

Klasse I-Histondeacetylasen
koordinieren Virulenz im Maispathogen
Colletotrichum graminicola

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Herrn Dipl.-Biol. Alexander Mickel
geboren am 01.06.1981 in Halle (Saale)

Gutachter

1. Herr Prof. Dr. Holger B. Deising
2. Herr Prof. Dr. Gunter Reuter
3. Herr Prof. Dr. Uwe Conrath

Verteidigt am: 15.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis.....	10
Anmerkungen zur Schreibweise	13
I. Einleitung	14
I.1 Bedeutung von <i>Colletotrichum graminicola</i>	14
I.2 Biologie von <i>Colletotrichum graminicola</i>	16
I.3 Epigenetische Regulationsmechanismen	18
I.3.1 Histonmodifikationen.....	19
I.3.1.1 Histonacetylierung als epigenetische Modifikation	21
I.3.1.2 Histondeacetylasen.....	22
I.3.2 RNA-Silencing.....	24
I.3.2.1 RNAi in filamentösen Pilzen	27
I.4 Ziele der Arbeit	28
II. Material und Methoden	29
II.1 Biologisches Material	29
II.1.1 Bakterien	29
II.1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	29
II.1.2 Pilzmaterial	29
II.1.2.1 <i>Colletotrichum graminicola</i>	29
II.1.3 Pflanzen.....	30
II.1.3.1 <i>Zea mays</i>	30
II.1.3.2 <i>Allium cepa</i>	30
II.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	30
II.2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen	31
II.2.1.1 Nährmedien.....	31
II.2.1.2 Puffer.....	32
II.2.1.3 Lösungen.....	35
II.2.2 Vektoren.....	37
II.2.3 Oligonukleotide.....	37
II.3 Infektionsversuche	40
II.3.1 Pflanzeninfektion	40
II.3.1.1 Gewinnung von Konidien und Einstellen der Konidienkonzentration.....	40
II.3.1.2 Maisinokulation	41
II.3.1.3 Zwiebelinokulation	42
II.3.1.4 Zytorrhizie.....	42
II.4 Wachstums- und Sporulationsversuche	42
II.5 Molekularbiologische Methoden.....	43

II.5.1	Präparation von Nukleinsäuren	43
II.5.1.1	Präparation von genomischer DNA	43
II.5.1.2	Präparation von Plasmid-DNA	44
II.5.1.3	Präparation von DNA aus Agarosegelen.....	44
II.5.1.4	Präparation von RNA.....	44
II.5.1.5	Reinigung von DNA-Amplifikaten.....	45
II.5.2	Gelelektrophorese	46
II.5.3	Southern-Hybridisierung.....	46
II.5.3.1	Herstellung DIG-markierter Sonden	46
II.5.3.2	Restriktion der genomischen DNA und Gelelektrophorese	47
II.5.3.3	Kapillartransfer	47
II.5.3.4	Hybridisierung und Nachweis der gebundenen Sonde.....	48
II.5.4	PCR-Anwendungen	49
II.5.4.1	Standard-PCR	49
II.5.4.2	double-joint-PCR	49
II.5.4.3	Kolonie-PCR.....	51
II.5.4.4	RT-qPCR.....	52
II.5.4.5	qPCR.....	52
II.5.5	Sequenzierung und Sequenzauswertung	53
II.5.5.1	Sequenzierreaktion und Probenvorbereitung	53
II.5.5.2	Sequenzierung und Analyse der Daten	53
II.5.6	Klonierung	54
II.5.6.1	Generierung von DNA-Fragmenten.....	54
II.5.6.2	Verdau mit Restriktionsendonukleasen.....	54
II.5.6.3	Ligation und Dephosphorylierung	54
II.5.7	Transformationstechniken.....	55
II.5.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	55
II.5.7.1.1	Herstellung kompetenter Zellen	55
II.5.7.1.2	Transformation und Selektion	55
II.5.7.2	Transformation von <i>C. graminicola</i>	56
II.5.7.2.1	Protoplastengewinnung.....	56
II.5.7.2.2	Transformation und Selektion.....	56
II.5.7.2.3	Gewinnung von Einzelsporisolationen.....	57
II.5.8	Deletionsstrategie und Komplementation	57
II.5.9	Generierung von RNAi-Stämmen.....	58
II.6.	<i>eGFP</i> -Fusion.....	59
II.6.1	<i>CgHDA1:eGFP</i>	59
II.6.2	<i>CgHDA3:eGFP</i>	59
II.6.3	<i>CgHDA4:eGFP</i>	60
II.7.	Metabolitanalytik	60
II.7.1	Kultivierung von <i>C. graminicola</i>	60
II.7.2	Herstellung von Extrakten aus Kulturüberständen.....	60
II.7.3	Analytische HPLC	61
II.7.4	Identifizierung von Metaboliten.....	61
II.8	RNA-Seq-Analysen	61
II.8.1	<i>in vivo</i> -RNA-Seq-Analysen	61
II.8.2	<i>in vitro</i> -RNA-Seq-Analysen.....	62
II.9	Dokumentation.....	63

