufgrund des beeinträchtigten appressorialen Penetrationsvermögens eine stark verringerte Virulenz auf intakten Maisblättern. Die genetische Komplementation der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  diente zur Überprüfung, ob der Phänotyp der generierten Mutanten einzig auf das Deletionsereignis zurückzuführen ist. Die Reintegration des *KMT5*-Gens in das Genom der Deletionsmutante führte zur vollständigen Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps. Die Charakterisierung einer Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette diente als Kontrolle, um auszuschließen, dass die beobachteten Auswirkungen auf den Phänotyp nicht durch die Gendeletion, sondern durch die Integration des Deletionskonstrukts in das Genom verursacht wurden. Die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette zeigte den Wildtyp-Phänotyp, sodass keine Beeinträchtigung durch die bloße Anwesenheit der Deletionskassette zu erkennen war.

### 5.1 Das *single-copy*-Gen *KMT5* ist unabdingbar für die H4K20-Methylierung in *C. graminicola*

In verschiedenen Organismen existiert jeweils eine unterschiedliche Anzahl an Lysin-Methyltransferasen, welche die evolutionär konservierten Histon-H4K20-Methylierungsstufen etablieren. In Säugetieren werden die drei Methylierungsstufen durch verschiedene spezifische Enzyme etabliert (Jørgensen *et al.*, 2013). H4K20me1, welches als Substrat für die Kmt5-Proteine dient, wird ausschließlich durch die Methyltransferase Kmt5A etabliert (Schotta *et al.*, 2008). Kmt5B induziert hauptsächlich H4K20me2, Kmt5C hingegen H4K20me3 (Schotta *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu Säugetieren repräsentiert in *D. melanogaster* ein einzelnes Kmt5-Protein die H4K20-Di- und Trimethyltransferase (Schotta *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2008). Durch Kmt5A katalysiertes H4K20me1 ist auch in *D. melanogaster*, eine Voraussetzung für die Etablierung von H4K20me2 und H4K20me3. Die Disruption von *KMT5A* resultierte in dem Verlust aller drei Methylierungsstufen (Karachentsev *et al.*, 2005; Schotta *et al.*, 2008).

Durch BLAST-Analysen wurde das *single-copy*-Gen *KMT5*, das für die Histon-H4K20-Methyltransferase in *C. graminicola* kodiert, identifiziert. Durch Analysen pilzlicher Proteome über die Internetseite des NCBI wurde in allen untersuchten Ascomyceten je eine Histon-H4K20-Methyltransferase identifiziert. Bei den Vertretern der Saccharomycotina verfügt lediglich die Hefe *Y. lipolytica* über ein *KMT5*-Gen (Veerappan *et al.*, 2008). Die Abwesenheit von *KMT5* in fast allen Saccharomycotina steht in Übereinstimmung mit dem evolutionären Trend, dass Modifikationen, die zu einer transkriptionellen Aktivierung führen, im Rahmen der Evolution reduziert wurden, wohingegen Modifikationen für das *Silencing* zunahm (Garcia *et al.*, 2007; Veerappan *et al.*, 2008). So zeigen einzellige Eukaryoten im Vergleich zu Säugern eine größere Anzahl an Modifikationen für eine transkriptionelle Aktivierung. In Säugetieren hingegen wurden mehr Markierungen, die ins Gen-*Silencing* involviert sind, gefunden (Garcia *et al.*, 2007). Mehr als 60 % des Säugetiergenoms unterliegen dauerhaftem *Silencing* (Jenuwein *et al.*, 1998). Beispielsweise enthalten Mensch und Maus höhere Mengen an methyliertem H4K20 (insbesondere H4K20me2) als der einzellige Eukaryot *Tetrahymena thermophila*, bei welchem H4K20 größtenteils unmodifiziert vorlag (Garcia *et al.*, 2007). Zudem konnte gezeigt werden, dass in *T. thermophila*, Mensch und Maus das Muster und die Anzahl der post-translationalen Modifikationen von Histon H4 weniger komplex bzw. geringer als für Histon H3 sind (Garcia *et al.*, 2007).

In dem einzelligen Ascomyceten *S. pombe* wurden umfangreiche Untersuchungen zur Funktion der Histon-H4K20-Methyltransferase SpKmt5, welche die drei Histon-H4K20-Methylierungsstufen katalysiert, durchgeführt (Sanders *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009). Immunzytologische Färbungen zeigten, dass H4K20me3 genomweit verbreitet ist, aber keinen spezifischen Marker für Centromere darstellt (Sanders *et al.*, 2004). Zudem ist H4K20me3 unabhängig von dem mit HP1 verwandten Protein Swi6 oder von der Histon-H3K9-Methyltransferase Clr4 lokalisiert (Sanders *et al.*, 2004). Die Antikörper-Färbung von H4K20me1 und H4K20me2 war erfolglos (Sanders *et al.*, 2004). Der Verlust von SpKmt5 beeinträchtigte weder die Regulation der Genexpression noch die Heterochromatin-

Funktion (Sanders *et al.*, 2004). Die Histon-H4K20-Methylierung spielt stattdessen durch die Rekrutierung des Checkpoint Protein Crb2 zur Aktivierung des *DNA-Damage-Checkpoints* eine essentielle Rolle bei DNA-Reparatur-Mechanismen (Sanders *et al.*, 2004).

In *M. musculus* sind H4K20me1 und H4K20me2 vorwiegend euchromatisch verteilt. H4K20me1 zeigt jedoch eine Anreicherung im inaktiven X-Chromosom. Das Verteilungsmuster von H4K20me2 ist stark gesprenkelt (Schotta *et al.*, 2004). H4K20me3 stellt in Säugetieren eine evolutionär konservierte Markierung des Heterochromatins an Chromozentren dar (Schotta *et al.*, 2004; Sakaguchi *et al.*, 2008). Auch die SET-Domäne-Proteine Kmt5B und Kmt5C, welche H4K20me3 katalysieren, sind am perizentrischen Heterochromatin lokalisiert (Schotta *et al.*, 2004).

Für die Histon-H4K20-Methyltransferase Kmt5 in *C. graminicola* zeigten immunzytologische Färbungen der Zellkerne mit Antikörpern gegen H4K20me1, -me2 und -me3, dass die Deletion von *KMT5* zum Verlust der Mono-, Di-, und Trimethylierung von H4K20 führte. In immunzytologischen Färbungen, welche die unterschiedliche Verteilung der drei H4K20-Methylierungsstufen im Zellkern sichtbar machten, diente eine DAPI-Färbung, welche die Chromozentren verstärkt anfärbt, als Kontrolle. Eine Überlagerung der fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Antikörper- und DAPI-Färbung zeigte die Lokalisierung von H4K20me1 in den Chromozentren. Das euchromatische Verteilungsmuster von H4K20me2 war, wie auch in *M. musculus*, stark gesprenkelt. Die Stellen, welche durch den Antikörper stärker angefärbt wurden, stimmten nicht mit den durch DAPI gekennzeichneten Chromozentren überein. Die Antikörper-Färbung von H4K20me3 zeigte ebenfalls eine überwiegend euchromatische Verteilung im gesamten Zellkern. Allerdings war eine Ko-Lokalisierung im Heterochromatin nicht auszuschließen, da sich bei der Färbung ebenfalls Chromozentren abzeichneten. Die unterschiedlichen Verteilungsmuster der drei Methylierungsstufen lassen unterschiedliche Funktionen vermuten. So könnte H4K20me1 bspw. aufgrund der Anreicherung in den Chromozentren eine Rolle bei der Entstehung von konstitutivem Heterochromatin spielen.

Die NLS-Vorhersage wies auf zwei putative Kernlokalisierungssignale in CgKmt5 hin. Der Nachweis der nukleären Lokalisation erfolgte mit Hilfe eines *CgKMT5:eGFP*-Reporterkonstrukts, welches in das Genom des Wildtyps integriert wurde. Die Verteilung des mit GFP markierten Kmt5 in den Zellkernen vegetativer und pathogener Pilzstrukturen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Zu jedem Zeitpunkt der vegetativen Entwicklung und Infektion wurde in den Zellkernen aller Pilzstrukturen eine gleichmäßige Kmt5-Verteilung beobachtet. Die Verteilung von CgKmt5 ähnelte der Verteilung des Orthologs SpKmt5 in *S. pombe*. Auch in *C. graminicola* wurde keinerlei Assoziation der Histon-H4K20-Methyltransferase mit den Chromozentren festgestellt.

## 5.2 Die Bedeutung von *KMT5* für die vegetative Entwicklung

Die Untersuchung der Genexpression auf Transkriptionsebene mittels RNA-Seq ist eine etablierte Methode, welche bereits in früheren *C. graminicola*-Studien in Kombination mit RT-qPCR-Analysen Anwendung fand (Ludwig *et al.*, 2014; Oliveira-Garcia und Deising, 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden mittels RNA-Seq Gene identifiziert, deren Transkription durch *Kmt5* bzw. die Histon-H4K20-Methylierung beeinflusst wird.

In vegetativen Hyphen wurde eine hohe Anzahl an Genen ermittelt, deren Transkriptmengen sich infolge der *KMT5*-Deletion veränderten. Ein Großteil der insgesamt 2418 Gene, mit im Vergleich zum Wildtyp abweichender Transkriptmenge in der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$ , kodieren für CAZymes, Sekundärmetabolit-Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Durch die veränderte Transkriptionsaktivität zahlreicher Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, hat die Deletion von *KMT5* einen indirekten Einfluss auf die Expression zahlreicher weiterer Gene, welche durch Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Aus zahlreichen Pilzen, wie *A. nidulans*, *A. flavus*, *F. graminearum* und *F. fujikuroi* ist bereits bekannt, dass epigenetische Regulationsmechanismen wie Histonacetylierung oder Histon-H3K4- und H3K9-Methylierung Einfluss auf die Regulation des Sekundärmetabolismus nehmen (Bok *et al.*, 2009; Cichewicz, 2009; Georgianna und Payne, 2009; Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Nützmann *et al.*, 2011; Reyes-Dominguez *et al.*, 2012; Soukup *et al.*, 2012; Studt *et al.*, 2013). Um die Bedeutung der Histon-H4K20-Methylierung für die Sekundärmetabolit-Biosynthese in *C. graminicola* zu klären, wurden die relativen Transkriptmengen ausgewählter Kandidatengene mittels RT-qPCR bestätigt. Auch zur Untersuchung der Rolle von *Kmt5* bei der Bildung vegetativer Strukturen wurden Transkriptanalysen durchgeführt.

### 5.2.1 Der Einfluss von *KMT5* auf die Sporulation und die Bildung des Luftmyzels

Die Auswirkungen der *KMT5*-Deletion auf das vegetative Wachstum wurden unter Verwendung definierter Kulturmedien durchgeführt. In Wachstumsversuchen auf Minimalmedium mit Glucose-Zusatz als C-Quelle sowie auf den Komplettnährmedien OMA und PDA konnte keine Beeinträchtigung der Wachstumsrate der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  festgestellt werden. Jedoch bildete  $\Delta kmt5$  deutlich weniger Luftmyzel als der Wildtyp. Sporulationsversuche zeigten, dass die Bildung asexueller Sporen in  $\Delta kmt5$  auf PDA stark beeinträchtigt war. Nach zweiwöchiger Kultivierung auf PDA hatte die Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  nur die Hälfte der Sporenanzahl des Wildtyps gebildet. Zudem war die Länge der  $\Delta kmt5$ -Sporen im Vergleich zu Wildtyp-Sporen leicht verringert. Auf OMA hingegen war kein Unterschied in der Sporenbildung zwischen Wildtyp und  $\Delta kmt5$  zu erkennen.

Ein mögliches Kandidatengen, dass durch den Verlust der Histon-H4K20-Methyltransferase *Kmt5* eine veränderte Transkriptmenge zeigte und zu Beeinträchtigungen der Sporen- und Luftmyzelbildung der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  führen könnte, ist *HFB1*. Für das Hydrophobin-Gen *HFB1* wurde mittels RNA-Seq, verglichen mit dem Wildtyp, die geringste Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$



bestimmt. RT-qPCRs bestätigten die dramatisch reduzierte *HFBI*-Transkriptmenge in vegetativen *Δkmt5*-Hyphen. Je nach Entwicklungsphase, können unterschiedliche Hydrophobine exprimiert werden. Sie werden nicht nur in vegetativen Hyphen exprimiert, sondern spielen auch eine Rolle bei der Sporenbildung (Wösten, 2001). Der Verlust von Hydrophobin-Genen führte in anderen Pilzarten zu einer reduzierten Bildung des Luftmyzels und beeinträchtigten Sporulation. Um Luftmyzel bilden zu können, muss ein filamentöser Pilz zuerst die Oberflächenspannung des umgebenden Wassers durchbrechen (Wösten *et al.*, 1999). Für diesen Prozess sind kleine Hydrophobin-Proteine mit einer Größe von circa 10 kDa unabdingbar (Linder *et al.*, 2005). Sie werden als Monomere sekretiert und assemblieren als amphipathische Schicht an hydrophoben/hydrophilen Schnittstellen (Bayry *et al.*, 2012; Kershaw und Talbot, 1998). Hydrophobine sind im Luftmyzel sowie auf der Oberfläche von Sporen und Infektionsstrukturen zu finden, wobei durch die Beschichtung der pilzlichen Oberfläche die Oberflächenspannung minimiert und die Anhaftung an die Oberfläche unterstützt wird (Kershaw und Talbot, 1998). Abhängig von dem Abstand zwischen den acht konservierten Cystein-Resten und der Stärke der Schicht, die sie bilden, werden Hydrophobine in Klasse I und Klasse II unterteilt (Wessel, 1994; Bayry *et al.*, 2012). Klasse I-Hydrophobine besitzen eine erhebliche Variation der Cystein-Abstände und assemblieren in sehr unlöslichen, polymeren Schichten aus Fibrillenstrukturen. Diese sogenannten *rodlets* sind extrem stabil und können nur mit Säurebehandlung gelöst werden. Im Gegensatz zu Klasse I-Hydrophobinen sind die Sequenz und Cystein-Abstände der Klasse II-Hydrophobine konservierter. Die von ihnen gebildeten Schichten lassen eine faserige Struktur der *rodlets* vermissen und können mit organischen Lösungsmitteln und Detergenzien gelöst werden (Bayry *et al.*, 2012). Das Hydrophobin SC3, ein Klasse I-Hydrophobin des Basidiomyceten *Schizophyllum commune* ist unabdingbar für die Differenzierung von Luftmyzel (Talbot, 1999). Die Disruption des SC3-Gens resultierte in Mutanten, die kein Luftmyzel bildeten (van Wetter *et al.*, 1996). In dem Ascomyceten *Ophiostoma ulmi* wurde Cerato-Ulmin, ein Klasse II-Hydrophobin, detaillierter untersucht (Kershaw und Talbot, 1998). Im Vergleich zu SC3 sind Cerato-Ulmin-Aggregate sehr instabil und leicht in 60%igem (v/v) Ethanol oder durch Druckanwendung zu lösen (Kershaw und Talbot, 1998). Weder Disruptionsmutanten noch natürlich vorkommende Genotypen von *O. ulmi*, welche kein Cerato-Ulmin produzieren, bilden Luftmyzel aus (Brasier *et al.*, 1995; Kershaw und Talbot, 1998). In dem mit *C. graminicola* nahe verwandten phytopathogenen Ascomycet *M. oryzae* wurden ein Klasse I-Hydrophobin und drei Klasse II-Hydrophobine identifiziert (Kim *et al.*, 2005). Die Deletion des Klasse I-Hydrophobin-Gens *MPG1* resultierte in einer reduzierten Virulenz, einer reduzierten Appressorienbildung sowie in einer reduzierten Sporulation der Mutante *mpg1* (Talbot *et al.*, 1996). Des Weiteren waren sporulierende Kolonien von *mpg1* im Vergleich zum Wildtyp einfacher mit Wasser zu benetzen, was auf eine veränderte Oberflächenhydrophobizität der Deletionsmutanten hindeutet (Talbot *et al.*, 1996). *MHP1*-Disruptionmutanten, welchen das Klasse II-Hydrophobin MHP1 fehlte, zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie *mpg1*. Die *MHP1*-Disruption verursachte eine reduzierte Sporulation, Sporenkeimung, Appressorienbildung sowie reduzierte Virulenz. Die *mhp1*-Mutanten

ließen sich im Vergleich zum Wildtyp zwar leichter durch ein Detergens benetzen. Allerdings gab es keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante in der Benetzbarkeit durch Wasser (Kim *et al.*, 2005).

In *C. graminicola* ließen Untersuchungen zur Benetzbarkeit der Sporen und Hyphen mit Wasser und Detergens keine veränderte Hydrophobizität infolge der *KMT5*-Deletion erkennen (Anhang V, Abbildung 21). Insgesamt wurden in *C. graminicola* die drei Gene *HFB1*, *HFB2* und *HFB3*, welche für Hydrophobine der Klasse II kodieren, identifiziert (Krijger *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2015). Für *HFB2* und *HFB3* wurden in vegetativen Hyphen mittels RT-qPCR-Analysen keine signifikanten Unterschiede der relativen Transkriptmengen in  $\Delta kmt5$  und Wildtyp festgestellt (Anhang XI, Abbildung 24). Die unterschiedlichen Transkriptmengen der Hydrophobin-Gene in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen, deuten darauf hin, dass die Hydrophobine in *C. graminicola* einer unabhängigen Regulation unterliegen und unterschiedliche spezifische Funktionen erfüllen.

In den vegetativen Hyphen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  wurde mittels RNA-Seq und RT-qPCR eine im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöhte Transkriptmenge des Gens *VOS1* ermittelt. Das Ortholog des *VosA*-Gens aus *A. nidulans* kodiert für einen von vier Velvet-Faktoren in *C. graminicola*. In filamentösen Pilzen ist *VosA* für die pilzliche Entwicklung und die Regulation des Sekundärmetabolismus von Bedeutung (Wang *et al.*, 2015). Neben der Schlüsselrolle für die Regulation des Sekundärmetabolismus besitzen die Vertreter der Velvet-Familie eine besondere Bedeutung für die Sporulation (Bayram und Braus, 2012). Die Velvet-Domäne kann spezifisch an DNA binden, dient aber auch zur Dimerisierung verschiedener Velvet-Proteine, wodurch Homo- und Heterodimere gebildet werden können (Ahmed *et al.*, 2013). Untersuchungen lassen vermuten, dass verschiedene Homo- und Heterodimere aus Velvet-Proteinen als Transkriptionsfaktoren die Genexpression beeinflussen (Ahmed *et al.*, 2013; Ni und Yu, 2007). In *A. nidulans* führte der Verlust von *VosA* zu einer unkontrollierten Aktivierung der asexuellen Entwicklung (Ni und Yu, 2007). Eine erhöhte Expression von *VosA* hingegen blockierte die Sporulation (Ni und Yu, 2007). Auch Untersuchungen in *Cochliobolus sativus*, dem Erreger der Blattfleckenkrankheit an Gräsern, zeigen, dass *VosA* vermutlich als *negative-feedback* Regulator der Sporulation wirkt, da der Knockout-Stamm  $\Delta CsVosA$  mehr Konidien als der Wildtyp produzierte (Wang *et al.*, 2015). Eine erhöhte *VOS1*-Expression im vegetativen  $\Delta kmt5$ -Myzel könnte ebenfalls als *negative-feedback* Regulator der Sporulation fungieren und dadurch zu einer beeinträchtigten Sporulation beitragen.