II.9.1	Mikroskopie	63
II.9.1.1	Färbetechnik.....	63
II.9.1.2	Lichtmikroskopie	63
II.9.1.3	Fluoreszenzmikroskopie	64
II.9.2	Photographie und Bildbearbeitung	64
II.10	Bioinformatische Analyse	64
II.10.1	Datenbankrecherche	64
II.10.2	Phylogenetische Analyse	65
II.11	Statistik	65
II.12	NCBI-Zugangsnummern.....	66
III.	Ergebnisse.....	67
III.1	Identifizierung von Histondeacetylase-Genen in <i>Colletotrichum graminicola</i>	67
III.1.1	Phylogenetische Analyse	68
III.1.2	Einfluss von Trichostatin A auf <i>Colletotrichum graminicola</i>	70
III.2	Charakterisierung von <i>CgHDA1</i>	72
III.2.1	Deletionsmutagenese	72
III.2.2	Silencing von <i>CgHDA1</i>	74
III.2.2.1	Charakterisierung der RNAi-Isolate durch Southern-Analyse und RT-qPCR	74
III.2.2.2	Morphologische Charakterisierung anhand von Wachstumsversuchen	75
III.2.2.3	Mikroskopische Charakterisierung der RNAi-Isolate	77
III.2.2.4	Makroskopische und mikroskopische Charakterisierung der asexuell gebildeten Konidien von <i>HDA1</i> RNAi-Stämmen.....	81
III.2.2.5	Infektionsversuche	83
III.2.2.6	Mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs auf intakten Maisblättern.....	84
III.2.2.7	Mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs auf verwundeten Maisblättern	90
III.3	Charakterisierung von <i>CgHDA2</i>	92
III.4	Charakterisierung von <i>CgHDA3</i> und <i>CgHDA4</i>	96
III.4.1	Deletionsmutagenese und morphologische Charakterisierung.....	96
III.4.2	Infektionsversuche	99
III.5	Vergleichende Charakterisierung.....	101
III.5.1	Lokalisation von Histondeacetylrasen.....	101
III.5.2	Metabolitanalyse	108
III.5.3	RNA-Seq-Analyse von <i>in vitro</i> -Kulturen	110
III.6	Beitrag ausgewählter Histonacetyltransferasen zur Infektion von Mais durch <i>C. graminicola</i>	113
IV.	Diskussion	115
IV.1	<i>Colletotrichum graminicola</i> als Modellorganismus	115
IV.2	Identifizierung von Histondeacetylase-Genen in <i>Colletotrichum graminicola</i>	116
IV.3	Deletionsmutagenese und RNA-Silencing.....	118
IV.3.1	Silencing von <i>CgHDA1</i>	118
IV.3.1.1	Die Bedeutung von <i>CgHDA1</i> für vegetatives Wachstum, Hyphenmorphologie und Sporulationsvermögen	119
IV.3.2	Die Bedeutung von Histondeacetylrasen für die Infektion von Mais	124
IV.3.2.1	Die Bedeutung von Histonacetyltransferasen für die Infektion von Mais	129
IV.3.3	Histondeacetylase-Inhibitoren als fungizide Wirkstoffe	130

IV.3.4	HDACs sind an der Regulation von Sekundärmetaboliten in <i>C. graminicola</i> beteiligt	131
	Zusammenfassung	136
	Literaturverzeichnis	139
	Anhang	155
I.	Multiples HDAC-Alignment.....	155
II.	DMSO-Vorversuch	156
III.	DNA-Methyltransferase-Inhibitor: 5-Azacytidin	157
IV.	PCR zum Nachweis der RNAi-Fragmente.....	158
V.	PCR zum Nachweis des Wildtyp-Gens und des Selektionsmarkers	159
VI.	Übersichtsaufnahmen I.....	160
VII.	Übersichtsaufnahmen II	161
VIII.	Symptomausprägung auf Mikado und multiple Keimung	162
IX.	Stängelinfektionstests.....	163
X.	Quantifizierung von Infektionsstrukturen	164
XI.	Erzeugung von <i>eGFP</i> -Reporterstämmen	165
XII.	Nachweis von HDA-Transkripten während der Infektion	167
	Eidesstattliche Erklärung	168
	Danksagung	169
	Lebenslauf	170
	Wissenschaftliche Beiträge.....	171

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Infektion von <i>Zea mays</i> durch <i>Colletotrichum graminicola</i>	14
Abb. 2:	Schematische Darstellung der Grundeinheiten des Chromatins.	19
Abb. 3:	Schematische Darstellung möglicher epigenetischer Markierungen an ausgewählten Aminosäureresten der Histone H3, H4, H2A und H2B.	20
Abb. 4:	Auswirkungen des Acetylierungsgrades auf die Transkription.	21
Abb. 5:	Mechanismus der RNA-Interferenz.	25
Abb. 6:	<i>in silico</i> -Charakterisierung der Histondeacetylasen aus <i>C. graminicola</i>	69
Abb. 7:	Effekt von Trichostatin A (TSA) auf vegetatives Wachstum, Koloniemorphologie und Verzweigung.	71
Abb. 8:	<i>CgHDA1</i> -Deletionsmutagenese.	73
Abb. 9:	Molekulare Charakterisierung der <i>CgHDA1</i> -RNAi-Transformanten.	74
Abb. 10:	Charakterisierung des vegetativen Wachstums.	76
Abb. 11:	Morphologische Charakterisierung der von <i>HDA1</i> RNAi-Isolaten differenzierten vegetativen Hyphen.	78
Abb. 12:	Charakterisierung der <i>HDA1</i> RNAi-Isolate.	79
Abb. 13:	RT-qPCR Analysen von Wildtyp (WT) und <i>HDA1</i> RNAi-Isolaten.	81
Abb. 14:	Sporulation und Konidienmorphologie von Wildtyp und <i>HDA1</i> RNAi-Isolaten.	82
Abb. 15:	Pathogenitätstest.	83
Abb. 16:	Differenzierung von Infektionsstrukturen von Wildtyp und <i>HDA1</i> RNAi-Isolaten.	85
Abb. 17:	Differenzierung von Acervuli von Wildtyp und <i>HDA1</i> RNAi-Isolat 11 auf intakten Maisblättern (Golden Jubilee).	86
Abb. 18:	Infektionsstrukturen, Papillenbildung und Appressorienfunktionalität von Wildtyp und <i>HDA1</i> RNAi-Isolaten.	88
Abb. 19:	Mikroskopische Analyse verwundeter Maisblätter (Golden Jubilee), welche mit WT und RNAi-Stämmen inokuliert wurden.	91
Abb. 20:	<i>CgHDA2</i> -Charakterisierung und $\Delta hda2$ -Komplementation.	93
Abb. 21:	Papillenbildung von Maisblättern und Appressorienfunktionalität von $\Delta hda2$ -Stämmen.	95
Abb. 22:	Generierung von $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes.	97
Abb. 23:	Charakterisierung von $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes.	98
Abb. 24:	Die Bedeutung von <i>CgHDA3</i> und <i>CgHDA4</i> für die Infektion von Mais durch <i>C. graminicola</i>	100
Abb. 25:	Charakterisierung von eGFP-Reporterstämmen.	102
Abb. 26:	Lokalisation von Histondeacetylasen.	103
Abb. 27:	Lokalisation von Histondeacetylasen in vegetativen Hyphen von 12 Tage alten PDA-Kulturen.	104
Abb. 28:	Lokalisation von Histondeacetylasen während der Infektion von Mais (Golden Jubilee). ...	106
Abb. 29:	Lokalisation von HDA3:eGFP und HDA4:eGFP während der Infektion von Mais (Golden Jubilee) vier Tage nach Inokulation.	107
Abb. 30:	HPLC-Elutionsprofile von Extrakten aus WT-, <i>HDA1</i> RNAi-11-, $\Delta hda2$ -, $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -HMG-Kulturüberständen.	109
Abb. 31:	RNA-Seq-Analyse von <i>in vitro</i> -Kulturen.	111
Abb. 32:	RNA-Seq-Analyse von Genen, die für PKS, NRPS oder PKS-NRPS-Hybride kodieren.	112