### 5.2.2 Der Einfluss von KMT5 auf die Zellwandintegrität

Die RNA-Seq der vegetativen Hyphen zeigte, dass in  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp fast alle detektierten CAZymes-Transkripte dereguliert vorliegen. CAZymes können am Abbau der pflanzlichen Zellwand und der Modifikation der pilzlichen Zellwand beteiligt sein (O'Connell *et al.*, 2012). Für die vegetative und pathogene Entwicklung des Pilzes ist eine intakte Zellwand unabdingbar. Um den Einfluss von Kmt5 auf die Zellwandintegrität zu untersuchen, wurde die Sensitivität von  $\Delta kmt5$ -Hyphen gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot getestet. Bei der Anwesenheit je eines Farbstoffes in PDA zeigte  $\Delta kmt5$  verglichen mit dem Wildtyp ein stark reduziertes Wachstum. Dabei wurde das Wachstum der  $\Delta kmt5$ -Kolonien durch Kongorot wesentlich dramatischer beeinträchtigt als durch Calcofluor Weiß. In mikroskopischen Untersuchungen der  $\Delta kmt5$ -Hyphen, die auf PDA mit Calcofluor Weiß oder Kongorot kultiviert wurden, waren blasenförmige Schwellungen zu erkennen. Ein Anzeichen dafür, dass die durch Farbstoffanlagerungen geschwächte Zellwand der  $\Delta kmt5$ -Hyphen dem inneren Turgordruck nicht mehr standhalten konnte. Die erhöhte Sensibilität von  $\Delta kmt5$  gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot kann auf einen veränderten Zellwandaufbau der  $\Delta kmt5$ -Hyphen zurückgeführt werden (Ram und Klis, 2006). Die Unterbindung der kovalenten Verknüpfung von Chitin und  $\beta$ -Glucanen durch Calcofluor Weiß und Kongorot verstärkt bereits vorhandene Zellwanddefekte (Ram und Klis, 2006). Eine Ursache für eine verstärkte Sensitivität von Mutanten mit Zellwanddefekten ist ein erhöhter Chitin-Anteil als Folge der aktivierten Zellwandstressantwort, bei der zahlreiche Gene auf Transkriptebene, die für Proteine zur Zellwandverstärkung kodieren, aktiviert werden (Ram und Klis, 2006). So kommt es in filamentösen Pilzen bei Zellwandstress zur Aktivierung der Chitin- und  $\alpha$ -1,3-Glucan-Biosynthese (Damveld *et al.*, 2005). In *A. niger* wurde z.B. bei einer Beschädigung der Zellwand durch Calcofluor Weiß, SDS und Caspofungin eine Induktion der Expression eines  $\alpha$ -1,3-Glucan-Synthase-Gens gezeigt, welches vermutlich zur Zellwand-Reparatur dient (Damveld *et al.*, 2005). Auch *S. cerevisiae*-Mutanten mit Defekten in der Synthese von  $\beta$ -1,3-Glucan und  $\beta$ -1,6-Glucan haben einen erhöhten Chitin-Anteil in der Zellwand und sind gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot hypersensitiv (Ram und Klis, 2006). Mittels RNA-Seq und RT-qPCR wurde für *EGL1*, das für die GPI-verankerte Zellwand- $\beta$ -1,3-Endoglucanase kodiert, in  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Transkriptmenge ermittelt. *EGL1* ist während der Zellwand-Biogenese bei der Vernetzung von Glucanen, Chitin und Glycoproteinen von Bedeutung (Liu und Free, 2016). Die erhöhte *EGL1*-Transkriptmenge in vegetativen Hyphen der Deletionsmutante könnte zu einer verstärkten  $\beta$ -1,3-Endoglucanase-Aktivität führen, welche zur Beeinträchtigung der Zellwandintegrität und zu einer erhöhten Sensitivität von  $\Delta kmt5$  gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot führen könnte (Ram und Klis, 2006). Aber auch die erhöhte *VOS1*-Transkriptmenge in den vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen könnte in Zusammenhang mit einem veränderten Zellwandaufbau stehen. So konnte in *A. nidulans* gezeigt werden, dass der VelB-VosA-Komplex direkt an die Promotor-Region der Zellwand-Biosynthese-Gene in Sporen bindet und dadurch die  $\beta$ -Glucan-Synthese reprimiert (Park *et al.*, 2015). Ein Defekt der  $\beta$ -

1,3-Glucan oder  $\beta$ -1,6-Glucan-Synthese führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot (Ram und Klis, 2006; Oliveira-Garcia und Deising, 2016a).

### 5.2.3 Der Einfluss von *KMT5* auf den Sekundärmetabolismus

Die Ko-Kultivierung der in dieser Arbeit untersuchten *C. graminicola*-Stämme auf PDA lieferte einen Hinweis auf eine veränderte Sekundärmetabolit-Biosynthese in  $\Delta kmt5$ , da die Kolonien der Deletionsmutante insbesondere an den Kontaktstellen zwischen den Kolonien eine rote Färbung der Hyphen entwickelten. Mittels RNA-Seq und RT-qPCR wurde in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Transkriptmenge von neun Genen nachgewiesen, welche bei der Sekundärmetabolit-Biosynthese von Bedeutung und in unterschiedlichen Clustern organisiert sind. Das bedeutet, dass Kmt5 nicht ganze Cluster, sondern die Expression einzelner Gene kontrolliert. In *C. graminicola* wurde eine überdurchschnittlich hohe Anzahl von 42 Sekundärmetabolit-Clustern identifiziert (O'Connell *et al.*, 2012). Vermutlich ist jedes Cluster an der Biosynthese eines spezifischen Sekundärmetabolits beteiligt, sodass *C. graminicola* ein breites Spektrum an Sekundärmetaboliten produzieren kann (O'Connell *et al.*, 2012). Eines der deregulierten Sekundärmetabolit-Gene war *PKS1*, dessen Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Hyphen gegenüber Wildtyp-Hyphen stark verringert war. *PKS1* kodiert für die Polyketidsynthase 1 und ist essentiell für die Melanin-Biosynthese in *C. graminicola* (Ludwig *et al.*, 2014). *CgpkS1*-Disruptionsmutanten, die nicht in der Lage waren Melanin zu synthetisieren, bildeten gelbes bis hellorangefarbenes Myzel auf festem Medium (Ludwig *et al.*, 2014). Eine reduzierte Melanin-Biosynthese als Resultat der reduzierten *PKS1*-Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ -Hyphen ist vermutlich Ursache für die rote Myzelfärbung. Zum einen könnten die  $\Delta kmt5$ -Hyphen durch einen geringen Melanin-Gehalt in den Hyphen rot erscheinen. Denkbar wäre aber auch, dass die rote Farbe durch eine vermehrte Synthese eines noch nicht identifizierten Sekundärmetabolits verursacht wird, der nicht mehr durch das dunkle Melanin verdeckt wird. Für die Sekundärmetabolit-Gene *PKS32*, *HYP14*, *MCO18*, *MCO19*, *PCD34* und *OXR42* wurden mittels RNA-Seq und RT-qPCR vielfach erhöhte Transkriptmengen nach dem Verlust der Histon-H4K20-Methylierung nachgewiesen. Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, in die Biosynthese welcher Sekundärmetabolite diese Gene involviert sind.

Die *KMT5*-Deletion resultierte in der veränderten Transkriptmenge zahlreicher Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transkriptmengen der beiden Transkriptionsfaktor-Gene *VOS1* und *XPP1* untersucht, deren Orthologe in anderen Pilzen die Sekundärmetabolit-Synthese beeinflussen. Die Transkriptmenge des Velvet-Gens *VOS1*, einem potenziellen Regulator des Sekundärmetabolismus, ist in den vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen signifikant erhöht. Vermutlich beeinflussen verschiedene Homo- und Heterodimere aus Velvet-Proteinen als Transkriptionsfaktoren die Genexpression (Ahmed *et al.*, 2013; Ni und Yu, 2007). Die stark erhöhte *VOS1*-Transkriptmenge könnte zur Veränderung der Expression von Sekundärmetabolit-Genen und somit zu einer veränderten Sekundärmetabolit-Biosynthese in  $\Delta kmt5$  beitragen.

Der Transkriptionsfaktor Xpp1 fungiert als positiver Regulator des Primärmetabolismus und als Repressor des Sekundärmetabolismus (Derntl *et al.*, 2017). Die *XPP1*-Transkriptmenge ist im vegetativen Myzel der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert. Die Deletion von *XPP1* in dem Ascomyceten *Trichoderma reesei* führte zu einem Rückgang des Primärmetabolismus und zu einer Hochregulation des Sekundärmetabolismus, was in einem Anstieg der Diversität und Anzahl der Sekundärmetabolite resultierte (Derntl *et al.*, 2017). Es wurde gezeigt, dass Xpp1 ein putativer Regulator für ein breites Feld an Domänen ist. So reguliert Xpp1 z.B. die Expression von *PKS*-Genen und Transkriptionsfaktoren, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass Xpp1 die Expression einer großen Anzahl an Genen reguliert (Derntl *et al.*, 2017). Denkbar wäre, dass Xpp1 die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene *PKS32*, *HYP14*, *MCO18*, *MCO19*, *PCD34* und *OXR42* reprimiert. Eine verringerte Xpp1-Aktivität infolge der *KMT5*-Deletion könnte für die um ein Vielfaches erhöhten Transkriptmengen der Sekundärmetabolit-Gene verschiedener Cluster verantwortlich sein.

Da die Rotfärbung des vegetativen  $\Delta kmt5$ -Myzels bei der axenischen Kultivierung nicht beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass eine spezifische Kommunikation zwischen den einzelnen Kolonien bei der Ko-Kultivierung durch den veränderten Sekundärmetabolismus stattfindet. Sekundärmetabolite spielen als chemische Signale eine Schlüsselrolle bei der Kommunikation zwischen Mikroorganismen derselben Spezies, unterschiedlicher Spezies und Wirtszellen (Netzker *et al.*, 2015). Viele mikrobielle Gen-Cluster, die unter Standard-Wachstumsbedingungen im Labor stillgelegt sind, werden erst durch eine Ko-Kultivierung aktiviert und spielen eine Rolle bei der Biosynthese neuer Sekundärmetabolite (Bertrand *et al.*, 2014). In *A. nidulans* wurde gezeigt, dass die Ko-Kultivierung mit *Streptomyces rapamycinicus* zur Aktivierung von Gen-Clustern und der Produktion neuer Sekundärmetabolite aufgrund eines epigenetischen Regulationsmechanismus kommt (Netzker *et al.*, 2015). Diese dynamisch produzierten Metabolite sind häufig bioaktiv und für die Entdeckung neuer Naturstoffe sowie als Komponenten für den biologischen Pflanzenschutz von großer Bedeutung (Bertrand *et al.*, 2014; Braga *et al.*, 2016; Deising *et al.*, 2017). Sie erfüllen wichtige Funktionen bei der Abwehr, Konkurrenz, Signaltransduktion und ökologischen Interaktionen (Braga *et al.*, 2016). Die Untersuchung der möglichen toxischen Wirkung und Funktion der potentiell bioaktiven Sekundärmetabolite, die bei der Ko-Kultivierung von Mikroorganismen durch die Aktivierung zuvor inaktiver Gen-Cluster gebildet werden, ist vor allem für den biologischen Pflanzenschutz von großer Bedeutung (Deising *et al.*, 2017).

### 5.3 Die Bedeutung von *KMT5* für die Maisinfektion

RNA-Seq in vegetativen Hyphen zeigte, dass eine große Anzahl an CAZymes- und Sekundärmetabolit-Genen, welche eine wichtige Rolle in der Pathogenese von *C. graminicola* spielen (Horbach *et al.*, 2009; O’Connell *et al.*, 2012), infolge der *KMT5*-Deletion dereguliert waren. Erstaunlicherweise zeigten RNA-Seq-Analysen in Sporen 0 hpi auf Maisblättern und in Infektionshyphen 72 hpi im Blattgewebe, dass die Deletion von *KMT5* zu einer, im Vergleich zu RNA-Seq-Ergebnissen in vegetativen Hyphen, veränderten Transkriptmenge von lediglich 394 Genen in Sporen und 332 Genen in nekrotrophen Hyphen führte. Die geringe Anzahl an deregulierten Genen bei der Ausbildung nekrotropher Hyphen, zeigt, dass *KMT5* keine Schlüsselrolle für die pathogene Entwicklung im Blattgewebe spielt, da sonst mit einer hohen Anzahl differenziell exprimierter Gene zu rechnen wäre. Entsprechend dieser Vermutung zeigten Virulenztests auf verwundeten Blättern, dass  $\Delta kmt5$  in der Lage ist invasiv wie der Wildtyp zu wachsen und typische Anthraknose-Symptome zu entwickeln. Dennoch ist *KMT5* ein bedeutendes Virulenzgen, weil es eine Schlüsselfunktion bei der appressorialen Penetration besitzt. Für den phytopathogenen Pilz *C. graminicola* ist die Funktionalität des Appressoriums unabdingbar, um die Wirtspflanze zu penetrieren und sich im Blattgewebe zu etablieren. Infektionsversuche mit Mais verdeutlichten, dass  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp bedeutend schwächere Symptome auf Blättern mit intakten Oberflächen verursachte. Die Quantifizierung der Infektionsstrukturen ergab einen im Vergleich zu Wildtyp-Appressorien signifikant geringeren Anteil an  $\Delta kmt5$ -Appressorien, die in der Lage waren, die Wirtszelle zu penetrieren und eine primäre Hyphe zu bilden. Eine mögliche Ursache für den Verlust des Penetrationsvermögens ist ein verringerter appressorialer Turgordruck (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). Zytorrhizie-Experimente zeigten jedoch keine Unterschiede zwischen osmotischen Potentialen in den Appressorien des Wildtyps und der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$ . Da ein geringerer Turgor bereits ausgeschlossen werden konnte, könnten die gemessenen Unterschiede auf einen veränderten Zellwandaufbau oder eine veränderte Sekundärmetabolit-Biosynthese zurückzuführen sein. Aufgrund der beeinträchtigten Zellwandintegrität der vegetativen Hyphen infolge der *KMT5*-Deletion, wurden die mechanischen und strukturellen Eigenschaften sowie die Topographie der Zellwand von  $\Delta kmt5$ - und Wildtyp-Appressorien mittels Atomkraftmikroskopie untersucht. Für die  $\Delta kmt5$ -Appressorien wurde eine signifikant veränderte Oberflächenstruktur und geringere Elastizität der Zellwand bestimmt. Wie die Zellwand vegetativer Hyphen, scheint auch der Zellwandaufbau der Appressorien durch *Kmt5* beeinflusst zu werden. Mittels RT-qPCR wurden die Transkriptmengen von Genen der Zellwand- und Sekundärmetabolit-Biosynthese in den Appressorien untersucht, welche die veränderten mechanischen Eigenschaften der Appressorien-Zellwand verursachen könnten. Der Einfluss der Sekundärmetabolit-Biosynthese auf die Appressorien-Zellwand konnte in *C. graminicola* bereits nachgewiesen werden. Die *PKS1*-Disruptionsmutante von *C. graminicola*, welche kein Melanin bildet, ist nicht in der Lage intakte Maisblätter zu penetrieren. Jedoch kann sie, wie  $\Delta kmt5$  auch, invasiv wachsen und auf verwundeten Blättern Wildtyp-ähnliche Symptome verursachen (Ludwig *et al.*, 2014). Mittels Atomkraftmikroskopie wurde nachgewiesen, dass

die *PKSI*-Disruptionsmutante im Vergleich zum Wildtyp eine veränderte Oberfläche der Appressorien-Zellwand ausbildet (Ludwig *et al.*, 2014). Die Oberflächen-Eigenschaften der von  $\Delta kmt5$  und *Cgpksl* differenzierten Appressorien ähneln sich. Die Oberflächen zeigen im Vergleich zum Wildtyp-Appressorium jeweils zahlreichere Vertiefungen und Erhebungen. In den  $\Delta kmt5$ -Appressorien wurden mittels RT-qPCR-Analysen sechs Gene des Sekundärmetabolismus identifiziert, deren Transkriptmengen im Vergleich zu Wildtyp-Appressorien signifikant erhöht vorlagen. Wie auch in den vegetativen Hyphen zählen die Gene zu unterschiedlichen Sekundärmetabolit-Clustern. Die drei Gene *PCD34*, *BML1* und *MPRI* sind in die Biosynthese sekundärer Metabolite involviert. Für das Gen *PCD34*, welches für eine *Phytanoyl-CoA dioxygenase* kodiert, wurde auch in vegetativen Hyphen nach dem Verlust der Histon-H4K20-Methylierung eine erhöhte Transkriptmenge bestimmt. Die drei Gene *XPPI*, *VOS1* und *VEL1*, welche für Transkriptionsfaktoren kodieren, werden durch die Histon-H4K20-Methylierung reguliert und beeinflussen wiederum die Expression von Sekundärmetabolit-Genen. Somit können zahlreiche Gene indirekt durch die H4K20-Methylierung beeinflusst werden. Das Endo-Polygalacturonase-Gen *PGNI* hatte ebenfalls eine erhöhte Transkriptmenge infolge der *KMT5*-Deletion. Die Endo-Polygalacturonase ist am Abbau der pflanzlichen Zellwand beteiligt und könnte durch die vermehrte Freisetzung von DAMPs eine verstärkte pflanzliche Abwehr elicitieren. Die Quantifikation der Papillen sollte Aufschluss darüber geben, ob die Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  aufgrund einer verstärkten Auslösung pflanzlicher Abwehr durch eine vermehrte Pappillenbildung unter den Appressorien am Eindringen in die Pflanzenzellen gehindert wurde. Die Papillenbildungsrate lag bei allen untersuchten Pilzisolaten bei durchschnittlich 2,5 %. Demnach wurde die Penetration der Wirtszelle durch  $\Delta kmt5$ -Appressorien nicht durch eine vermehrte Papillenbildung verhindert. Neben den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden auch Transkriptanalysen putativer Abwehrgene von Mais durchgeführt. Mittels RNA-Seq- und RT-qPCR-Analysen wurden keine signifikanten Unterschiede in den relativen Transkriptabundanz der ausgewählten Maisgene ermittelt. Sowohl die zytologischen Analysen, als auch die Untersuchungen auf Transkriptebene zur pflanzlichen Abwehr zeigten, dass die  $\Delta kmt5$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp während des Infektionsverlaufs keine verstärkte Pflanzenabwehrreaktion elicitiert. Demnach kann die verminderte Virulenz von  $\Delta kmt5$  auf funktionell eingeschränkte Appressorien zurückgeführt werden. Das zeigt, dass *KMT5* zwar für die Appressorien-Funktionalität unabdingbar ist, jedoch beim invasiven Wachstum eine untergeordnete Rolle als epigenetischer Regulator für Virulenzgene zu spielen scheint.

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde erstmals die Rolle der Histon-H4K20-Methyltransferase Kmt5 in dem Maispathogen *C. graminicola* untersucht. Mit Hilfe hochspezialisierter melanisierter Appressorien durchdringt der hemibiotrophe Ascomycet die pflanzliche Zellwand. Im Pflanzengewebe etabliert er zunächst biotrophe Hyphen, gefolgt von destruktiven nekrotrophen Hyphen. Während des Infektionsverlaufs, wenn *C. graminicola* tiefgreifende Veränderungen der Zellmorphologie und Ernährungsweise durchläuft, werden mehr als 2000 Gene differenziell exprimiert. Über die Mechanismen zur Regulation der stadienspezifischen Genexpression in *C. graminicola* ist bisher wenig bekannt. In zahlreichen phytopathogenen Pilzen wie *Fusarium graminearum*, *Magnaporthe oryzae* und *Leptosphaeria maculans* wurde gezeigt, dass epigenetische Faktoren für die Differenzierung vegetativer Pilzstrukturen und den Infektionsverlauf essentiell sind. Im Mittelpunkt bisheriger Untersuchungen standen die Histon-H3K9-Methylierung und die Acetylierungszustände der Histone, welche in die dynamische Regulation des Verpackungsgrads zwischen transkriptionsaktiven und -inaktiven Chromatinzuständen involviert sind. Die Bedeutung der Histon-H4K20-Methylierung in Pilzen wurde bisher lediglich in dem Reisbrand-Erreger *M. oryzae* und der Spaltheife *S. pombe* untersucht. Während der *KMT5*-Verlust in *M. oryzae* zu keiner phänotypischen Veränderung führte, resultierte er in *S. pombe* in einem Defekt des Zellzyklus und der DNA-Reparatur-Mechanismen.

In *C. graminicola* konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Histon-H4K20-Methyltransferase Kmt5 unabdingbar für die Etablierung der Mono-, Di-, und Trimethylierung von Histon H4K20 ist und eine essentielle Rolle für die Regulation zahlreicher Gene, wie CAZymes-Gene und Gene des Sekundärmetabolismus, sowie die Differenzierung intakter Appressorien spielt.

Mittels BLAST-Analysen wurde das *single-copy*-Gen *KMT5* in *C. graminicola* identifiziert, das für die Histon-H4K20-Methyltransferase Kmt5 kodiert. Die Deletion von *KMT5* führte zum Verlust der Mono-, Di-, und Trimethylierung von H4K20. Die NLS-Vorhersage wies auf zwei putative Kernlokalisierungssignale in CgKmt5 hin. Mit Hilfe eines *CgKMT5:eGFP*-Reporterkonstrukts erfolgte der Nachweis der Lokalisation von Kmt5 in den Zellkernen vegetativer und pathogener Pilzstrukturen. Die *KMT5*-Deletion resultierte in geringfügigen Veränderungen des vegetativen Wachstums. Die Deletionsmutante bildete weniger Luftmyzel als der Wildtyp. Die Anzahl gebildeter Sporen und die Sporenlänge von  $\Delta kmt5$  waren auf PDA reduziert. In den vegetativen Hyphen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  wurde mittels RNA-Seq eine hohe Anzahl an Genen ermittelt, deren Transkriptmengen im Vergleich zu Wildtyp-Hyphen verändert waren. Ein Großteil der Gene, mit im Vergleich zum Wildtyp abweichender Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$ , kodiert für CAZymes, Sekundärmetabolit-Enzyme und Transkriptionsfaktoren. Dies wurde vor allem in Wachstumsversuchen mit Calcofluor Weiß und Kongorot deutlich, wodurch der Einfluss von Kmt5 auf die Zellwandintegrität und den Sekundärmetabolismus gezeigt werden konnte. Die Deletionsmutante zeigte eine hohe Sensitivität gegenüber den Farbstoffen und war in Wachstum und Hyphenmorphologie beeinträchtigt. Bei der Ko-



Kultivierung der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  mit den in dieser Arbeit untersuchten *C. graminicola*-Stämmen entwickelten  $\Delta kmt5$ -Kolonien insbesondere an den Kontaktstellen zwischen den Kolonien eine rote Färbung der Hyphen.

Erstaunlicherweise konnte mittels RNA-Seq in Sporen und nekrotrophen Hyphen im Vergleich zu Untersuchungen in vegetativen Hyphen nur eine geringe Anzahl deregulierter Transkriptmengen in  $\Delta kmt5$  nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass *Kmt5* eine untergeordnete Rolle bei der transkriptionellen Regulation während der pathogenen Entwicklung im Blattgewebe spielt. Entsprechend dieser Vermutung zeigten Virulenztests auf verwundeten Maisblättern, dass  $\Delta kmt5$  in der Lage ist invasiv wie der Wildtyp zu wachsen und typische Anthraknose-Symptome zu entwickeln. Auf intakten Maisblättern hingegen verursachte  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp bedeutend schwächere Anthraknose-Symptome, was zeigte, dass *Kmt5* dennoch für die Virulenz benötigt wird. Die Quantifizierung der Infektionsstrukturen ergab, dass ein signifikant reduzierter Anteil an  $\Delta kmt5$ -Appressorien, in der Lage war, die Wirtszelle zu penetrieren und eine primäre Hyphe zu bilden. Durch Zytorrhizie-Experimente konnte ein verringerter appressorialer Turgordruck als mögliche Ursache für den Verlust des Penetrationsvermögens ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Appressorienoberfläche mittels Atomkraftmikroskopie machte Unterschiede in den mechanischen und strukturellen Eigenschaften als Resultat der *KMT5*-Deletion sichtbar. Die Oberfläche des Wildtyp-Appressoriums wies wenige großflächige Erhebungen und Vertiefungen auf. Im Gegensatz dazu war die Oberfläche des  $\Delta kmt5$ -Appressoriums von zahlreichen Erhebungen und Vertiefungen geprägt, wodurch sie uneben erschien. Zusätzlich waren die Zellwände der  $\Delta kmt5$ -Appressorien deutlich weniger elastisch als die Zellwände der Wildtyp-Appressorien. Die Quantifizierung von Papillen sowie RNA-Seq- und RT-qPCR-Analysen zur Bestimmung der Transkriptmengen von Abwehrgenen zeigten, dass  $\Delta kmt5$  keine verstärkte Pflanzenabwehrreaktion eliciert. Die verminderte Virulenz von  $\Delta kmt5$  ist demnach auf funktionell eingeschränkte Appressorien zurückzuführen.

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass *KMT5* eine große Anzahl an Genen und die Sekundämetabolit-Biosynthese in vegetativen Hyphen kontrolliert und für die appressoriale Penetration und somit für die Virulenz, jedoch nicht für die pathogene Entwicklung invasiver Hyphen im Pflanzengewebe, unabdingbar ist.

## Literaturverzeichnis

- Ahmed, Y.L., Gerke, J., Park, H.S., Bayram, Ö., Neumann, P., Ni, M., Dickmanns, A., Kim, S.C., Yu, J.H., Braus, G.H. und Ficner, R. 2013. The Velvet Family of Fungal Regulators Contains a DNA-Binding Domain Structurally Similar to NF- $\kappa$ B. *PLOS Biology* 11: e1001750.
- Albarouki, E., Schaffner, L., Ye, F., von Wirén, N., Haas, H. und Deising, H.B. 2014. Biotrophy-specific downregulation of siderophore biosynthesis in *Colletotrichum graminicola* is required for modulation of immune responses of maize. *Molecular Microbiology* 92: 338-355.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D. und Caparros, M.L. 2007a. Epigenetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Allis, C.D., Berger, S.L., Cote, J., Dent, S., Jenuwein, T., Kouzarides, T., Pillus, L., Reinberg, D., Shi, Y., Shiekhhattar, R., Shilatifard, A., Workman, J. und Zhang, Y. 2007b. New nomenclature for chromatinmodifying enzymes. *Cell* 131: 633-636.
- Allis, C.D. und Jenuwein, T. 2016. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics* 17: 487-500.
- Altenbach, D. und Robatzek, S. 2007. Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1031-1039.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Baidyaroy, D., Brosch, G., Ahn, J.H., Graessle, S., Wegener, S., Tonukari, N.J., Caballero, O., Loidl, P. und Walton, J.D. 2001. A gene related to yeast HOS2 histone deacetylase affects extracellular depolymerase expression and virulence in a plant pathogenic fungus. *The Plant Cell* 13: 1609-1624.
- Bailey, J.A., O'Connell, R.J., Pring, R.J. und Nash, C. 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum* : Biology, Pathology and Control, 88-120, Bailey, J. A. und Jeger, M. J. (eds.), Commonwealth Agricultural Bureau International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Bannister, A.J. und Kouzarides, T. 2005. Reversing histone methylation. *Nature* 426: 1103-1106.
- Bayram, Ö. und Braus, G.H. 2012. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiology Reviews* 36: 1-24.
- Bayry, J., Aïmanianda, V., Guijarro, J.I., Sunde, M. und Latgé, J.P. 2012. Hydrophobins—Unique Fungal Proteins. *PLOS Pathogens* 8: e1002700.
- Bechinger, C., Giebel, K.F., Schnell, M., Leiderer, P., Deising, H.B. und Bastmeyer, M. 1999. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus. *Science* 285: 1896-1899.

- Behr, M., Humbeck, K., Hause, G., Deising, H. B. und Wirsel, S.G.R. 2010. The Hemibiotroph *Colletotrichum graminicola* Locally Induces Photosynthetically Active Green Islands but Globally Accelerates Senescence on Aging Maize Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 879-892.
- Bergstrom, G.C. und Nicholson, R.L. 1999. The biology of corn anthracnose. *Plant Disease* 83: 596-608.
- Bertani, G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 62: 293-300.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K. und Wolfender, J.L. 2014. Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances* 32: 1180-1204.
- Bok, J.W., Chiang, Y.M., Szewczyk, E., Reyes-Dominguez, Y., Davidson, A.D., Sanchez, J.F., Lo, H.C., Watanabe, K., Strauss, J., Oakley, B.R., Wang, C.C.C. und Keller, N.P. 2009. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology* 5: 462-464.
- Boller, T. und Felix, G.A. 2009. A Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology* 60: 379-406.
- Botuyan, M.V., Lee, J., Ward, I.M., Kim, J.E., Thompson, J.R., Chen, J. und Mer, G. 2006. Structural Basis for the Methylation State-Specific Recognition of Histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA Repair. *Cell* 126: 1361-1373.
- Braga, R.M., Dourado, M.N. und Araújo, W.L. 2016. Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian Journal of Microbiology* 47: 86–98.
- Brasier, C.M., Kirk, S.A. und Tegli, S. 1995. Naturally occurring non cerato-ulmin producing mutants of *Ophiostoma novo-ulmi* are pathogenic but lack aerial mycelium. *Mycological Research* 99: 436-440.
- Brown, S.W. 1966. Heterochromatin. *Science* 151: 417-425.
- Cadena-Gomez, G. und Nicholson, R.L. 1987. Papilla Formation and Associated Peroxidase-Activity - a Nonspecific Response to Attempted Fungal Penetration of Maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 31: 51-67.
- Chen, F., Goodwin, P.H., Khan A. und Hsiang, T. 2002. Population structure and mating-type genes of *Colletotrichum graminicola* from *Agrostis palustris*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 427-436.
- Cheng, X. 2014. Structural and Functional Coordination of DNA and Histone Methylation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6:8.
- Chung, C.T., Niemela, S.L. und Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 2172-2175.

- Chung, K.R., Shilts, T., Li, W. und Timmer, L.W. 2002. Engineering a genetic transformation system for *Colletotrichum acutatum*, the causal fungus of lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiology Letters* 213: 33-39.
- Cichewicz, R.H. 2009. Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Natural Product Reports* 27: 11-22.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M.J., Poinssot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L. und Mauch-Mani, B. 2006. Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1062-1071.
- Crouch, J.A. und Beirn, L.A. 2009. Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* 39: 19-44.
- Damveld, R.A., van Kuyk, P.A., Arentshorst, M., Klis, F.M., van den Hondel, C. A.M.J.J. und Ram, A.F.J. 2005. Expression of *agsA*, one of five 1,3- $\alpha$ -D-glucan synthase encoding genes in *Aspergillus niger*, is induced in response to cell wall stress. *Fungal Genetics and Biology* 42: 165-177.
- Dean, R., Van Kan, J.A.L., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Rudd, J.J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. und Foster, G.D. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13. 414-430.
- De Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N. und Talbot, N.J. 1997. Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* 389: 244–245.
- Deising, H.B., Werner, S. und Wernitz, M. 2000. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* 2: 1631–41.
- Deising, H.B., Gase, I. und Kubo, Y. 2017. The unpredictable risk imposed by microbial secondary metabolites: how safe is biological control of plant diseases? *Journal of Plant Diseases and Protection* 124: 413-419.
- Derntl, C., Kluger, B., Bueschl, C., Schuhmacher, R., Mach, R.L. und Mach-Aigner, A.R. 2017. Transcription factor Xpp1 is a switch between primary and secondary fungal metabolism. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 114: E560-E569.
- Dillon, S.C., Zhang, X., Trievel, R.C. und Cheng, X. 2005. The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. *Genome Biology* 6:227.
- Ding, S.L., Liu, W., Iliuk, A., Ribot, C., Vallet, J., Tao, A., Wang, Y., Lebrun, M.H. und Xu, J.R. 2010. The Tig1 histone deacetylase complex regulates infectious growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 22: 2495-2508.
- Döbbeling, U., Böni, R., Häffner, A., Dummer, R. und Burg, G. 1997. Method for simultaneous RNA and DNA isolation from biopsy material, cultur cells, plants and bacteria. *BioTechniques* 22: 88-90.

- Dupont, C., Armant, R. und Brenner, C.A. 2009. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. *Seminars in Reproductive Medicine* 27: 351-357.
- Elorza, M.V., Rico, H. und Sentandreu, R. 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *Journal of General Microbiology* 129: 1577-1582.
- Epstein, L., Lusnak, K. und Kaur, S. 1998. Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* 23: 189-203.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Flowers, J.L. und Vaillancourt, L.J. 2005. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. *Current Genetics* 48: 380-388.
- Freitag, M. 2017. Histone Methylation by SET Domain Proteins in Fungi. *Annual Review of Microbiology* 71: 413-439.
- Garcia, B.A., Hake, S.B., Diaz, R.L., Kauer, M., Morris, S.A., Recht, J., Shabanowitz, J., Mishra, N., Strahl, B.D., Allis, D. und Hunt, D.F. 2007. Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *The Journal of biological chemistry* 282: 7641-7655.
- Georgianna, D.R. und Payne, G.A. 2009. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology* 46: 113-125.
- Grewal, S.S. und Elgin, S.C.R. 2007. Transcription and RNAi in the formation of heterochromatin. *Nature* 447: 399-406.
- Haufe, J. 2015. Die Untersuchung zellspezifischer Expression von  $\alpha$ -1,3-Glucan-Synthase-Genen von *Colletotrichum graminicola* anhand von Promotor:eGFP-Fusionen. Masterarbeit. In Naturwissenschaftlichen Fakultät III, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz (Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
- Honda, S. und 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: 6044-6055.
- Horbach, R., Graf, A., Weihmann, F., Antelo, L., Mathea, S., Liermann, J.C., Opatz, T., Thines, E., Aguirre, J. und Deising, H.B. 2009. Sfp-Type 4'-Phosphopantetheinyl Transferase Is Indispensable for Fungal Pathogenicity. *The Plant Cell* 21: 3379-3396.
- Horbach, R., Navarro-Quesadac, A.R., Knoggec, W. und Deising, H.B. 2011. When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* 168: 51-62.
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. und Money, N.P. 1991. Penetration of hard substances by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 88: 11281-11284.

- Huang, Y., Mijiti, G., Wang, Z., Yu, W., Fan, H., Zhang, R. und Liu, Z. 2015. Functional analysis of the class II hydrophobin gene HFB2-6 from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research* 171: 8-20.
- Huen, M.S., Sy, S.M., van Deursen, J.M., und Chen, J. 2008. Direct interaction between SET8 and proliferating cell nuclear antigen couples H4-K20 methylation with DNA replication. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 11073-11077.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. und Kogel, K.H. Hypersensitive Cell Death and Papilla Formation in Barley Attacked by the Powdery Mildew Fungus Are Associated with Hydrogen Peroxide but Not with Salicylic Acid Accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251-1260.
- Ivanova, A.V., Bonaduce, M.J., Ivanov, S.V. und Klar, A.J.S. 1998. The chromo and SET domains of the Ctr4 protein are essential for silencing in fission yeast. *Nature* 395: 192-195.
- Izawa, M., Takekawa, O., Arie, T., Teraoka, T., Yoshida, M., Kimura, M. und Kamakura, T. 2009. Inhibition of histone deacetylase causes reduction of appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 489-498.
- Jenuwein, T. und Allis, C.D. 2001. Translating the Histone Code. *Science* 293: 1074-1080.
- Jenuwein, T., Laible, G., Dorn, R. und Reuter, G. 1998. SET domain proteins modulate chromatin domains in eu- and heterochromatin. *Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 80-93.
- Johnson, K.L. 1985. *Contact Mechanics*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Jørgensen, S., Schotta, G. und Sørensen, C.S. 2013. Histone H4 Lysine 20 methylation: key player in epigenetic regulation of genomic integrity. *Nucleic Acids Research* 41: 2797-2806.
- Karachentsev, D., Sarma, K., Reinberg, D. und Steward, R. 2005. PR-Set7-dependent methylation of histone H4 Lys 20 functions in repression of gene expression and is essential for mitosis. *Genes & Development* 19: 431-435.
- Kershaw, M.J. und Talbot, N.J. 1998. Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology* 23: 18-33.
- Kim, S., Ahn, I.P., Rho, H.S. und Lee, Y.H. 2005. *MHP1*, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Molecular Microbiology* 57: 1224-1237.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. und Winn, W.C. 1997. *Koneman's Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*, 5th ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA, USA.
- Kopecká, M. und Gabriel, M. 1992. The influence of Congo red on the cell wall and (1→3)-b-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology* 158: 115-126.
- Kourmouli, N., Jeppesen, P., Mahadevhaiah, S., Burgoyne, P., Wu, R., Gilbert, D.M., Bongiorno, S., Prantera, G., Fanti, L., Pimpinelli, S., Shi, W., Fundele, R. und Singh, P.B. 2004. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. *Journal of Cell Science* 117: 2491-2501.

- Kosugi, S., Hasebe, M., Tomita, M. und Yanagawa, H. 2009b. Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 106: 10171-10176.
- Kumar, S., Stecher, G. und Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Krijger, J.J., Horbach, R., Behr, M., Schweizer, P., Deising, H.B. und Wirsel, S.G.R. 2008. The Yeast Signal Sequence Trap Identifies Secreted Proteins of the Hemibiotrophic Corn Pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 1325-1336.
- Lachner, M. und Jenuwein, T. 2002. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 286-298.
- Lachner, M., O'Sullivan, R.J. und Jenuwein, T. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *Journal of Cell Science* 116: 2117-2124.
- Lachner, M., Sengupta, R., Schotta, G. und Jenuwein, T. 2004. Trilogies of histone lysine methylation as epigenetic landmarks of the eukaryotic genome. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 69: 209-218.
- Lange, M., Müller C. und Peiter, E. 2014. Membrane-assisted culture of fungal mycelium on agar plates for RNA extraction and pharmacological analyses. *Analytical Biochemistry* 453: 58-60.
- Leach, J., Lang, B.R. und Yoders, O.C. 1982. Methods for selection of mutants and in vitro culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Journal of General Microbiology* 128: 1719-1729.
- Li, Y., Wang, C., Liu, W., Wang, G., Kang, Z., Kistler, H.C. und Xu, J.R. 2011. The HDF1 histone deacetylase gene is important for conidiation, sexual reproduction, and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 487-496.
- Linder, M.B., Szilvay, G.R., Nakari-Setälä, T. und Penttilä, M.E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 877-896.
- Liu, L. und Free, S.J. 2016. Characterization of the *Sclerotinia sclerotiorum* cell wall proteome. *Molecular Plant Pathology* 17: 985-995.
- Livak, K.J. und Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -method. *Methods* 25: 402-408.
- Ludwig, N., Löhner, M., Hempel, M., Mathea, S., Schliebner, I., Menzel, M., Kiesow, A., Schaffrath, U., Deising, H.B. und Horbach, R. 2014. Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 315-327.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. und Richmond, T.J. 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.