Abb. 33:	Übersicht über deletierte Histonacetyltransferasen in <i>C. graminicola</i> mit Proteinstrukturen, Deletionsstrategie, Southern Blot und Pathogenitätstest (4 dpi).	114
Abb. 34:	Zusammenfassende Übersicht zu Erkenntnissen der Histondeacetylasen von <i>C. graminicola</i>	138
Abb. 35:	Multiples Protein Sequence Alignment der vier zinkabhängigen Histondeacetylasen aus <i>C. graminicola</i>	155
Abb. 36:	Wachstumsversuch zur Überprüfung möglicher Effektes von DMSO.	156
Abb. 37:	Effekt von 5-Azacytidin (5-Aza) auf vegetatives Wachstum, Koloniemorphologie und Verzweigung.	157
Abb. 38:	Nachweis der RNAi-Fragmente.	158
Abb. 39:	Nachweis des Wildtyp-Gens und des Selektionsmarkers mittels PCR.	159
Abb. 40:	Übersichtsaufnahmen von Hyphenspitzen auf soliden Medien.	160
Abb. 41:	Übersichtsaufnahmen von Hyphen.	161
Abb. 42:	Infektionsassay mit Wildtyp (WT) und <i>HDA1</i> RNAi-Stämmen auf der Maissorte Mikado.	162
Abb. 43:	Multiple Keimung der RNAi-Isolate <i>in vitro</i>	162
Abb. 44:	Stängelinfection.	163
Abb. 45:	Quantifizierung von Infektionsstrukturen von Wildtyp und den $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie dem $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldelentionsstamm.	164
Abb. 46:	Erzeugung von <i>eGFP</i> -Reporterstämmen.	165
Abb. 47:	Genexpression von <i>CgHDA1</i> , <i>CgHDA2</i> , <i>CgHDA3</i> und <i>CgHDA4</i> während der Infektion (0-120 hpi) von <i>Zea mays</i> cv. Golden Jubilee.	167