- Malonek, S., Rojas, M.C., Hedden, P., Gaskin, P., Hopkins, P. und Tudzynski, B. 2004. The NADPH-cytochrome P450 reductase gene from *Gibberella fujikuroi* is essential for gibberellin biosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 25075-25084.
- Mendgen, K. und Deising, H.B. 1993. Infection structures of fungal plant pathogens—a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist* 124: 193-213.
- Mendgen, K., Hahn, M. und Deising, H.B. 1996. Mechanisms and morphogenesis of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34: 367-386.
- Mercure, E.W., Kunoh, H. und Nicholson, R.L. 1994. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* to corn leaves: A requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 45: 407-420.
- Mims, C.W. und Vaillancourt, L.J. 2002. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. *Phytopathology* 92: 803-812.
- Money, N.P. 1989. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. Relationship between molecular weight and vapor pressure deficit. *Plant Physiology* 91: 766-769.
- Murray, K. 1964. The Occurrence of  $\epsilon$ -N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* 3: 10-15.
- Münch, S., Ludwig, N., Floss, D.S., Sugui, J.A., Koszucka, A.M., Voll, L.M., Sonnewald, U. und Deising, H.B. 2011. Identification of virulence genes in the corn pathogen *Colletotrichum graminicola* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Molecular Plant Pathology* 12: 43-55.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D. und Grewal, S.I.S. 2001. Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. *Science* 292: 110-113.
- Namiki, F., Matsunaga, M., Okuda, M., Inoue, I., Nishi, K., Fujita, Y. und Tsuge, T. 2001. Mutation of an arginine biosynthesis gene causes reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum f. sp. melonis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 580-584.
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D.J., König, C.C., Valiante, V., Schroeckh, V. und Brakhage, A.A. 2015. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in Microbiology* 6: Article 299.
- Ni, M. und Yu, J.H. 2007. A Novel Regulator Couples Sporogenesis and Trehalose Biogenesis in *Aspergillus nidulans*. *PLOS ONE* 2: e970.
- Nicholson, R.L. und Epstein, L. 1991. Adhesion of fungi to the plant surface: Prerequisite for pathogenesis. *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. H. Hoch and G. Cole, editors. Plenum Press, New York: 3-23.
- Nishioka, K., Chuikov, S., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Allis, D., Tempst, P. und Reinberg, D. 2001. Set9, a novel histone H3 methyltransferase that facilitates transcription by precluding histone tail modifications required for heterochromatin formation. *Genes & Development* 16:479-489.



- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L. 2004. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266.
- Nützmann, H.W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schümann, J., Hertweck, C., Strauss, J. und Brakhage, A.A. 2011. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 14282–14287.
- O’Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., Damm, U., Buiate, E.A., Epstein, L., Alkan, N., Altmüller, J., Alvarado-Balderrama, L., Bauser, C.A., Becker, C., Birren, B.W., Chen, Z., Choi, J., Crouch, J.A., Duvick, J.P., Farman, M.A., Gan, P., Heiman, D., Henrissat, B., Howard, R.J., Kabbage, M., Koch, C., Kracher, B., Kubo, Y., Law, A.D., Lebrun, M.H., Lee, Y.H., Miyara, I., Moore, N., Neumann, U., Nordström, K., Panaccione, D.G., Panstruga, R., Place, M., Proctor, R.H., Prusky, D., Rech, G., Reinhardt, R., Rollins, J.A., Rounsley, S., Schard, C.L., Schwartz, D.C., Shenoy, N., Shirasu, K., Sikhakolli, U.R., Stüber, K., Sukno, S.A., Sweigard, J.A., Takano, Y., Takahara, H., Trail, F., van der Does, H.C., Voll, L.M., Will, I., Young, S., Zeng, Q., Zhang, J., Zhou, S., Dickman, M.B., Schulze-Lefert, P., van Themaat, E.V.L., Ma, L.J. und Vaillancourt, L.J. 2012. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* 44: 1060-1067.
- Oliveira-Garcia, E. und Deising, H.B. 2013. Infection structure specific expression of  $\beta$ -1,3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of  $\beta$ -glucane triggered immunity in maize. *The Plant Cell* 25: 2356-2378.
- Oliveira-Garcia, E. und Deising, H.B. 2016a. Attenuation of PAMP triggered immunity in maize requires down-regulation of the key  $\beta$ -1,6-glucan synthesis genes *KRE5* and *KRE6* in biotrophic hyphae of *Colletotrichum graminicola*. *The Plant Journal* 87: 355-375.
- Oliveira-Garcia, E. und Deising, H.B. 2016b. The glycosylphosphatidylinositol anchor biosynthesis genes *GPI2*, *GAA1*, and *GPI8* are essential for cell-wall integrity and pathogenicity of the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29: 889-901.
- Panaccione, D.G., McKiernan, M. und Hanau, R.M. 1988. *Colletotrichum graminicola* transformed with homologous and heterologous Benomyl-resistance genes retains expected pathogenicity to corn. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1: 113-120.
- Park, H.S., Yu, Y.M., Lee, K.K., Maeng, P.J., Kim, S.C. und Yu, J.H. 2015. Velvet-mediated repression of  $\beta$ -glucan synthesis in *Aspergillus nidulans* spores. *Scientific Reports* 5, Article number: 10199.
- Perfect, S.E., Hughes, H.B., O’Connell, R.J. und Green, J.R. 1999. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology* 27: 186-198.

- Pham, K.T.M., Inoue, Y., Vu, B.V., Nguyen, H.H., Nakayashiki, T., Ikeda, K., Nakayashiki, H. 2015. MoSET1 (Histone H3K4 Methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) Regulates Global Gene Expression during Infection-Related Morphogenesis. PLOS Genetics 11: e1005385. doi:10.1371/journal.pgen.1005385.
- Politis, D.J. und Wheeler, H. 1973. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. Physiological Plant Pathology 3: 465-471.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemase, M.A., Pouwels, P.H. und van den Hondel, C.A. 1987. Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene 56: 117-124.
- Ram, A.F.J. und Klis, F.M. 2006. Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. Nature Protocols 1: 2253-2256.
- Reichmann, M., Jamnischek, A., Weinzierl, G., Ladendorf, O., Huber, S., Kahmann, R. und Kämper, J. 2002. The histone deacetylase Hda1 from *Ustilago maydis* is essential for teliospore development. Molecular Microbiology 46: 1169-1182.
- Reyes-Dominguez, Y., Bok, J.W., Berger, H., Shwab, E.K., Basheer, A., Gallmetzer, A., Scazzocchio, C., Keller, N. und Strauss, J. 2010. Heterochromatic marks are associated with the repression of secondary metabolism clusters in *Aspergillus nidulans*. Molecular Microbiology 76: 1376-1386.
- Reyes-Dominguez, Y., Boedi, S., Sulyok, M., Wiesenberger, G., Stoppacher, N., Krska, R. und Strauss, J. 2012. Heterochromatin influences the secondary metabolite profile in the plant pathogen *Fusarium graminearum*. Fungal Genetics and Biology 49: 39-47.
- Robinson, M. und Oshlack, A. 2010. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. Genome Biology 11: R25.
- Robinson, M.D. und Smyth, G.K. 2007. Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. Bioinformatics 23: 2881-2887.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. und Smyth, G.K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26: 139-140.
- Ryan, C.A. und Farmer, E.E. 1991. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology 42: 651-674.
- Sakaguchi, A. und Steward, R. 2007. Aberrant monomethylation of histone H4 lysine 20 activates the DNA damage checkpoint in *Drosophila melanogaster*. The Journal of Cell Biology 176: 155-162.
- Sakaguchi, A., Karachentsev, D., Seth-Pasricha, M., Druzhinina, M. und Steward, R. 2008. Functional Characterization of the *Drosophila* Hmt4-20/Suv4-20 Histone Methyltransferase. Genetics 179: 317-322.
- Saksouk, N., Simboeck, E. und Déjardin, J. 2015. Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. Epigenetics & Chromatin 8:3
- Sanders, S.L., Portoso, M., Mata, J., Bähler, J., Allshire, R.C. und Kouzarides, T. 2004. Methylation of Histone H4 Lysine 20 Controls Recruitment of Crb2 to Sites of DNA Damage. Cell 119: 603-614.

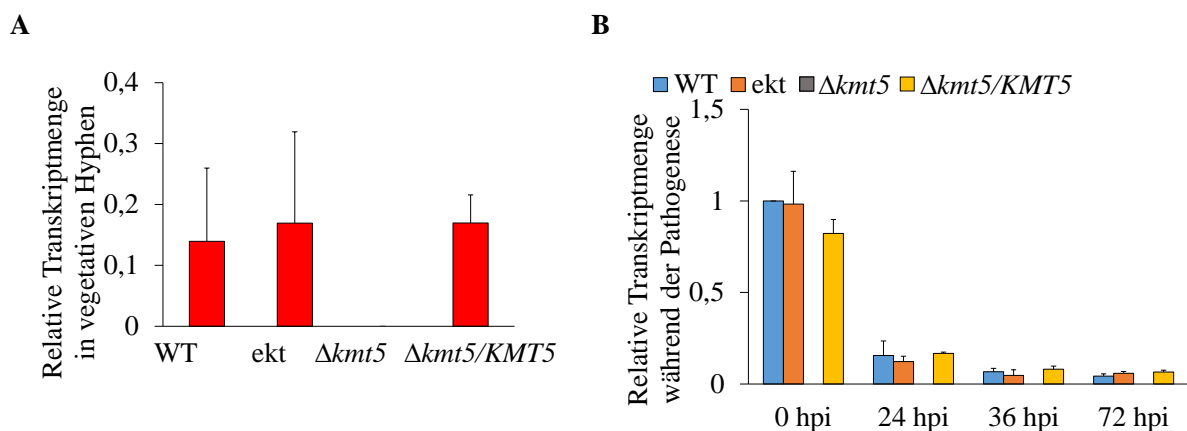
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Sarg, B., Helliger, W., Talasz, H., Koutzamani, E. und Lindner, H.H. 2004. Histone H4 Hyperacetylation Precludes Histone H4 Lysine 20 Trimethylation. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 53458-53464.
- Schotta, G., Lachner, M., Sarma, K., Ebert, A., Sengupta, R., Reuter, G., Reinberg, D. und Jenuwein, T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes & Development* 18: 1251-1262.
- Schotta, G., Sengupta, R., Kubicek, S., Malin, S., Kauer, M., Callén, E., Celeste, A., Pagani, M., Opravil, S., De La Rosa-Velazquez, I.A., Espejo, A., Bedford, M.T., Nussenzweig, A., Busslinger, M., und Jenuwein, T. 2008. A chromatin-wide transition to H4K20 monomethylation impairs genome integrity and programmed DNA rearrangements in the mouse. *Genes & Development* 22: 2048-2061.
- Sievert, C., Parmer, C., Hocking, T., Chamberlain, S., Ram, K., Corvellec, M. und Despouy, P. 2017. plotly: Create Interactive Web Graphics via 'plotly.js'. R package version 4.7.1. <https://CRAN.R-project.org/package=plotly>
- Soukup, A.A., Chiang, Y.M., Bok, J.W., Reyes-Dominguez, Y., Oakley, B.R., Wang, C.C.C., Strauss, J. und Keller, N.P. 2012. Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase EsaA increases activation of secondary metabolite production. *Molecular Microbiology* 86: 314-330.
- Soyer, J.L., El Ghalid, M., Glaser, N., Ollivier, B., Linglin, J. und Grandaubert, J., Balesdent, M.H., Connolly, L.R., Freitag, M., Rouxel, T. und Fudal, I. 2014. Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLOS Genetics*. 10:e1004227.
- Studt, L., Schmidt, F.J., Jahn, L., Sieber, C.M.K., Connolly, L.R., Niehaus, E.M., Freitag, M., Humpf, H.U. und Tudzynski, B. 2013. Two Histone Deacetylases, FfHda1 and FfHda2, Are Important for *Fusarium fujikuroi* Secondary Metabolism and Virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 7719-7734.
- Sugui, J.A. und Deising, H.B. 2002. Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize anthracnose disease development. *Molecular Plant Pathology* 3: 197-203.
- Sugui, J.A., Leite, B. und Nicholson, R.L. 1998. Partial characterization of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and germlings of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 411-425.
- Talbot, J.N., Kershaw, M.J., Wakley, G.E., de Vries, O.M.H., Wessels, J.G.H. und Hamer, J.E. 1996. *MPGI* Encodes a Fungal Hydrophobin Involved in Surface Interactions during Infection-Related Development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell* 8: 985-999.
- Talbot, J.N. 1999. Coming up for air and sporulation. *Nature* 398: 295-296.

- Tamaru, H. und Selker, E.U. 2001. A histone H3 methyltransferase controls DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nature* 414: 277-283.
- Thon, M.R., Nuckles, E.M. und Vaillancourt, L.J. 2000. Restriction Enzyme-Mediated Integration Used to Produce Pathogenicity Mutants of *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1356-1365.
- Tonukari, N.J., Scott-Craig, J.S. und Walton, J.D. 2000. The *Cochliobolus carbonum SNF1* gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. *Plant Cell* 12: 237-248.
- Torreblanca, J., Stumpferl, S. und Basse, C.W. 2003. Histone deacetylase Hda1 acts as repressor of the *Ustilago maydis* biotrophic marker gene *mig1*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 22-32.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G. und Dangl, J.L. 2006. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology* 141: 373-378.
- Trojer, P. und Reinberg, D. 2015. Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature? *Molecular Cell* 28:1-13.
- Tschiersch, B., Hofmann, A., Krauss, V., Dorn, R., Korge, G. und Reuter, G. 1994. The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes. *EMBO Journal* 13: 3822-3831.
- Turner, B.M. 2007. Histone tails: modifications and epigenetic information. In *Chromatin and Gene Regulation*, B.M. Turner, ed (Blackwell Science Ltd), pp. 59-74.
- Van Wetter, M.A., Schuren F.H.J., Schuur, T.A. und Wessels, J.G.H. 1996. Targeted mutation of the SC3 hydrophobin gene of *Schizophyllum commune* affects formation of aerial hyphae. *FEMS Microbiology Letters* 140: 265-269.
- Veerappan, C.S., Avramova, Z. und Moriyama, E.N. 2008. Evolution of SET-domain protein families in the unicellular and multicellular Ascomycota fungi. *BMC Evolutionary Biology* 8:190.
- Veneault-Fourrey, C., Laugé, R. und Langin, T. 2005. Nonpathogenic Strains of *Colletotrichum lindemuthianum* Trigger Progressive Bean Defense Responses during Appressorium-Mediated Penetration. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4761-4770.
- Wang, Y., Reddy, B., Thompson, J., Wang, H., Noma, K., Yates, J.R. und Jia, S. 2009. Regulation of Set9-Mediated H4K20 Methylation by a PWWP Domain Protein. *Molecular Cell* 33: 428-437.
- Wang, R., Leng, Y. und Zhong, S. 2015. The regulatory gene *VosA* affects conidiogenesis and is involved in virulence of the fungal cereal pathogen *Cochliobolus sativus*. *Fungal Biology* 119: 884-900.
- Warren, H.L., Nicholson, R.L., Ullstrup, A.J. und Sharvelle, E.G. 1973. Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. *The Plant Disease Reporter* 57: 143-144.

- Weihmann, F., Eisermann, I., Becher, R., Krijger, J.J., Hübner, K., Deising, H.B. und Wirsal, 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* 16: 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* 20: 1555-1567.
- Wessels, J.G.H. 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology* 32: 413-437.
- Wharton, P.S. und Julian, A.M. 1996. A cytological study of compatible and incompatible interactions between *Sorghum bicolor* and *Colletotrichum sublineolum*. *New Phytologist* 134: 25-34.
- Wharton, P.S., Julian, A.M. und O'Connell, R.J. 2001. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 91: 149-158.
- Whelan, S. und Goldman, N. 2001. A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Molecular Biology and Evolution* 18: 691-699.
- Wilson, G.W. 1914. The identity of the anthracnose of grasses in the United States. *Phytopathology* 4: 106-112.
- Wösten, H.A.B., van Wetter, M.A., Lugones, L.G., van der Mei, H.C., Busscher, H.J. und Wessels, J.G.H. 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current Biology* 9: 85-88.
- Wösten, H.A. 2001. Hydrophobins: multipurpose proteins. *Annual Review of Microbiology* 55: 625-646.
- Wu, C.T., und Morris, J.R. 2001. Genes, genetics, and epigenetics: a correspondence. *Science* 293: 1103-1105.
- Yang, H., Pesavento, J.J., Starnes, T.W., Cryderman, D.E., Wallrath, L.L., Kelleher, N.L. und Mizzen, C.A. 2008. Preferential Dimethylation of Histone H4 Lysine 20 by Suv4-20. *The Journal of Biological Chemistry* 283: 12085-12092.
- Yu, J.H., Hamari, Z., Han, K.H., Seo, J.A., Reyes-Domínguez, Y. und Scazzocchio, C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology* 41: 973-981.
- Zhang, Y. und Reinberg, D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes & Development* 15: 2343-2360.
- Zipfel, C. 2009. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 414-420.

## Anhang

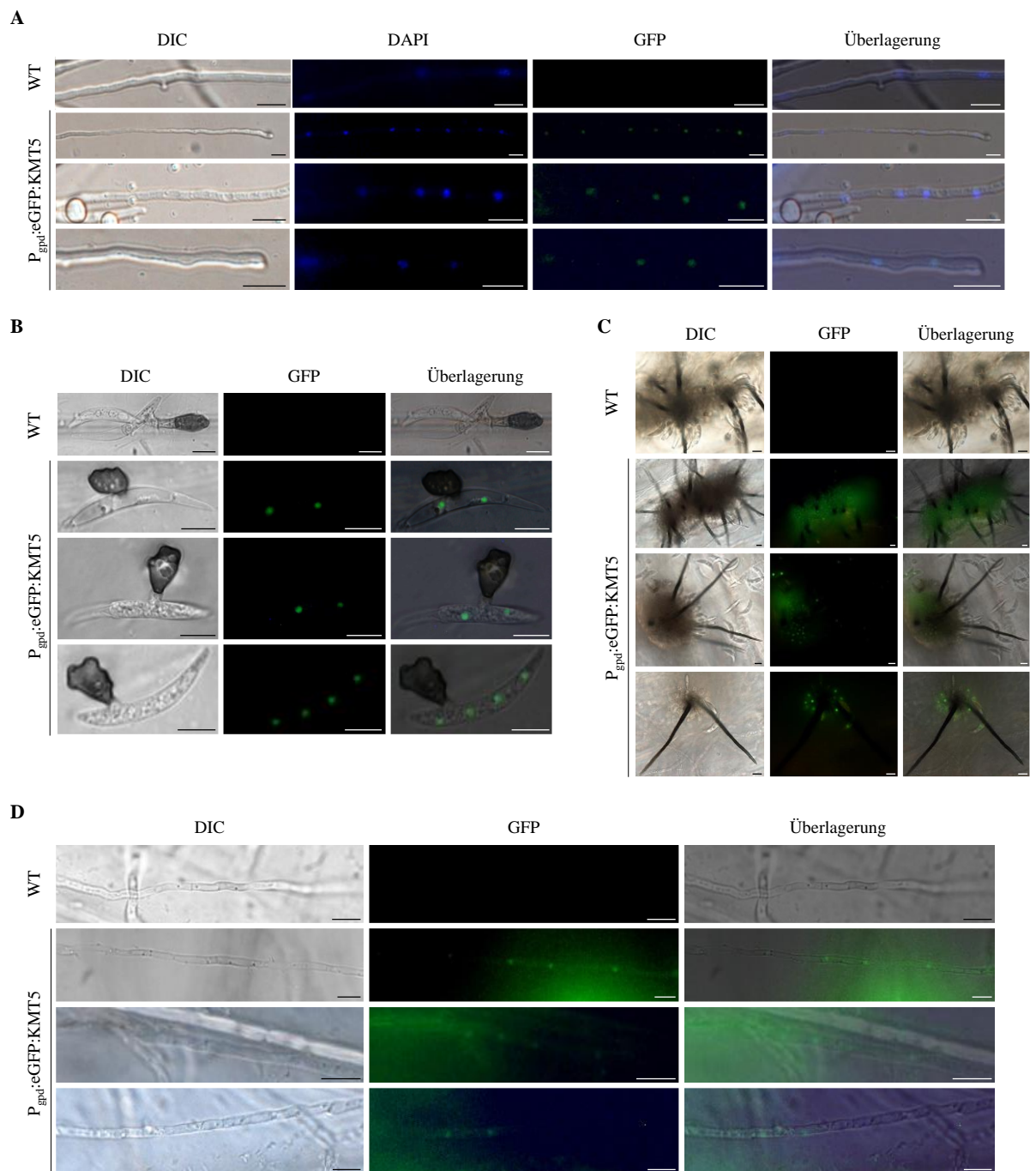
### I Relative *KMT5*-Transkriptmengen in vegetativen Hyphen und Infektionsstrukturen



**Abbildung 18: Relative *KMT5*-Transkriptmengen in vegetativen Hyphen und Infektionsstrukturen**

(A) Die mittels RT-qPCR bestimmten relativen *KMT5*-Transkriptmengen in sieben Tage alten vegetativen Hyphen des Wildtyps (WT), der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), der Deletionsmutante ( $\Delta kmt5$ ) und des genetisch komplementierten Isolats ( $\Delta kmt5/KMT5$ ). (B) Die mittels RT-qPCR im Verlauf der Maisblatt-Infektion bestimmten relativen *KMT5*-Transkriptmengen in Sporen (0 hpi), Appressorien (24 hpi), biotrohen (36 hpi) und nekrotrophen Hyphen (72 hpi) von WT, ekt,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$ . Die relativen Transkriptmengen werden im Verhältnis zu der *KMT5*-Transkriptmenge in Wildtyp-Konidien, deren Wert gleich eins gesetzt wurde, betrachtet. Die relativen *KMT5*-Transkriptmengen wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *CgHiston H3* und *CgActin* normiert (n = 3, T-Test, \* = p < 0,05).