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Verwendete Vektoren.....	37
Tab. 2:	Verwendete Primer	37
Tab. 3:	PCR mit Taq-Polymerase und PCR-Bedingungen.....	49
Tab. 4:	PCR zur Erzeugung der Flanken und PCR-Bedingungen.....	50
Tab. 5:	PCR zur Erzeugung der Deletionskassette und PCR-Bedingungen	51
Tab. 6:	Kolonie-PCR zur Selektion positiver Plasmide	51
Tab. 7:	RT-qPCR.....	52
Tab. 8:	Sequenzier-PCR und PCR-Bedingungen	53
Tab. 9:	Überblick über Histondeacetylasen in <i>C. graminicola</i> und deren Orthologe in <i>C. carbonum</i> , <i>N. crassa</i> und <i>S. cerevisiae</i>	67
Tab. 10:	Gencluster mit reduzierten Transkriptabundanzen in $\Delta hda2$	112

Abkürzungsverzeichnis

Alle benutzten Maßeinheiten folgen dem internationalen SI-System und werden deshalb hier nicht gesondert aufgeführt. Gleiches gilt für allgemeine Abkürzungen, bei denen auf den Duden verwiesen wird.

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
<i>acuC</i>	acetoin utilization protein
<i>ad</i>	lat.: zu
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of Variance
APH	Acetylpolyamin-Aminohydrolase
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
<i>bla</i>	beta-Lactamase-Gen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
C	Kohlenstoff
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CF	Calcofluor White Stain
CgAAR	α -Aminoacidat-Reduktase aus <i>Colletotrichum graminicola</i>
CgHDA1	Histondeacetylase 1 aus <i>C. graminicola</i>
CgHDA2	Histondeacetylase 2 aus <i>C. graminicola</i>
CgHDA3	Histondeacetylase 3 aus <i>C. graminicola</i>
CgHDA4	Histondeacetylase 4 aus <i>C. graminicola</i>
CgM2	Isolat M2 (Wildtyp) von <i>C. graminicola</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin Immuno Precipitation DNA-Sequencing
CM	Complete Medium
Cot-1	Colonial temperature sensitive-1
CPSPD	Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan-4-yl)phenylphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DIC	Differential interference contrast, Differentialinterferenzkontrast
DIG-dUTP	Digoxigenin-Desoxyuridyltriphosphat
DJ-PCR	double-joint PCR
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dpi	days post inoculation (Anzahl der Tage nach der Inokulation)
DsRed	<i>Discosoma</i> ssp. <i>Red</i> , rotes fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
Ekt.	Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , lat.: und andere

ExPASy	Expert Protein Analysis System, Proteomics-Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)
FASTA	Programm für den Vergleich einer Ausgangssequenz gegen Sequenzdatenbanken
for, fw, F	forward
gDNA	genomische DNA
GFP	Green Fluorescent Protein, grün fluoreszierendes Protein
GLS1	Glucansynthase 1
GzCHS5, GzCHS7	Chitinsynthase 5 bzw. 7 aus <i>Gibberella zeae</i>
x g	mal Erdbeschleunigung
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{dest}	einfach destilliertes Wasser
H ₂ O _{bide}	zweifach destilliertes (entionisiertes) Wasser
H3K9me3	Trimethylierung an Histon H3 Lysin an Position 9
H4K20me1, me2, me3	Mono-, Di- bzw. Trimethylierung an Histon H4 Lysin an Position 20
HAT	Histonacetyltransferase
HDA1	Histondeacetylase 1
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
<i>HindIII</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i>
HOS	HDA One Similar, HDAC aus <i>Sacharomyces cerevisiae</i>
<i>hph</i>	Hygromycin-Phosphotransferase-Gen
IBWF	Institut für Biotechnologie und Wirkstoff-Forschung
IT	Intron
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
KO	Knock out
LB	Lysogeny Broth
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein (MAP)-Kinase
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MoHDA1	Histondeacetylase 1 aus <i>Magnaporthe oryzae</i>
MoHOS2	HOS2 aus <i>M. oryzae</i>
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NaOH	Natriumhydroxid
<i>nat1</i>	Nourseothricin-Acetyltransferase-Gen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NEB	New England Biolabs
nes	nested
NES	Nuclear Export Signal (Kernexportsignal)
NLS	Nuclear Localization Signal (Kernlokalisationsignal)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
OMA	Oat Meal Agar (Haferflocken-Agar)
ORF	Open Reading Frame (offenes Leseraster)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDA	Potato dextrose agar (Kartoffel-Dextrose-Agar)
PEG	Polyethylenglycol
P _{gpdA}	Promotor des Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase-Gens aus <i>Aspergillus nidulans</i>
pH	lat.: <i>potentia hydrogenii</i> , Wasserstoffionenkonzentration
PKS1	Polyketidsynthase 1
PTFE	Polytetrafluoroethylen
rel. Einheiten	relative Einheiten

rev, R	reverse
RhoA	Ras homology family member A
Rho3	Ras homology family member 3
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species, reaktive Sauerstoffspezies
RPD3	Reduced Potassium Dependency 3, HDAC aus <i>S. cerevisiae</i>
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative PCR mit vorhergehender reverser Transkription
SAHA	Suberoylanilid-Hydroxamsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIR	Silent Information Regulator
siRNA	short interfering RNA
Spa2	Spindle pole associated 2
spp.	Spezies (Mehrzahl)
SSC	Sodium Salt Citrate (Natriumcitrat)
STC	Sorbitol/Tris/Calciumchlorid
<i>StuI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Streptomyces tubercidicus</i>
TAE	Tris/Acetat/EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
Tig1	Transducin β -like gene required for infectious growth 1
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>trpC</i>	Tryptophan-Synthase C-Gen
TSA	Trichostatin A
T_{trpC}	Terminator des Tryptophan-Synthase C-Gens aus <i>A. nidulans</i>
U	Units (Einheiten)
UAS	Upstream Activating Sequence
URS	Upstream Repressive Sequence
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent
x	mal
<i>XbaI</i>	Restriktionsendonuklease aus <i>Xanthomonas badrii</i>

Anmerkungen zur Schreibweise

Fremdsprachige Fachbegriffe wurden, wann immer es sinnvoll erschien, ins Deutsche übersetzt. Gebräuchliche Fachtermini aus dem englischen Sprachraum wurden übernommen, ohne dass eine besondere Kennzeichnung erfolgte. Für Art- und Gattungsnamen erfolgte die Wiedergabe in Kursivschrift. Genbezeichnungen wurden mit Großbuchstaben in Kursivschrift angegeben und Gendeletionen mit kursiven Kleinbuchstaben und delta, sofern eine bereits vorgegebene Nomenklatur dies nicht verhinderte. Proteine wurden mit Großbuchstaben gekennzeichnet.

I. Einleitung

I.1 Bedeutung von *Colletotrichum graminicola*

Colletotrichum graminicola (Cesati) Wilson [Teleomorph: *Glomerella graminicola* (Politis)] gehört zur Gruppe der Ascomyceten (Pyrenomycetes, Phyllachorales) und ist der Erreger von Anthraknose-Blattflecken und Stängelfäule an *Zea mays* L. (Bergstrom und Nicholson, 1999) (Abb. 1).