## II Kernlokalisierung von Kmt5



**Abbildung 19: Kernlokalisierung von Kmt5**

(A) Lokalisation von Kmt5 in vegetativen Hyphen. Die Kernlokalisierung wurde durch DAPI-Färbung der DNA im Zellkern verifiziert. (B) Lokalisation von Kmt5 in Appressorien 24 hpi auf Zwiebelepidermen. (C) Kmt5 in Sporen von Acervuli auf der Oberfläche von infizierten Zwiebelepidermen 72 hpi. (D) Kmt5-Lokalisierung in Zellkernen von sekundären Hyphen 72 hpi in infizierten Zwiebelepidermen. Maßstab = 10  $\mu$ m

### III Kandidatengene für RT-qPCR

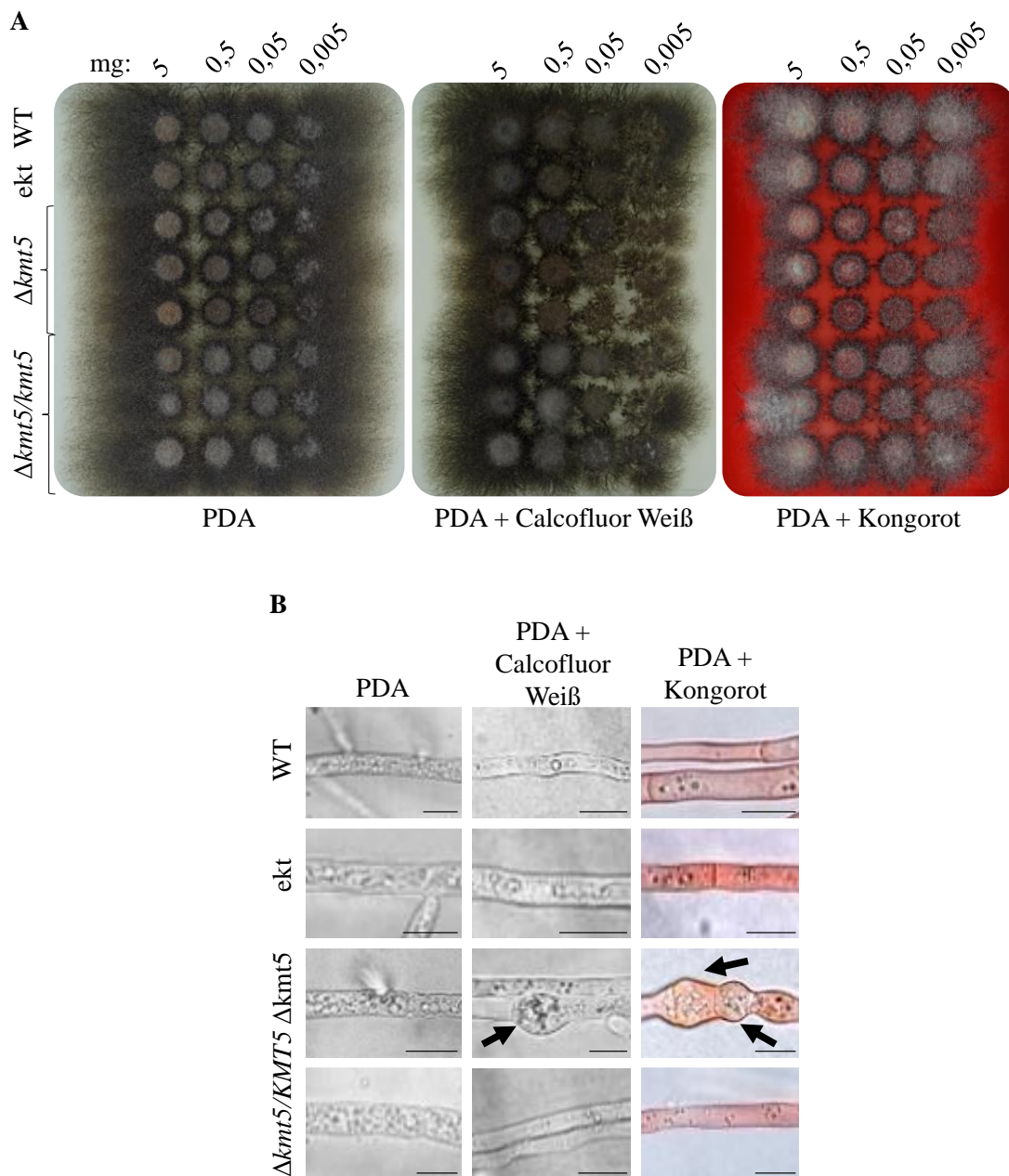
**Tabelle 33: Kandidatengene für RT-qPCR**

Dargestellt sind die logFC-Werte in vegetativen Hyphen, Sporen 0 hpi auf Maisblättern und nekrotrophen Hyphen 72 hpi in Maisblättern. Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq wurden von Gunnar Hönig ausgeführt. Hellgraue Felder zeigen eine erhöhte Transkriptmenge, dunkelgraue Felder zeigen eine verringerte Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$  im Vergleich zum Wildtyp.

Gennummer	Name	Beschreibung	vegetative Hyphen	Sporen	72 hpi
<b>CAZymes</b>					
GLRG_06645	<i>PGN1</i>	Endo-Polygalacturonase	0,81	3,79	0,67
GLRG_09366	<i>EGL1</i>	GPI-verankerte Zellwand $\beta$ -1,3-Endoglucanase	4,87	1,75	0,44
<b>Hydrophobine</b>					
GLRG_10074	<i>HFB1</i>	Hydrophobin 1	-11,74	3,34	2,79
GLRG_11190	<i>HFB2</i>	Hydrophobin 2	n.a.	n.a.	n.a.
GLRG_11603	<i>HFB3</i>	Hydrophobin 3	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Sekundärmetabolit-Cluster</b>					
GLRG_02583	<i>PKS32</i>	Polyketidsynthase 32	6,89	0,32	-6,57
GLRG_02266	<i>VEL1</i>	Velvet	0,55	0,68	-0,65
GLRG_04203	<i>PKS1</i>	Polyketidsynthase 1	-3,46	-1,07	-0,35
GLRG_07958	<i>HYP14</i>	Hypothetisches Protein	5,49	1,25	-0,36
GLRG_08623	<i>MCO18</i>	Multicopper Oxidase (Cluster18)	8,5	-3,93	-1,89
GLRG_08633	<i>BML1</i>	Metallo- $\beta$ -Lactamase	-0,16	2,25	0,22
GLRG_08949	<i>MCO19</i>	Multicopper Oxidase (Cluster19)	6,35	1,32	-1,82
GLRG_09078	<i>MPR1</i>	<i>High-affinity methionine permease</i>	-0,25	-5,66	3,32
GLRG_09622	<i>VOS1</i>	Velvet	8,5	6,21	-0,16
GLRG_11630	<i>PCD34</i>	<i>Phytanoyl-CoA dioxygenase</i>	9,81	-0,62	0,31
GLRG_11888	<i>OXR42</i>	Oxidoreductase	10,07	0	1,07
<b>Transkriptionsfaktor</b>					
GLRG_08797	<i>XPP1</i>	<i>Xylanase promoter binding protein 1</i>	-1,81	-0,17	0,16



#### IV Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot



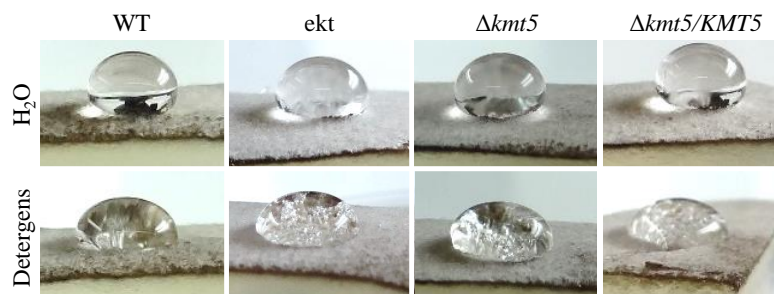
**Abbildung 20: Sensitivität gegenüber Calcofluor Weiß und Kongorot**

(A) Phänotyp der Kolonien von Wildtyp (WT), Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), drei unabhängigen Deletionsmutanten ( $\Delta kmt5$ ) und drei unabhängigen genetisch komplementierten Isolaten ( $\Delta kmt5/KMT5$ ) auf PDA mit und ohne Calcofluor Weiß oder Kongorot nach sieben Tagen Kultivierung. Die Inokulation wurde mit einer definierten Myzelmasse durchgeführt. (B) Mikroskopische Untersuchung der Hyphenmorphologie von WT, ekt,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  auf PDA mit und ohne Calcofluor Weiß oder Kongorot. Pfeile markieren blasenförmige Veränderungen der Hyphen. Maßstab = 10  $\mu$ m

## V Analyse der Benetzbarkeit von Myzel und Sporen

Durch RNA-Seq- und RT-qPCR-Analysen wurde eine im Vergleich zu Wildtyp-Hyphen dramatisch verringerte *HFBI*-Transkriptmenge in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen nachgewiesen (

Tabelle 33, Abbildung 8B, Abbildung 11A). Der Verlust der meisten Hydrophobin-Gene in Pilzen erzeugte Mutanten, deren Oberfläche sehr einfach zu benetzen ist (Kim *et al.*, 2005). In *M. oryzae* dient Hydrophobin zudem wahrscheinlich als Sensor für die hydrophobe Blattoberfläche (Talbot *et al.*, 1996). Um einen möglichen Einfluss der geringen Hydrophobin-Transkriptabundanz auf die hydrophoben Eigenschaften der Sporen und vegetativen Hyphen beurteilen zu können, wurde ihre Benetzbarkeit analysiert. Es wurden der Wildtyp, die Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette, drei unabhängige Deletionsmutanten sowie drei unabhängige genetisch komplementierte Isolate getestet. Auf die Oberfläche von 14 Tage alten OMA- und PDA-Kulturen wurde je ein 50  $\mu$ l Wassertropfen oder Detergens (0,2 % (w/v) SDS, 50 mM EDTA) gegeben (Abbildung 21). Die Oberfläche der OMA-Kulturen ist vollständig mit Sporen bedeckt, sodass die Eigenschaften der Sporen ermittelt werden können. Die Form der Tropfen auf den verschiedenen Isolaten wurde verglichen, indem das Verhältnis von Höhe zu Breite bestimmt wurde. Für alle untersuchten Isolate ergab sich für die Wassertropfen auf PDA ein Verhältnis von 0,7 zu 1 und auf OMA von 0,1 zu 1. Die Detergentropfen ergaben auf PDA ein Verhältnis von 0,5 zu 1, auf OMA von 0,1 zu 1. Demnach konnte für  $\Delta kmt5$  kein Unterschied in den hydrophoben Eigenschaften der Sporen und Hyphen nachgewiesen werden.



**Abbildung 21: Wasser- und Detergentropfen zur Analyse der Benetzbarkeit auf der Oberfläche von Myzel**  
Dargestellt sind 50  $\mu$ l Tropfen von Wasser oder Detergens auf Myzel des Wildtyps (WT), der Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  und des genetisch komplementierten Isolats  $\Delta kmt5/KMT5$ , welches 14 Tage auf PDA kultiviert wurde.

## VI Die jeweils 250 Gene mit am meisten erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in $\Delta kmt5$

**Tabelle 34: Die jeweils 250 Gene mit am meisten erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in  $\Delta kmt5$**

Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq wurden von Gunnar Hönig ausgeführt. Die Einteilung in funktionelle Kategorien und die Beschreibung der Gene erfolgte nach O'Connell *et al.* (2012). Die Mitglieder der jeweiligen *glycosyl hydrolase family* wurden der Internetseite <https://www.cazypedia.org> (Stand: 27.11.2018) entnommen. Informationen zu der *glycosyl transferase group 1* stammen von der Internetseite <https://www.ebi.ac.uk/interpro/> (Stand: 27.11.2018). rot = Gene der Kategorie *Secondary metabolism clusters*, blau = Gene der Kategorie *CAZymes family*, grün = Gene der Kategorie *Effector*

Gen	logFC	Funktionelle Kategorie	Beschreibung	Cluster
GLRG_10074 ( <i>HFBI</i> )	-11,74	NA	<i>fungus hydrophobin</i>	
GLRG_11752	-10,29	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04076	-9,69	<i>Transporter family</i>	<i>Sodium:dicarboxylate symporter family protein</i>	
GLRG_04774	-9,58	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09947	-9,55	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11749	-9,51	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11069	-9,45	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07207	-9,38	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11114	-9,30	NA	<i>histone-lysine N-methyltransferase SET9</i>	
GLRG_05713	-9,06	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>RTA1 like protein</i>	8
GLRG_01738	-8,98	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 11 (endo-<math>\beta</math>-1,4-xylanases)</i>	
GLRG_03505	-8,69	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>hypothetical protein</i>	5
GLRG_11444	-8,41	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01765	-8,03	NA	<i>alcohol dehydrogenase GroES-like domain-containing protein</i>	
GLRG_05681	-7,91	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07140	-7,69	<i>Effector</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08555	-7,64	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04581	-7,19	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01205	-7,06	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	
GLRG_01776	-6,95	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00347	-6,94	<i>Transporter family</i>	<i>hypothetical protein - quinate permease (988-1960 1214-1527)</i>	
GLRG_09457	-6,91	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09807	-6,74	<i>CAZymes family</i>	<i>fungus cellulose binding domain-containing protein</i>	
GLRG_01187	-6,73	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>cytochrome P450</i>	
GLRG_09749	-6,53	NA	<i>HK97 family phage prohead protease</i>	
GLRG_09070	-6,33	<i>Secondary Metabolism clusters#CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monoxygenases)</i>	20
GLRG_09748	-6,25	NA	<i>beta-lactamase</i>	
GLRG_10836	-6,20	<i>Transporter family</i>	<i>sulfate permease</i>	

GLRG_11872	-6,17	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_09507	-5,98	CAZymes family	hypothetical protein	
GLRG_11723	-5,95	NA	hypothetical protein	
GLRG_06861	-5,93	Effector	hypothetical protein	
GLRG_09802	-5,91	Cytochrome P450s family	cytochrome P450	
GLRG_00958	-5,83	NA	hypothetical protein	
GLRG_11427	-5,80	Secondary Metabolism clusters	hypothetical protein	30
GLRG_08045	-5,77	NA	hypothetical protein	
GLRG_02127	-5,72	NA	hypothetical protein	
GLRG_04432	-5,69	NA	integral membrane protein	
GLRG_09601	-5,67	Transporter family	Sodium:neurotransmitter symporter family protein	
GLRG_07101	-5,63	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_11783	-5,56	NA	hypothetical protein	
GLRG_08165	-5,46	CAZymes family	glycosyl hydrolase family 10 (endo-beta-1,3-xylanase activity, endo-beta-1,4-xylanases)	
GLRG_08006	-5,35	NA	hypothetical protein	
GLRG_09712	-5,31	Secondary Metabolism clusters	alpha/beta hydrolase	22
GLRG_10067	-5,27	Transporter family	POT family protein	
GLRG_09966	-5,26	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_07398	-5,26	NA	male sterility protein	
GLRG_05330	-5,25	NA	NADPH-dependent FMN reductase	
GLRG_07601	-5,25	NA	FAD binding domain-containing protein	
GLRG_08940	-5,23	Secondary Metabolism clusters	hypothetical protein	19
GLRG_05314	-5,22	NA	thermostable beta-glucosidase B	
GLRG_07092	-5,22	NA	aldehyde dehydrogenase	
GLRG_07506	-5,20	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_06512	-5,12	Cytochrome P450s family	cytochrome P450	
GLRG_00845	-5,12	NA	hypothetical protein	
GLRG_09825	-5,08	NA	hypothetical protein	
GLRG_02518	-5,08	NA	hypothetical protein	
GLRG_11747	-5,07	NA	hypothetical protein	
GLRG_06248	-5,07	Transporter family	glucose/galactose transporter	
GLRG_08467	-5,06	NA	hypothetical protein	
GLRG_00533	-5,05	NA	short chain dehydrogenase	
GLRG_00971	-5,04	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_11104	-4,99	NA	amidase	
GLRG_02945	-4,94	NA	hypothetical protein	
GLRG_01913	-4,94	NA	X-Pro dipeptidyl-peptidase C-terminal non-catalytic domain-containing protein	
GLRG_11501	-4,87	Secondary Metabolism clusters	hypothetical protein	31

GLRG_11422	-4,84	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>FAD binding domain-containing protein</i>	29
GLRG_08002	-4,82	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01912	-4,80	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11052	-4,79	NA	<i>O-acetylhomoserine aminocarboxypropyltransferase/cysteine synthase</i>	
GLRG_02125	-4,77	NA	<i>AFUA_2G17970 family ergot alkaloid biosynthesis protein</i>	
GLRG_10973	-4,76	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06855	-4,76	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08875	-4,73	<i>CAZymes family</i>	<i>melibiase</i>	
GLRG_11985	-4,70	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09681	-4,69	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monoxygenases)</i>	
GLRG_09490	-4,64	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	
GLRG_09110	-4,59	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_03066	-4,59	<i>Transcription factors family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10477	-4,58	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>cytochrome P450</i>	
GLRG_02944	-4,58	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 45 (endoglucanases)</i>	
GLRG_00925	-4,56	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09012	-4,55	<i>CAZymes family</i>	<i>pectate lyase</i>	
GLRG_11382	-4,48	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05797	-4,47	<i>Transporter family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09506	-4,47	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09724	-4,45	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02045	-4,45	NA	<i>NAD dependent epimerase/dehydratase</i>	
GLRG_11419	-4,43	NA	<i>CFEM domain-containing protein</i>	
GLRG_00304	-4,41	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08001	-4,37	NA	<i>short chain dehydrogenase</i>	
GLRG_08012	-4,36	<i>Transporter family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08206	-4,31	NA	<i>beta xylanase</i>	
GLRG_01844	-4,31	<i>CAZymes family</i>	<i>polysaccharide deacetylase</i>	
GLRG_11994	-4,30	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01138	-4,27	<i>Transporter family</i>	<i>hypothetical protein - lactose permease (160-2279 2200-2277)</i>	
GLRG_07969	-4,26	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01482	-4,25	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09714	-4,25	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>alcohol dehydrogenase GroES-like domain-containing protein</i>	22
GLRG_06687	-4,24	<i>Transcription factors family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05942	-4,24	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09020	-4,23	NA	<i>endoribonuclease L-PSP</i>	
GLRG_07529	-4,19	NA	<i>short-chain dehydrogenase/reductase family Oxidoreductase</i>	
GLRG_06525	-4,18	NA	<i>hypothetical protein</i>	