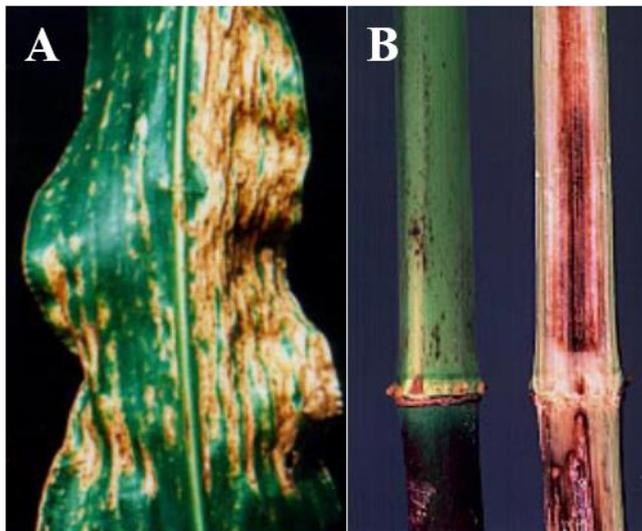


Abb. 1: Infektion von *Zea mays* durch *Colletotrichum graminicola*.

Typische Symptome von Anthraknose-Blattflecken (A) und Stängelfäule (B) (Bergstrom und Nicholson, 1999).

Als ökonomisch bedeutender Schaderreger trat *C. graminicola* in den frühen 1970er Jahren zunächst im nordamerikanischen Bundesstaat Indiana in Erscheinung. Auf drei voneinander unabhängigen Standorten führten ungewöhnlich schwere Anthraknose-Epidemien zum kompletten Ertragsausfall des Maiskultivars „Jubilee“ (Warren *et al.*, 1973). Die optimale Anpassung des Erregers an nordamerikanische maisbasierte Agroökosysteme führte in Verbindung mit einer

stark erhöhten Virulenz von *C. graminicola* sowie Modifikationen in der landwirtschaftlichen Anbaupraxis und der Nutzung anfälliger Maissorten zur effizienten Ausbreitung des Pathogens (Bergstrom und Nicholson, 1999). Zur Progression dieser Epidemie trugen außerdem ungünstige Wetterlagen bei. Durch die verstärkte Anpflanzung von weniger suszeptiblen Sorten konnte zwar die ökonomische Bedeutung des Schaderregers stark vermindert werden (Mims und Vaillancourt, 2002), jedoch erlangt die Maisanthraknose seit einigen Jahren wieder zunehmend an Bedeutung (Jirak-Peterson und Esker, 2011). Die durch *C. graminicola* verursachten Ertragsverluste werden für Nord- und Südamerika jährlich auf mehr als eine Milliarde US-Dollar geschätzt (Frey *et al.*, 2011). Dies gilt insbesondere für tropische und subtropische Regionen in Südamerika. Neue Studien zeigen, dass der Erreger seit einigen Jahren in Brasilien verstärkt auftritt und sich dort die Maisanthraknose inzwischen zur ökonomisch wichtigsten Krankheit an Mais entwickelt

hat (Matiello *et al.*, 2013; da Costa *et al.*, 2014). Die Größe der Fläche, auf der Mais angebaut wird, steigt signifikant. In den Jahren 2009/2010 betrug die geschätzte Maisanbaufläche in Brasilien 14 Millionen Hektar (Cota *et al.*, 2012). Die expandierenden Anbauflächen, Sommer- und Winteranbau und die Übernahme ackerbaulicher Maßnahmen ohne Bodenbearbeitung resultierten in einer gesteigerten Häufigkeit von Maiskrankheiten, wobei Anthraknose-Stängelfäule als besonders bedeutsam angesehen wird (Cota *et al.*, 2012; Matiello *et al.*, 2013). Auch in Europa vergrößerten sich die Flächen, auf denen Mais für Tierhaltung und Energieproduktion angebaut wird. In Deutschland stiegen die Anbauflächen von 1,64 Mio. ha (2003) auf 2,55 Mio. ha (2015, Stand: 12.06.2016). 2014 betrug die Anbaufläche in Europa 15,4 Mio. ha (<http://www.maiskomitee.de>; Stand: 05.10.2016). Diese Daten dokumentieren einen exzessiven Maisanbau, welcher für eine Ausbreitung von *C. graminicola* in Europa bzw. Deutschland von Bedeutung sein könnte.