GLRG_01096	-4,18	NA	hypothetical protein - WD domain-containing protein (1074-2079)	
GLRG_10499	-4,16	Cytochrome P450s family	cytochrome P450	
GLRG_00801	-4,16	Transporter family	sodium/hydrogen exchanger family protein	
GLRG_00800	-4,16	CAZymes family	glycosyl hydrolase family 28 (hydrolyse the $\alpha$ -1,4 glycosidic linkage between galacturonate residues in polygalacturonic acid; polygalacturonase, exo-polygalacturonase, exo-polygalacturonase, rhamnogalacturonase)	
GLRG_04088	-4,16	Transporter family	hypothetical protein	
GLRG_06734	-4,15	NA	hypothetical protein	
GLRG_11473	-4,11	NA	acyltransferase	
GLRG_01737	-4,10	NA	hypothetical protein	
GLRG_09710	-4,07	Secondary Metabolism clusters	hypothetical protein	22
GLRG_02165	-4,07	CAZymes family	cellulase	
GLRG_11495	-4,06	NA	hypothetical protein	
GLRG_01642	-4,05	NA	hypothetical protein	
GLRG_02128	-4,00	CAZymes family	cutinase	
GLRG_09610	-3,94	NA	phosphate transporter	
GLRG_10845	-3,94	NA	heterokaryon incompatibility protein	
GLRG_10711	-3,92	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_02122	-3,90	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_01934	-3,90	Cytochrome P450s family	cytochrome P450	
GLRG_09843	-3,88	Secondary Metabolism clusters#Cytochrome P450s family	cytochrome P450	23
GLRG_09603	-3,85	NA	short chain dehydrogenase	
GLRG_05710	-3,84	Secondary Metabolism clusters	zinc-binding dehydrogenase	8
GLRG_00940	-3,82	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_08900	-3,82	NA	GPI anchored serine-threonine rich protein	
GLRG_00631	-3,79	NA	hypothetical protein	
GLRG_11847	-3,77	NA	kelch domain-containing protein	
GLRG_02056	-3,76	NA	hypothetical protein	
GLRG_05301	-3,74	NA	hypothetical protein	
GLRG_03701	-3,74	NA	WSC domain-containing protein	
GLRG_04201	-3,73	NA	short chain dehydrogenase	
GLRG_09334	-3,73	NA	ribose 5-phosphate isomerase	
GLRG_07839	-3,72	NA	hypothetical protein	
GLRG_11101	-3,72	Transporter family	transmembrane amino acid transporter	
GLRG_01850	-3,69	NA	hypothetical protein	
GLRG_10966	-3,69	NA	hypothetical protein	
GLRG_00813	-3,67	NA	Peroxidase	



GLRG_00456	-3,67	NA	<i>methyltransferase domain-containing protein</i>
GLRG_10583	-3,67	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_02464	-3,65	<i>Effector</i>	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_00048	-3,64	NA	<i>methyltransferase domain-containing protein</i>
GLRG_09304	-3,63	NA	<i>short chain dehydrogenase</i>
GLRG_04769	-3,63	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07986	-3,61	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>cytochrome P450</i>
GLRG_11096	-3,59	NA	<i>calcineurin-like phosphoesterase</i>
GLRG_05280	-3,57	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_09420	-3,56	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10654	-3,56	<i>CAZymes family</i>	<i>PHB depolymerase family esterase</i>
GLRG_07347	-3,55	<i>Effector</i>	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_02334	-3,51	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07543	-3,50	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11302	-3,49	<i>Transcription factors family</i>	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07440	-3,48	NA	<i>stress responsive A/B Barrel domain-containing protein</i>
GLRG_05344	-3,48	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_02130	-3,47	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_09093	-3,47	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_05250	-3,47	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_04203 (PKSI)	-3,46	NA	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>
GLRG_00844	-3,46	NA	<i>acetoin reductase</i>
GLRG_11303	-3,46	<i>CAZymes family</i>	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_10468	-3,45	<i>CAZymes family</i>	<i>Cutinase</i>
GLRG_07681	-3,45	NA	<i>scytalone dehydratase</i>
GLRG_00365	-3,44	<i>CAZymes family</i>	<i>hypothetical protein - beta-glucuronidase (1216-1315 733-860)</i>
GLRG_10640	-3,44	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>
GLRG_06041	-3,44	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_00974	-3,43	NA	<i>tol protein</i>
GLRG_11300	-3,42	NA	<i>FAD binding domain-containing protein</i>
GLRG_07267	-3,42	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07257	-3,42	<i>Transcription factors family</i>	<i>fungus specific transcription factor domain-containing protein</i>
GLRG_09043	-3,42	NA	<i>G-protein coupled receptor</i>
GLRG_10031	-3,40	NA	<i>GMC oxidoreductase</i>
GLRG_01818	-3,40	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>linoleate diol synthase</i>
GLRG_07401	-3,40	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10052	-3,39	<i>Transcription factors family#Secreted proteases family</i>	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_09741	-3,39	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>cytochrome P450</i>
GLRG_11258	-3,39	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07556	-3,38	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 16</i>

			(keratan-sulfate endo-1,4- $\beta$ -galactosidases, endo-1,3- $\beta$ -galactanases, endo-1,3- $\beta$ -glucanases, endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanases, licheninases, $\beta$ -agarases, $\beta$ -porphyranases, $\kappa$ -carrageenases, endo-xyloglucanases)	
GLRG_11028	-3,38	Cytochrome P450s family	cytochrome P450	
GLRG_02090	-3,38	NA	hypothetical protein	
GLRG_10780	-3,36	NA	CFEM domain-containing protein	
GLRG_09534	-3,36	Effector	hypothetical protein	
GLRG_11551	-3,36	CAZymes family	fungal cellulose binding domain-containing protein	
GLRG_05148	-3,36	NA	hypothetical protein	
GLRG_01204	-3,35	CAZymes family	hypothetical protein	
GLRG_08373	-3,34	NA	hypothetical protein	
GLRG_07604	-3,33	NA	hypothetical protein	
GLRG_10655	-3,33	NA	dynamain family protein	
GLRG_03681	-3,32	Transporter family	triose-phosphate transporter	
GLRG_06863	-3,32	NA	hypothetical protein	
GLRG_02160	-3,30	Cytochrome P450s family	cytochrome P450	
GLRG_11308	-3,30	NA	Rieske domain-containing protein	
GLRG_00351	-3,27	NA	Carboxylesterase	
GLRG_03680	-3,26	NA	hypothetical protein	
GLRG_11838	-3,26	Secondary Metabolism clusters#Transporter family	major facilitator superfamily transporter	38
GLRG_11306	-3,24	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_01923	-3,24	NA	ATPase	
GLRG_09088	-3,24	Transporter family	2OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein	
GLRG_04193	-3,23	NA	RTAI domain-containing protein	
GLRG_11686	-3,23	NA	hypothetical protein	
GLRG_11741	-3,23	Transporter family	potassium/sodium efflux P-type ATPase	
GLRG_01091	-3,23	NA	short chain dehydrogenase	
GLRG_11421	-3,22	Secondary Metabolism clusters	major facilitator superfamily transporter	29
GLRG_07206	-3,19	NA	hypothetical protein	
GLRG_10250	-3,17	NA	biotin/lipoate A/B protein ligase	
GLRG_09731	-3,17	Transporter family	calcium-translocating P-type ATPase	
GLRG_08927	-3,17	NA	hypothetical protein	
GLRG_09761	-3,17	NA	hypothetical protein	
GLRG_05543	-3,16	NA	hypothetical protein	
GLRG_00828	-3,16	NA	methyltransferase domain-containing protein	
GLRG_09103	-3,15	NA	2-dehydropantoate 2-reductase	
GLRG_08216	-3,14	CAZymes family	glycosyl transferase group 1 (transfer of activated sugars to glycogen, Fructose-6-phosphate and lipopolysaccharides and transfer of UDP, ADP, GDP or CMP linked sugars)	
GLRG_05283	-3,13	NA	hypothetical protein	



GLRG_00867	-3,12	NA	<i>protein kinase domain-containing protein</i>	
GLRG_09805	-3,12	<i>Transporter family</i>	<i>amino acid permease</i>	
GLRG_05300	-3,12	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09977	-3,10	NA	<i>integral membrane protein</i>	
GLRG_00564	-3,10	NA		
GLRG_05287	-3,10	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06173	-3,09	NA	<i>kelch repeat protein</i>	
GLRG_11464	-3,09	NA	<i>NAD dependent epimerase/dehydratase</i>	
GLRG_01658	-3,09	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04955	-3,09	NA	<i>F-box domain-containing protein</i>	
GLRG_09069	-3,08	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>NAD dependent epimerase/dehydratase</i>	20
GLRG_11304	-3,08	NA	<i>short chain dehydrogenase</i>	
GLRG_11466	-3,08	NA	<i>sugar transporter</i>	
GLRG_11904	-3,04	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>cytochrome P450</i>	
GLRG_06625	-3,04	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05542	-3,04	NA	<i>Tetratricopeptide</i>	
GLRG_00067	-3,02	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08082	-3,02	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06023	-3,02	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00454	-3,01	<i>Cytochrome P450s family</i>	<i>cytochrome P450</i>	
GLRG_07276	-3,01	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00883	-3,01	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02994	-3,00	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08974	-3,00	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 7 (endo-1,4-<math>\beta</math>-glucanase, cellobiohydrolase, chitosanase, endo-1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanase)</i>	
GLRG_02907	-3,00	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00583	-2,99	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_03176	-2,99	NA	<i>D-sorbose</i>	
GLRG_01517	-2,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09508	-2,98	NA	<i>Peroxidase</i>	
GLRG_01910	-2,97	NA	<i>heterokaryon incompatibility protein</i>	
GLRG_10198	-2,97	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07557	-2,97	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09607	-2,96	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00841	-2,96	<i>Effector</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09279	-2,96	<i>Transcription factors family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11307	-2,96	NA	<i>2OG-Fe(II) oxygenase superfamily protein</i>	
GLRG_10015	7,66	NA	<i>cell wall protein</i>	
GLRG_10257	7,66	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	
GLRG_00336	7,73	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00497	7,73	NA	<i>NUDIX domain-containing protein</i>	
GLRG_00602	7,73	NA	<i>hypothetical protein</i>	

GLRG_00978	7,73	NA	<i>integral membrane protein</i>	
GLRG_01566	7,73	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04797	7,73	<i>Secreted proteases family</i>	<i>zinc carboxypeptidase</i>	
GLRG_06009	7,73	NA	<i>late sexual development protein</i>	
GLRG_09006	7,73	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00086	7,80	NA	<i>Carboxylesterase</i>	
GLRG_00139	7,80	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02077	7,80	NA	<i>TPR domain-containing protein</i>	
GLRG_06407	7,80	NA	<i>tyrosine phosphatase</i>	
GLRG_06601	7,80	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07579	7,80	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	
GLRG_07761	7,80	NA	<i>glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme</i>	
GLRG_08516	7,80	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11423	7,80	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>aromatic prenyltransferase</i>	29
GLRG_11474	7,80	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyltransferase sugar-binding region containing DXD domain-containing protein</i>	
GLRG_11522	7,80	NA	<i>carbohydrate-binding cytochrome b562</i>	
GLRG_01053	7,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01735	7,86	<i>Effector</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02349	7,86	NA	<i>bucentaur or craniofacial development</i>	
GLRG_02761	7,86	NA	<i>endoribonuclease L-PSP</i>	
GLRG_05014	7,86	<i>Transcription factors family</i>	<i>replication factor A protein 3</i>	
GLRG_06922	7,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07832	7,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08349	7,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08464	7,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10649	7,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11246	7,86	NA	<i>short chain dehydrogenase</i>	
GLRG_00255	7,92	NA	<i>Acetyltransferase</i>	
GLRG_02660	7,92	NA	<i>Acyltransferase</i>	
GLRG_02840	7,92	NA	<i>cyanamide hydratase family HD domain-containing protein</i>	
GLRG_03103	7,92	NA	<i>initiator tRNA phosphoribosyl transferase</i>	
GLRG_03556	7,92	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06111	7,92	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06380	7,92	NA	<i>CFEM domain-containing protein</i>	
GLRG_07366	7,92	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00330	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01866	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01998	7,98	<i>Transporter family</i>	<i>hypothetical protein - sugar transporter (484-1654)</i>	
GLRG_02114	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06099	7,98	NA	<i>APSES transcription factor Xbp1</i>	
GLRG_07266	7,98	NA	<i>cytidine and deoxycytidylate deaminase zinc-binding region</i>	

GLRG_07535	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_08160	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_08451	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10106	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10578	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11045	7,98	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_01716	8,04	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_03499	8,04	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10313	8,04	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10550	8,04	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10637	8,04	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10878	8,04	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11636	8,04	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>
GLRG_03616	8,09	<i>CAZymes family</i>	<i>alpha amylase</i>
GLRG_03845	8,09	NA	<i>MutS domain V</i>
GLRG_04817	8,09	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_06137	8,09	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07408	8,09	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10669	8,09	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11796	8,09	<i>CAZymes family</i>	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_00680	8,14	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_03361	8,14	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_03454	8,14	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_04039	8,14	NA	<i>arsenical-resistance protein</i>
GLRG_04693	8,14	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_05668	8,14	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07141	8,14	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_08535	8,14	NA	<i>hemerythrin HHE cation binding domain-containing protein</i>
GLRG_11267	8,14	<i>CAZymes family</i>	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11631	8,14	NA	<i>Oxidoreductase</i>
GLRG_00166	8,19	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_04383	8,19	NA	<i>Acetyltransferase</i>
GLRG_06014	8,19	NA	<i>aminotransferase class-III</i>
GLRG_06697	8,19	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_09945	8,19	NA	<i>NAD dependent epimerase/dehydratase</i>
GLRG_01112	8,24	NA	<i>Acetyltransferase</i>
GLRG_04471	8,24	<i>Transcription factors family</i>	<i>fungus specific transcription factor domain-containing protein</i>
GLRG_05589	8,24	NA	<i>Peroxidase</i>
GLRG_05818	8,24	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11391	8,24	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11696	8,24	NA	<i>SAM-dependent methyltransferase</i>
GLRG_11928	8,24	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_06699	8,29	NA	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_03510	8,34	NA	<i>Amidohydrolase</i>
GLRG_06387	8,34	NA	<i>hypothetical protein</i>

GLRG_06955	8,34	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07024	8,34	CAZymes family	<i>alpha-galactosidase</i>	
GLRG_11289	8,34	NA	<i>beta-lactamase</i>	
GLRG_03323	8,38	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05592	8,38	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06034	8,38	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06554	8,38	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06710	8,38	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10182	8,38	Transcription factors family	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00006	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01952	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02734	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_03354	8,42	NA	Acetyltransferase	
GLRG_03428	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04831	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05289	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07057	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07913	8,42	NA	<i>alpha/beta hydrolase fold protein</i>	
GLRG_08027	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09149	8,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11894	8,42	CAZymes family	Glucosyltransferase	
GLRG_01136	8,46	NA	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_01573	8,46	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05507	8,46	CAZymes family	glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monoxygenases)	
GLRG_06079	8,46	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09504	8,46	NA	class II Aldolase and Adducin domain-containing protein	
GLRG_00875	8,50	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02405	8,50	NA	C-5 cytosine-specific DNA methylase	
GLRG_03125	8,50	NA	phosphorylase superfamily protein	
GLRG_07537	8,50	NA	tat pathway signal sequence	
GLRG_08623 (MCO18)	8,50	Secondary Metabolism clusters	multicopper oxidase	18
GLRG_08972	8,50	NA	acetyltransferase/esterase	
GLRG_09622 (VOS1)	8,50	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09719	8,50	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00560	8,54	Transporter family	major facilitator superfamily transporter	
GLRG_01305	8,54	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_03531	8,54	Transporter family	amino acid permease	
GLRG_10472	8,54	NA	hydantoinase B/oxoprolinase	
GLRG_10775	8,54	NA	peptidase S33	
GLRG_11413	8,54	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00996	8,58	NA	C6 zinc finger domain-containing protein	

GLRG_05032	8,58	NA	<i>hypothetical protein</i>	
<b>GLRG_07872</b>	<b>8,58</b>	<b>Secondary Metabolism clusters</b>	<b><i>hypothetical protein</i></b>	<b>13</b>
GLRG_00950	8,62	NA	<i>ubiquitin-conjugating enzyme</i>	
GLRG_01712	8,62	<i>Transporter family</i>	<i>purine-cytosine permease FCY21</i>	
GLRG_11458	8,62	<i>Transcription factors family</i>	<i>6-O-methylguanine DNA methyltransferase</i>	
GLRG_00232	8,66	NA	<i>amino acid adenylation domain-containing protein</i>	
GLRG_03272	8,66	NA	<i>integral membrane family protein</i>	
GLRG_04326	8,66	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01048	8,73	NA	<i>peptidyl-tRNA hydrolase</i>	
GLRG_09121	8,73	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11352	8,73	NA	<i>cell surface protein</i>	
GLRG_09648	8,76	NA	<i>hypothetical protein</i>	
<b>GLRG_10318</b>	<b>8,76</b>	<b>Secondary metabolism clusters</b>	<b><i>FAD binding domain-containing protein</i></b>	<b>25</b>
GLRG_11335	8,76	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	
GLRG_01105	8,79	NA	<i>Subtilase</i>	
GLRG_02975	8,79	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04638	8,79	NA	<i>RNA recognition domain-containing protein</i>	
GLRG_06436	8,79	NA	<i>peptidase S41 family protein</i>	
GLRG_07718	8,79	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09936	8,79	NA	<i>adenosine deaminase</i>	
GLRG_01802	8,83	<i>Transcription factors family</i>	<i>fungal specific transcription factor domain-containing protein</i>	
GLRG_05865	8,83	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07752	8,83	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10128	8,83	NA	<i>Amidohydrolase</i>	
GLRG_10980	8,83	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_00902	8,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06048	8,86	NA	<i>cation transporter</i>	
GLRG_01596	8,89	NA	<i>glutaredoxin-like domain-containing protein</i>	
GLRG_04141	8,89	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02526	8,92	<i>Transcription factors family</i>	<i>basic region leucine zipper</i>	
GLRG_10094	8,92	NA	<i>endoribonuclease L-PSP</i>	
GLRG_10854	8,92	NA	<i>nitric oxide synthase</i>	
GLRG_02375	8,95	NA	<i>DNA topoisomerase</i>	
GLRG_03498	8,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11255	8,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
<b>GLRG_11879</b>	<b>8,98</b>	<b>Secondary metabolism clusters</b>	<b><i>methyltransferase domain-containing protein</i></b>	<b>41</b>
GLRG_05586	9,01	NA	<i>glutathione-dependent formaldehyde-activating enzyme</i>	
GLRG_07106	9,03	<i>Transporter family</i>	<i>ABC transporter</i>	
GLRG_07791	9,03	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09419	9,03	NA	<i>carbonic anhydrase</i>	

GLRG_09424	9,03	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06249	9,06	NA	<i>aldo/keto reductase</i>	
GLRG_01231	9,09	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06227	9,09	<i>Transporter family</i>	<i>ABC transporter</i>	
GLRG_09355	9,09	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_03508	9,11	NA	<i>O-methyltransferase</i>	
GLRG_04320	9,11	NA	<i>fasciclin domain-containing protein</i>	
GLRG_00418	9,17	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07622	9,17	NA	<i>dipeptidase domain-containing protein</i>	
GLRG_04214	9,24	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09869	9,24	NA	<i>HORMA domain-containing protein</i>	
GLRG_08508	9,26	NA	<i>D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase</i>	
GLRG_09416	9,26	NA	<i>heterokaryon incompatibility protein</i>	
GLRG_06403	9,29	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07388	9,29	NA	<i>6-phosphofructo-2-kinase</i>	
GLRG_06978	9,31	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08188	9,31	NA	<i>flavin containing amine oxidoreductase</i>	
GLRG_05877	9,33	NA	<i>Rpp14/Pop5 family protein</i>	
GLRG_03980	9,36	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06486	9,36	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07609	9,36	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09331	9,36	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10769	9,36	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06071	9,42	<i>Transporter family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06609	9,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08813	9,42	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05164	9,44	NA	<i>hypothetical protein</i>	
<b>GLRG_11775</b>	<b>9,46</b>	<b>Secondary Metabolism clusters</b>	<b>male sterility protein</b>	<b>35</b>
GLRG_02955	9,50	<i>Transcription factors family</i>	<i>chromo domain-containing protein</i>	
<b>GLRG_09801</b>	<b>9,50</b>	<b>Effector</b>	<b>hypothetical protein</b>	
GLRG_11523	9,50	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11633	9,50	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09407	9,52	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04094	9,54	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11186	9,54	NA	<i>MYND finger</i>	
GLRG_03383	9,58	NA	<i>DNA repair protein RAD8</i>	
GLRG_08502	9,58	NA	<i>ATP-binding cassette transporter</i>	
GLRG_00464	9,60	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_03972	9,62	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_05168	9,62	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09598	9,64	<i>Transporter family</i>	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	
GLRG_09781	9,64	NA	<i>integral membrane protein</i>	
GLRG_06935	9,65	NA	<i>carbon-nitrogen hydrolase</i>	
GLRG_07047	9,71	NA	<i>hypothetical protein</i>	



GLRG_02082	9,72	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02632	9,74	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10422	9,76	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11630 (PCD34)	9,81	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>phytanoyl-CoA dioxygenase</i>	34
GLRG_02066	9,86	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_09800	9,86	NA	<i>aminotransferase class I and II</i>	
GLRG_10794	9,86	NA	<i>stress responsive A/B Barrel domain-containing protein</i>	
GLRG_10909	9,86	<i>CAZymes family</i>	<i>glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain-containing protein (exo-acting <math>\beta</math>-D-glucosidases, <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidases, <math>\beta</math>-D-xylopyranosidases, N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminidases (glycoside hydrolases), N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminide phosphorylases)</i>	
GLRG_01283	9,92	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11681	9,92	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_02893	9,93	NA	<i>LysM domain-containing protein</i>	
GLRG_04345	9,93	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_10040	9,95	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07264	9,96	<i>Secreted proteases family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_06125	9,98	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_11400	10,00	NA	<i>zinc-binding dehydrogenase</i>	
GLRG_11888 (OXR42)	10,07	<i>Secondary Metabolism clusters</i>	<i>Oxidoreductase</i>	42
GLRG_04826	10,09	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_01740	10,10	<i>Transcription factors family</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_04579	10,18	NA	<i>calcineurin-like phosphoesterase</i>	
GLRG_05823	10,30	NA	<i>aminotransferase class-III</i>	
GLRG_06375	10,32	<i>Transcription factors family</i>	<i>fungus specific transcription factor domain-containing protein</i>	
GLRG_00483	10,51	NA	<i>centromere protein Scm3</i>	
GLRG_11336	10,73	NA	<i>pyoverdine/dityrosine biosynthesis protein</i>	
GLRG_09086	10,74	<i>Effector</i>	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_08460	10,79	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07843	10,80	NA	<i>hypothetical protein</i>	
GLRG_07666	11,03	<i>Transporter family</i>	<i>ABC-2 type transporter</i>	
GLRG_04037	11,16	NA	<i>glutathione-dependent formaldehyde-activating</i>	
GLRG_10480	11,45	<i>Secreted proteases family</i>	<i>deuterolysin metalloprotease</i>	
GLRG_04544	11,49	NA	<i>membrane dipeptidase</i>	
GLRG_09626	11,92	NA	<i>catalase/peroxidase HPI</i>	
GLRG_01939	12,85	<i>Secreted proteases family</i>	<i>serine carboxypeptidase</i>	
GLRG_00863	13,24	NA	<i>hypothetical protein</i>	

## VII CAZymes-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen $\Delta kmt5$ -Hyphen

**Tabelle 35: CAZymes-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen**

Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq wurden von Gunnar Hönig ausgeführt. Die Einteilung in die funktionelle Kategorie und die Beschreibung der Gene erfolgte nach O'Connell *et al.* (2012). Die Mitglieder der jeweiligen *glycosyl hydrolase family* wurden der Internetseite <https://www.cazypedia.org> (Stand: 27.11.2018) entnommen. Informationen zu der *glycosyl transferase group 1* und der *glycosyl transferase family 2* stammen von der Internetseite <https://www.ebi.ac.uk/interpro/> (Stand: 27.11.2018).

Gen	logFC	Beschreibung
GLRG_01738	-8,98	<i>glycosyl hydrolase family 11 (endo-<math>\beta</math>-1,4-xylanases)</i>
GLRG_09807	-6,74	<i>fungale cellulose binding domain-containing protein</i>
GLRG_09070	-6,33	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases)</i>
GLRG_09507	-5,98	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_08165	-5,46	<i>glycosyl hydrolase family 10 (endo-beta-1,3-xylanase activity, endo-beta-1,4-xylanases)</i>
GLRG_08875	-4,73	<i>melibiase</i>
GLRG_09681	-4,69	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases)</i>
GLRG_02944	-4,58	<i>glycosyl hydrolase family 45 (endoglucanases)</i>
GLRG_09012	-4,55	<i>pectate lyase</i>
GLRG_01844	-4,31	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_00800	-4,16	<i>glycosyl hydrolase family 28 (hydrolyse the <math>\alpha</math>-1,4 glycosidic linkage between galacturonate residues in polygalacturonic acid; polygalacturonase, exo-polygalacturonase, exo-polygalacturonase, rhamnogalacturonase)</i>
GLRG_02165	-4,07	<i>cellulase</i>
GLRG_02128	-4,00	<i>cutinase</i>
GLRG_10654	-3,56	<i>PHB depolymerase family esterase</i>
GLRG_11303	-3,46	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_10468	-3,45	<i>cutinase</i>
GLRG_00365	-3,44	<i>hypothetical protein - beta-glucuronidase (1216-1315 733-860)</i>
GLRG_07556	-3,38	<i>glycosyl hydrolase family 16 (keratan-sulfate endo-1,4-<math>\beta</math>-galactosidases, endo-1,3-<math>\beta</math>-galactanases, endo-1,3-<math>\beta</math>-glucanases, endo-1,3(4)-<math>\beta</math>-glucanases, licheninases, <math>\beta</math>-agarases, <math>\beta</math>-porphyranases, <math>\kappa</math>-carrageenases, endo-xyloglucanases)</i>
GLRG_11551	-3,36	<i>fungale cellulose binding domain-containing protein</i>
GLRG_01204	-3,35	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_08216	-3,14	<i>glycosyl transferase group 1 (transfer of activated sugars to glycogen, Fructose-6-phosphate and lipopolysaccharides and transfer of UDP, ADP, GDP or CMP linked sugars)</i>
GLRG_08974	-3,00	<i>glycosyl hydrolase family 7 (endo-1,4-<math>\beta</math>-glucanase, cellobiohydrolase, chitosanase, endo-1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanase)</i>
GLRG_09911	-2,86	<i>glycosyl hydrolase family 28 (hydrolyse the <math>\alpha</math>-1,4 glycosidic linkage between galacturonate residues in polygalacturonic acid; polygalacturonase, exo-polygalacturonase, exo-polygalacturonase, rhamnogalacturonase)</i>
GLRG_08032	-2,80	<i>PHB depolymerase family esterase</i>
GLRG_04084	-2,77	<i>polysaccharide deacetylase</i>



GLRG_10572	-2,69	<i>PHB depolymerase family esterase</i>
GLRG_11029	-2,68	<i>alpha-L-fucosidase</i>
GLRG_11729	-2,61	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases)</i>
GLRG_00250	-2,51	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_09296	-2,44	<i>cutinase</i>
GLRG_07768	-2,42	<i>glycosyl hydrolase family 43 (<math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidases, endo-<math>\alpha</math>-L-arabinanases, <math>\beta</math>-D-xylosidases, exo <math>\alpha</math>-1,3-galactanase)</i>
GLRG_02623	-2,40	<i>glycosyl hydrolase family 35 (<math>\beta</math>-galactosidases, exo-<math>\beta</math>-glucosaminidases)</i>
GLRG_01907	-2,39	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_01206	-2,38	<i>glycosyl hydrolase family 38 domain-containing protein (Class II <math>\alpha</math>-mannosidases)</i>
GLRG_05396	-2,34	<i>glycosyl hydrolase family 31 (<math>\alpha</math>-glucosidases, <math>\alpha</math>-xylosidases, isomaltosyltransferases, maltase/glucoamylases, sulfoquinovosidases)</i>
GLRG_09468	-2,23	<i>glycosyl hydrolase family 76 (endo-acting <math>\alpha</math>-mannanases)</i>
GLRG_00386	-2,20	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_06578	-2,03	<i>alpha amylase</i>
GLRG_03534	-2,02	<i>glycosyl hydrolase family 31 (<math>\alpha</math>-glucosidases, <math>\alpha</math>-xylosidases, isomaltosyltransferases, maltase/glucoamylases, sulfoquinovosidases)</i>
GLRG_04107	-1,97	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases)</i>
GLRG_03854	-1,95	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_07081	-1,90	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_01857	-1,88	<i>glycosyl hydrolase family 11 (endo-<math>\beta</math>-1,4-xylanases)</i>
GLRG_07794	-1,81	<i>glycosyl hydrolase family 18 (chitinases, endo-<math>\beta</math>-N-acetylglucosaminidases)</i>
GLRG_11477	-1,80	<i>LysM domain-containing protein</i>
GLRG_05395	-1,79	<i>glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain-containing protein (exo-acting <math>\beta</math>-D-glucosidases, <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidases, <math>\beta</math>-D-xylopyranosidases, N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminidases (glycoside hydrolases), N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminide phosphorylases)</i>
GLRG_04384	-1,78	<i>trehalase</i>
GLRG_01873	-1,77	<i>glycosyl hydrolase family 18 (chitinases, endo-<math>\beta</math>-N-acetylglucosaminidases)</i>
GLRG_02001	-1,75	<i>glycosyl hydrolase family 47 (alpha-mannosidase)</i>
GLRG_07837	-1,71	<i>glycosyl hydrolase family 47 (alpha-mannosidase)</i>
GLRG_01678	-1,68	<i>glycosyl hydrolase family 20 (exo-acting <math>\beta</math>-N-acetylglucosaminidases, <math>\beta</math>-N-acetylgalactosaminidase, <math>\beta</math>-6-SO<sub>3</sub>-N-acetylglucosaminidases, exo-acting lacto-N-biosidases)</i>
GLRG_07915	-1,60	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_06845	-1,59	<i>glycosyl hydrolase family 71 (alpha-1,3-glucanases)</i>
GLRG_05906	-1,55	<i>endoglucanase B</i>
GLRG_10161	-1,50	<i>capsular associated protein</i>
GLRG_08809	-1,49	<i>glycosyl hydrolase family 16 (keratan-sulfate endo-1,4-<math>\beta</math>-galactosidases, endo-1,3-<math>\beta</math>-galactanases, endo-1,3-<math>\beta</math>-glucanases, endo-1,3(4)-<math>\beta</math>-glucanases, licheninases, <math>\beta</math>-agarases, <math>\beta</math>-porphyranases, <math>\kappa</math>-carrageenases, endo-xyloglucanases)</i>
GLRG_04386	-1,47	<i>glycosyltransferase family 17 (beta-1,4-mannosylglycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase)</i>
GLRG_06458	-1,47	<i>hypothetical protein</i>

GLRG_10700	-1,44	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monoxygenases)</i>
GLRG_01674	-1,42	<i>glycosyl hydrolase family 16 (keratan-sulfate endo-1,4-<math>\beta</math>-galactosidases, endo-1,3-<math>\beta</math>-galactanases, endo-1,3-<math>\beta</math>-glucanases, endo-1,3(4)-<math>\beta</math>-glucanases, licheninases, <math>\beta</math>-agarases, <math>\beta</math>-porphyranases, <math>\kappa</math>-carrageenases, endo-xyloglucanases)</i>
GLRG_11295	-1,39	<i>chitinase</i>
GLRG_03474	-1,35	<i>glycosyltransferase family 28 domain-containing protein (1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase, 1,2-diacylglycerol 3-beta-glucosyltransferase, beta-N-acetylglucosamine transferase)</i>
GLRG_11357	-1,28	<i>glucose N-acetyltransferase</i>
GLRG_09031	-1,28	<i>glycosyltransferase family 20 (alpha-trehalose-phosphate synthase)</i>
GLRG_03262	-1,26	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_10927	-1,24	<i>alpha amylase</i>
GLRG_06043	-1,23	<i>glycosyl transferase family 2 (Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase)</i>
GLRG_00763	-1,22	<i>beta-glucuronidase</i>
GLRG_01653	1,20	<i>galactosyl transferase GMA12/MNN10 family protein</i>
GLRG_02215	1,25	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07762	1,26	<i>glycoside hydrolase</i>
GLRG_11975	1,26	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_01581	1,29	<i>glycosyl hydrolase family 15 (glucoamylase, alpha-glucosidase, glucodextranase)</i>
GLRG_07573	1,31	<i>glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain-containing protein (exo-acting <math>\beta</math>-D-glucosidases, <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidases, <math>\beta</math>-D-xylopyranosidases, N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminidases (glycoside hydrolases), N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminide phosphorylases)</i>
GLRG_02826	1,34	<i>glycosyl transferase family 2 (Dolichyl-phosphate beta-glucosyltransferase)</i>
GLRG_09156	1,48	<i>glycoside hydrolase family 5 protein (endoglucanase, beta-mannanase, exo-1,3-glucanase, endo-1,6-glucanase, xylanase, endoglycoceramidase)</i>
GLRG_00820	1,56	<i>carbohydrate binding module</i>
GLRG_00009	1,59	<i>glycosyltransferase family 28 domain-containing protein (1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase, 1,2-diacylglycerol 3-beta-glucosyltransferase, beta-N-acetylglucosamine transferase)</i>
GLRG_10028	1,62	<i>glycosyl hydrolase family 2 (<math>\beta</math>-galactosidases, <math>\beta</math>-glucuronidases, <math>\beta</math>-mannosidases, exo-<math>\beta</math>-glucosaminidases and, in plants, a mannosylglycoprotein endo-<math>\beta</math>-mannosidase)</i>
GLRG_11587	1,62	<i>LysM domain-containing protein</i>
GLRG_02323	1,63	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_06237	1,64	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_09895	1,65	<i>DIE2/ALG10 family protein</i>
GLRG_03546	1,68	<i>glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain-containing protein (exo-acting <math>\beta</math>-D-glucosidases, <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidases, <math>\beta</math>-D-xylopyranosidases, N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminidases (glycoside hydrolases), N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminide phosphorylases)</i>
GLRG_04261	1,69	<i>beta-1,3-endoglucanase</i>
GLRG_03770	1,77	<i>glycosyl hydrolase family 1 (beta-glucosidase, beta-galactosidase, 6-phospho-beta-galactosidase, 6-phospho-beta-glucosidase, lactase-phlorizin hydrolase, lactase, beta-mannosidase, myrosinase)</i>
GLRG_02859	1,78	<i>glycosyl hydrolase family 47 (alpha-mannosidase)</i>
GLRG_10439	1,79	<i>fungus cellulose binding domain-containing protein</i>

GLRG_02799	1,91	<i>mixed-linked glucanase</i>
GLRG_03145	1,91	<i>glycoside hydrolase family 16 protein (keratan-sulfate endo-1,4-<math>\beta</math>-galactosidases, endo-1,3-<math>\beta</math>-galactanases, endo-1,3-<math>\beta</math>-glucanases, endo-1,3(4)-<math>\beta</math>-glucanases, licheninases, <math>\beta</math>-agarases, <math>\beta</math>-porphyranases, <math>\kappa</math>-carrageenases, endo-xyloglucanases)</i>
GLRG_06092	1,92	<i>alpha-1,3-mannosyltransferase CMT1</i>
GLRG_01823	1,93	<i>PHB depolymerase family esterase</i>
GLRG_01652	2,04	<i>tat pathway signal sequence</i>
GLRG_10364	2,06	<i>exo-1,3-beta-D-glucanase</i>
GLRG_05960	2,09	<i>glycosyl hydrolase family 18 (chitinases, endo-<math>\beta</math>-N-acetylglucosaminidases)</i>
GLRG_08842	2,10	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_06352	2,11	<i>glycosyl hydrolase family 16 (keratan-sulfate endo-1,4-<math>\beta</math>-galactosidases, endo-1,3-<math>\beta</math>-galactanases, endo-1,3-<math>\beta</math>-glucanases, endo-1,3(4)-<math>\beta</math>-glucanases, licheninases, <math>\beta</math>-agarases, <math>\beta</math>-porphyranases, <math>\kappa</math>-carrageenases, endo-xyloglucanases)</i>
GLRG_02579	2,16	<i>glycosyl hydrolase family 35 (<math>\beta</math>-galactosidases, exo-<math>\beta</math>-glucosaminidases)</i>
GLRG_11148	2,76	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_11363	2,82	<i>beta-xylosidase</i>
GLRG_01760	2,82	<i>glycosyl hydrolase family 7 (endo-1,4-<math>\beta</math>-glucanase, cellobiohydrolase, chitosanase, endo-1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanase)</i>
GLRG_09354	3,05	<i>alpha-galactosidase</i>
GLRG_09971	3,35	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases)</i>
GLRG_11453	3,64	<i>glycosyl hydrolase family 92 (mannosyl-oligosaccharide <math>\alpha</math>-1,2-mannosidase, mannosyl-oligosaccharide <math>\alpha</math>-1,3-mannosidase, mannosyl-oligosaccharide <math>\alpha</math>-1,6-mannosidase, <math>\alpha</math>-mannosidase, <math>\alpha</math>-1,2-mannosidase, <math>\alpha</math>-1,3-mannosidase, <math>\alpha</math>-1,4-mannosidase)</i>
GLRG_08534	3,64	<i>cellulase</i>
GLRG_05587	3,81	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_02947	3,86	<i>LysM domain-containing protein</i>
GLRG_01103	3,88	<i>glycosyl hydrolase family 26 (endo-<math>\beta</math>-1,4-mannanases, <math>\beta</math>-1,3:1,4-glucanase, <math>\beta</math>-1,3-xylanase)</i>
GLRG_03535	4,08	<i>galactan 1,3-beta-galactosidase</i>
GLRG_11241	4,31	<i>polysaccharide deacetylase</i>
GLRG_11172	4,41	<i>cutinase</i>
GLRG_11110	4,71	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monooxygenases)</i>
GLRG_09366	4,87	<i>GPI-anchored cell wall beta-1,3-endoglucanase EglC (EGLI)</i>
GLRG_03512	5,96	<i>MGT family Glycosyltransferase</i>
GLRG_02120	6,35	<i>cutinase</i>
GLRG_08211	6,35	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase</i>
GLRG_05335	6,52	<i>glycosyl hydrolase family 7 (endo-1,4-<math>\beta</math>-glucanase, cellobiohydrolase, chitosanase, endo-1,3-1,4-<math>\beta</math>-glucanase)</i>
GLRG_06967	6,52	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_08517	6,67	<i>GDSL-like Lipase/Acylhydrolase</i>
GLRG_11545	6,76	<i>glycosyltransferase family 31 (N-acetyllactosaminide beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase, beta-1,3-galactosyltransferase, fucose-specific beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase, globotriosylceramide beta-1,3-GalNAc transferase)</i>
GLRG_11560	6,80	<i>glycosyl hydrolase family 65 central catalytic domain-containing protein</i>

---

GLRG_08137	7,15	<i>glycosyl hydrolase family 2 (<math>\beta</math>-galactosidases, <math>\beta</math>-glucuronidases, <math>\beta</math>-mannosidases, <i>exo</i>-<math>\beta</math>-glucosaminidases and, in plants, a mannosylglycoprotein <i>endo</i>-<math>\beta</math>-mannosidase)</i>
GLRG_08518	7,43	<i>glycosyl hydrolase family 6 (cleave <math>\beta</math>-1,4 glycosidic bonds in cellulose / <math>\beta</math>-1,4-glucans; endoglucanase, cellobiohydrolase)</i>
GLRG_01092	7,59	<i>glycosyl hydrolase family 28 (hydrolyse the <math>\alpha</math>-1,4 glycosidic linkage between galacturonate residues in polygalacturonic acid; polygalacturonase, <i>exo</i>-polygalacturonase, <i>exo</i>-polygalacturonase, rhamnogalacturonase)</i>
GLRG_00793	7,66	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11474	7,80	<i>glycosyltransferase sugar-binding region containing DXD domain-containing protein</i>
GLRG_03616	8,09	<i>alpha amylase</i>
GLRG_11796	8,09	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_11267	8,14	<i>hypothetical protein</i>
GLRG_07024	8,34	<i>alpha-galactosidase</i>
GLRG_11894	8,42	<i>glucosyltransferase</i>
GLRG_05507	8,46	<i>glycosyl hydrolase family 61 (copper-dependent lytic polysaccharide monoxygenases)</i>
GLRG_10909	9,86	<i>glycosyl hydrolase family 3 N terminal domain-containing protein (<i>exo</i>-acting <math>\beta</math>-D-glucosidases, <math>\alpha</math>-L-arabinofuranosidases, <math>\beta</math>-D-xylopyranosidases, N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminidases (glycoside hydrolases), N-acetyl-<math>\beta</math>-D-glucosaminide phosphorylases)</i>

---

## VIII Sekundärmetabolit-Cluster-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen $\Delta kmt5$ -Hyphen

**Tabelle 36: Sekundärmetabolit-Cluster-Gene mit erhöhter oder verringerter Transkriptmenge in vegetativen  $\Delta kmt5$ -Hyphen**

Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq wurden von Gunnar Hönig ausgeführt. Die Einteilung in die funktionelle Kategorie und in das Cluster sowie die Beschreibung der Gene erfolgte nach O'Connell *et al.* (2012).

Gen	logFC	Beschreibung	Cluster
GLRG_05713	-9,06	<i>RTA1 like protein</i>	8
GLRG_03505	-8,69	<i>hypothetical protein</i>	5
GLRG_09070	-6,33	<i>glycosyl hydrolase family 61 (endo-1,4-beta-D-glucanase)</i>	20
GLRG_11427	-5,80	<i>hypothetical protein</i>	30
GLRG_09712	-5,31	<i>alpha/beta hydrolase</i>	22
GLRG_08940	-5,23	<i>hypothetical protein</i>	19
GLRG_11501	-4,87	<i>hypothetical protein</i>	31
GLRG_11422	-4,84	<i>FAD binding domain-containing protein</i>	29
GLRG_09714	-4,25	<i>alcohol dehydrogenase GroES-like domain-containing protein</i>	22
GLRG_09710	-4,07	<i>hypothetical protein</i>	22
GLRG_09843	-3,88	<i>cytochrome P450</i>	23
GLRG_05710	-3,84	<i>zinc-binding dehydrogenase</i>	8
GLRG_11838	-3,26	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	38
GLRG_11421	-3,22	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	29
GLRG_09069	-3,08	<i>NAD dependent epimerase/dehydratase</i>	20
GLRG_09708	-2,83	<i>hypothetical protein</i>	22
GLRG_00914	-2,83	<i>zinc-binding dehydrogenase</i>	2
GLRG_08615	-2,80	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	18
GLRG_08624	-2,78	<i>fasciclin domain-containing protein</i>	18
GLRG_07167	-2,57	<i>TfdA family Taurine catabolism dioxygenase TauD</i>	11
GLRG_07963	-2,48	<i>2OG-Fe(II) oxygenase family Oxidoreductase</i>	14
GLRG_07961	-2,43	<i>hypothetical protein</i>	14
GLRG_08938	-2,42	<i>male sterility protein</i>	19
GLRG_07433	-2,34	<i>cytochrome P450</i>	12
GLRG_11890	-2,26	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	42
GLRG_07169	-2,23	<i>hypothetical protein</i>	11
GLRG_07875	-2,07	<i>alcohol dehydrogenase GroES-like domain-containing protein</i>	13
GLRG_10826	-1,95	<i>hypothetical protein</i>	28
GLRG_08797 ( <i>XPP1</i> )	-1,81	<i>helix-loop-helix DNA-binding domain-containing protein</i>	Not in a cluster
GLRG_10547	-1,91	<i>short chain dehydrogenase</i>	27
GLRG_09711	-1,91	<i>hypothetical protein</i>	22
GLRG_07434	-1,86	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	12
GLRG_11839	-1,86	<i>cytochrome P450</i>	38
GLRG_10825	-1,80	<i>cofactor FMO1 FAD enzyme</i>	28

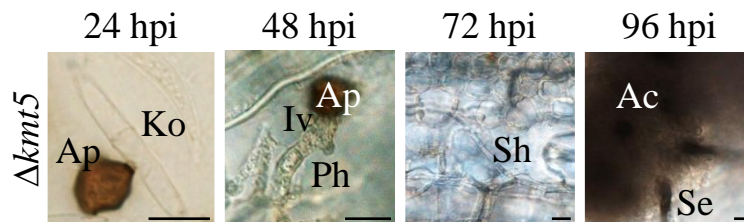
GLRG_09067	-1,65	<i>short chain dehydrogenase</i>	20
GLRG_06163	-1,60	<i>AMP-binding enzyme</i>	9
GLRG_10544	-1,59	<i>GMC oxidoreductase</i>	27
GLRG_11504	-1,56	<i>lipase</i>	31
GLRG_08946	-1,56	<i>sugar porter family MFS transporter</i>	19
GLRG_10827	-1,54	<i>KR domain-containing protein</i>	28
GLRG_09717	-1,53	<i>O-methyltransferase</i>	22
GLRG_10822	-1,52	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	28
GLRG_10823	-1,52	<i>hypothetical protein</i>	28
GLRG_09709	-1,50	<i>hypothetical protein</i>	22
GLRG_09713	-1,50	<i>HypE protein</i>	22
GLRG_10824	-1,47	<i>hypothetical protein</i>	28
GLRG_10821	-1,43	<i>alcohol dehydrogenase GroES-like domain-containing protein</i>	28
GLRG_07171	-1,26	<i>KR domain-containing protein</i>	11
GLRG_02588	-1,26	<i>hypothetical protein</i>	3
GLRG_07168	-1,25	<i>phthalate transporter</i>	11
GLRG_07869	1,28	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	13
GLRG_09079	1,33	<i>hypothetical protein</i>	20
GLRG_02590	1,38	<i>hypothetical protein</i>	3
GLRG_11563	1,43	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	32
GLRG_10238	1,51	<i>male sterility protein</i>	24
GLRG_09267	1,56	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	21
GLRG_09076	1,68	<i>glucose-methanol-choline oxidoreductase</i>	20
GLRG_10319	1,72	<i>cytochrome P450</i>	25
GLRG_10538	1,82	<i>major facilitator superfamily transporter</i>	27
GLRG_08060	1,83	<i>hypothetical protein</i>	15
GLRG_08212	2,01	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	16
GLRG_11799	2,07	<i>FAD binding domain-containing protein</i>	36
GLRG_10237	2,21	<i>NCS1 nucleoside transporter</i>	24
GLRG_08061	2,40	<i>hypothetical protein</i>	15
GLRG_11770	2,44	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	35
GLRG_11777	2,92	<i>hypothetical protein</i>	35
GLRG_11697	2,93	<i>AMP-binding enzyme</i>	35
GLRG_11771	2,95	<i>O-methyltransferase</i>	35
GLRG_00919	4,41	<i>KR domain-containing protein</i>	2
GLRG_07958 (HYP14)	5,49	<i>hypothetical protein</i>	14
GLRG_03512	5,96	<i>MGT family Glycosyltransferase</i>	6
GLRG_08949 (MCO19)	6,35	<i>multicopper oxidase</i>	19
GLRG_08951	6,35	<i>hypothetical protein</i>	19
GLRG_09835	6,67	<i>hypothetical protein</i>	23
GLRG_09842	6,67	<i>AMP-binding enzyme</i>	23
GLRG_11837	6,67	<i>RadH flavin-dependent halogenase</i>	38
GLRG_02583 (PKS32)	6,89	<i>beta-ketoacyl synthase domain-containing protein</i>	3
GLRG_11506	6,93	<i>hypothetical protein</i>	31
GLRG_11498	7,43	<i>cytochrome P450</i>	31/32

---

GLRG_11423	7,80	<i>aromatic prenyltransferase</i>	29
GLRG_08623 ( <i>MCO18</i> )	8,50	<i>multicopper oxidase</i>	18
GLRG_07872	8,58	<i>hypothetical protein</i>	13
GLRG_10318	8,76	<i>FAD binding domain-containing protein</i>	25
GLRG_11879	8,98	<i>methyltransferase domain-containing protein</i>	41
GLRG_11775	9,46	<i>male sterility protein</i>	35
GLRG_11630 ( <i>PCD34</i> )	9,81	<i>phytanoyl-CoA dioxygenase</i>	34
GLRG_11888 ( <i>OXR42</i> )	10,07	<i>oxidoreductase</i>	42

---

### IX Mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen von $\Delta kmt5$

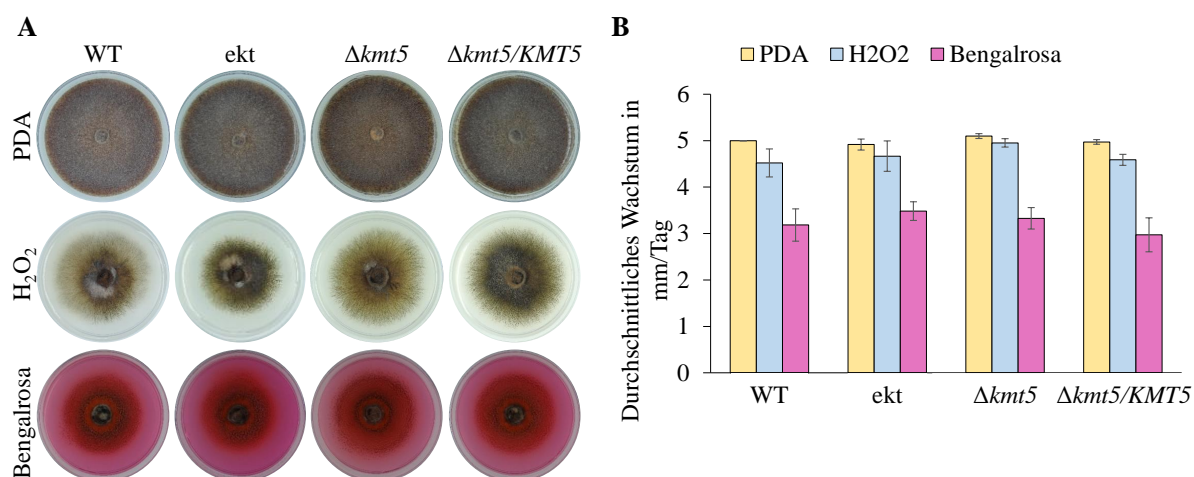


**Abbildung 22: Mikroskopische Untersuchung der Infektionsstrukturen von  $\Delta kmt5$**

Mikroskopische Aufnahmen der Infektionsstrukturen der Deletionsmutante  $\Delta kmt5$  auf intakten Maisblättern zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion. In den äußerst seltenen Fällen, wo der Deletionsmutante die Penetration der Wirtszelle gelang, war sie ebenfalls in der Lage, den vollständigen Entwicklungszyklus zu durchlaufen. Die Infektionsstrukturen der Deletionsmutante zeigten keine morphologischen Auffälligkeiten. Ko = Konidie, Ap = Appressorium, Iv = Infektionsvesikel, Ph = Primärhype, Sh = Sekundärhype, Se = Seta, Ac = Acervulus, Maßstab = 10  $\mu\text{m}$



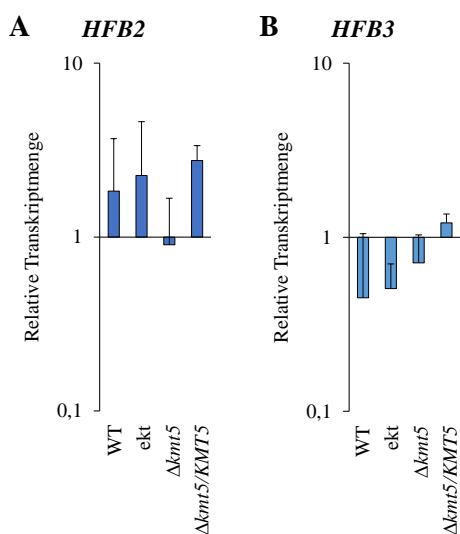
## X Wachstumsversuche auf PDA mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Bengalrosa



**Abbildung 23: Einfluss von ROS auf das vegetative Wachstum**

(A) Phänotyp der Kolonien von Wildtyp (WT), Transformante mit ektopischer Integration der Deletionskassette (ekt), der Deletionsmutante ( $\Delta kmt5$ ) und des genetisch komplementierten Isolats ( $\Delta kmt5/KMT5$ ) auf PDA mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Bengalrosa. (B) Durchschnittliches tägliches Wachstum von WT, ekt,  $\Delta kmt5$  und  $\Delta kmt5/KMT5$  auf PDA mit und ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Bengalrosa (n = 3, T-Test, p > 0,05).

## XI Mittels RT-qPCR bestimmte relative Transkriptmengen in vegetativen Hyphen



**Abbildung 24: Mittels RT-qPCR bestimmte relative *HFB2*- und *HFB3*-Transkriptmengen in vegetativen Hyphen**

Relative Transkriptmengen in vegetativen Hyphen, welche im Verhältnis zu der entsprechenden Transkriptmenge in Wildtyp-Konidien, deren Wert gleich eins gesetzt wurde, betrachtet werden. Alle Werte wurden auf die Transkriptmengen der Referenzgene *CgHiston H3* und *CgActin* normiert. (n = 3, T-Test, p > 0,05). Die Skalierung der Ordinate erfolgte logarithmisch. *HFB2* = Hydrophobin 2, *HFB3* = Hydrophobin 3

## XII Abwehrgene in *Zea mays*

**Tabelle 37: Abwehrgene in *Zea mays***

Aus Untersuchungen von Oliveira-Garcia und Deising (2013) und Albarouki *et al.* (2014) bekannte Abwehrgene von *Zea mays*, welche während der *PAMP triggered immunity* (PTI) aktiviert werden, sobald *C. graminicola* biotrophe Hyphen etabliert.

Gennummer	Name	Beschreibung
GRMZM2G046615	<i>TPS2</i>	Terpensynthase 2
GRMZM2G010356	<i>TPS7</i>	Terpensynthase 7
GRMZM2G103512	<i>GLP</i>	<i>Germin-like protein</i>
GRMZM2G177631	<i>CS8</i>	Cellulosesynthase 8
GRMZM2G101741	<i>CH</i>	Chitinase
GRMZM2G392125	<i>XGE</i>	Xyloglucan Endotransglucosylase/Hydrolase Protein 15
GRMZM2G065617	<i>UDP-GT</i>	UDP-Glycosyltransferase 74B1
GRMZM2G093346	<i>PRX346</i>	Peroxidase 1
GRMZM2G117365	<i>PRX365</i>	Peroxidase 2

**Tabelle 38: Mittels RNA-Seq in nekrtrophen Hyphen identifizierte putative Abwehrgene aus Mais**

Dargestellt sind die logFC-Werte 72 hpi. Die bioinformatische Analyse und Auswertung der RNA-Seq wurden von Gunnar Hönig ausgeführt. Hellgraue Felder zeigen eine erhöhte Transkriptmenge ( $p \leq 0,05$ ), dunkelgraue Felder zeigen eine verringerte Transkriptmenge in mit  $\Delta kmt5$  infizierten Blättern im Vergleich zu mit dem Wildtyp infizierten Blättern ( $p \leq 0,05$ ).

Gennummer	Name	Beschreibung	logFC
GRMZM5G833699	<i>HSP</i>	<i>Heat shock protein 82</i>	0,966
GRMZM2G137839	<i>APX</i>	<i>Ascorbate peroxidase</i>	1,098
GRMZM2G177098	<i>RP</i>	<i>Ribosomal protein L35A</i>	1,833
GRMZM5G881803	<i>MLO</i>	<i>MLO-like protein</i>	2,233
GRMZM2G108219	<i>PO</i>	<i>Peroxidase</i>	-1,274
GRMZM2G447551	<i>CMB</i>	<i>Calmodulin binding protein</i>	-1,032
GRMZM2G003625	<i>RPI-4</i>	<i>Rust resistance-like protein</i>	-1,462

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Holger B. Deising danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema bearbeiten zu können. Des Weiteren möchte ich mich für die intensive Betreuung meiner Arbeit, die zahlreichen Anregungen und das stete Interesse am Fortgang meiner Arbeit bedanken.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Gunter Reuter für seine Diskussionsbereitschaft sowie seiner gesamten Entwicklungs-genetik-Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ferner Herrn Professor Dr. Uwe Conrath für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Danken möchte ich auch Dr. Anja Raschke, Dr. Jorrit-Jan Krijger und Dr. Stefan Wirsal für wertvolle Tipps und Anregungen.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle, die durch praktische Mitarbeit zum Gelingen des umfangreichen Projekts beigetragen haben. Maximilian Groß danke ich für die Probenvorbereitung zur Atomkraftmikroskopie. Dr.-Ing. Andreas Kiesow und Matthias Menzel vom Fraunhofer-Institut für Mikrostruktur von Werkstoffen und Systemen IMWS danke ich für die Durchführung der Atomkraftmikroskopie. PD Dr. Knut Krohn und Mitarbeitern der Core Unit DNA Technologien der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig danke ich für die RNA-Sequenzierungen. Gunnar Hönig danke ich für die Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten und das Anfertigen zahlreicher Tabellen und Diagramme. Danke an Andrea Beutel, Doris Jany und Iris Hunold für ihre exzellente technische Unterstützung. Elke Vollmer danke ich für die stets sehr gute Zusammenarbeit und die Anzucht der Maispflanzen. Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls Phytopathologie und Pflanzenschutz für das freundliche Arbeitsklima danken.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Von ganzem Herzen danke ich meinem Partner Ben für seine unendliche Geduld in dieser Zeit. Ohne seine Unterstützung hätte ich den nötigen Freiraum in dieser Situation nicht zur Verfügung gehabt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank der finanziellen Förderung des Projekts durch den Sonderforschungsbereich 648.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlichen und inhaltlichen verwendeten Stellen habe ich entsprechend gekennzeichnet. Die Arbeit wurde in keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale), den

---

Iris Gase

## Wissenschaftlicher Werdegang

- 06.2013 – 12.2017      Institut für Agrar-und Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin - Phytopathologie und Pflanzenschutz
- 10.2010 – 05.2013      Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abschluss: Master of Science Biologie  
Masterarbeit: „Die Bedeutung der drei  $\alpha$ -Glucan-Synthase-Gene *AGS1*, *AGS2*  
und *AGS3* von *Colletotrichum graminicola* für vegetative und pathogene  
Entwicklung“
- 10.2007 – 12.2010      Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Bachelor of Science Biologie  
Bachelorarbeit: „Klimawandel und Pflanzendemographie: Auswirkung von  
Trockenstress auf die Etablierung von ozeanisch und kontinental verbreiteten  
Grasarten“
- 10.2006 – 09.2007      Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Medizinstudium

## Auszeichnung

- 06.2014                      Wilhelm-Rimpau-Preis für innovative und praxisrelevante Masterarbeiten  
in der Pflanzenproduktion

## Publikation

- Deising, H.B., Gase, I. und Kubo, Y. 2017. The unpredictable risk imposed by microbial secondary metabolites: how safe is biological control of plant diseases? *Journal of Plant Diseases and Protection* 124: 413-419.

Halle (Saale), den

---

Iris Gase