Colletotrichum graminicola ist leicht axenisch kultivierbar, verfügt über eine kurze Generationsdauer und produziert *in vitro* große Sporenmengen. Ein weiterer positiver Aspekt ist, dass der Pilz in seiner Hauptlebensphase haploid vorliegt und für molekular-genetische Arbeiten leicht zugänglich ist. Dafür stehen etablierte Transformationsmethoden (Panaccione *et al.*, 1988; Epstein *et al.*, 1998; Flowers und Vaillancourt, 2005; Münch *et al.*, 2011) sowie mehrere Selektionsmarker zur Verfügung (Punt *et al.*, 1987; Namiki *et al.*, 2001; Malonek *et al.*, 2004). Dies erlaubt gezielte Gen-Deletionen, um den Beitrag dieser Gene zur Virulenz oder Pathogenität festzustellen. Aufgrund dieser Eigenschaften und der Verfügbarkeit von molekularbiologischen Methoden entwickelte sich *Colletotrichum graminicola* zu einem idealen Modellorganismus, an dem Pilz-Pflanze-Interaktionen studiert werden können. Untersuchungen von Deletionsmutanten und RNAi-Stämmen erbrachten signifikante Erkenntnisse über die Morphogenese von Infektionsstrukturen (Oliveira-Garcia und Deising, 2013) und über die Physiologie des Infektionsverlaufs (Albarouki und Deising, 2013; Albarouki *et al.*, 2014).

Ein wichtiger Fortschritt für das Verständnis von Pilz-Pflanze-Interaktionen ist, dass die Genome einer wachsenden Zahl phytopathogener Pilze und bereits einiger Wirtspflanzen sequenziert oder teilsequenziert vorliegen und die Genomsequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken publiziert sind bzw. werden, wodurch molekularbiologische Anwendungsmöglichkeiten entstehen. Auch das *C. graminicola*-Genom wurde vollständig sequenziert und die Sequenzen in der Datenbank des NCBI hinterlegt. Diese annotierten

Sequenzdaten erleichtern *in silico*-Analysen und molekulargenetische Arbeiten erheblich. Das Genom von *C. graminicola* umfasst rund 52 Mb mit ca. 12000 Genen, welche auf 13 Chromosomen verteilt sind. Im Jahre 2012 wurde dieser Datensatz durch Transkriptom-Analysen erweitert (O'Connell *et al.*, 2012). Als weitere sequenzierte phytopathogene Pilze mit agronomischer Bedeutung sollen an dieser Stelle *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp., *Magnaporthe oryzae*, *Pyrenophora tritici-repentis*, *Verticillium* spp. und *Ustilago maydis* angeführt werden. Für Modell- oder landwirtschaftlich bedeutsame Pflanzen wurden Sequenzierungen bereits abgeschlossen bzw. werden gegenwärtig durchgeführt. Hier sollen *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa*, *Glycine max*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Solanum lycopersicum*, *Triticum aestivum* und *Zea mays* (<http://www.plantgdb.org>; Stand: 05.10.2016) genannt werden.

I.2 Biologie von *Colletotrichum graminicola*

Als fakultativer Saprophyt ist *C. graminicola* in der Lage, auf abgestorbenen Pflanzen zu wachsen oder auf Ernteresten am Boden zu überwintern. Auf diesen wird im darauffolgenden Frühjahr das primäre Inokulum gebildet (Bergstrom und Nicholson, 1999). In Sporenlagern, den sogenannten Acervuli, werden asexuell sichelförmige Sporen (Konidien) gebildet, welche mit Hilfe von Regentropfen auf die Blattoberfläche des Wirtes gelangen und zur Primärinfektion der Wirtspflanze führen. Durch das Auftreffen der Spore auf die Pflanzenoberfläche werden pilzliche Signaltransduktionskaskaden induziert, welche dann die Expression von Genen aktivieren, die für die Etablierung einer kompatiblen Wirt-Parasit-Interaktion erforderlich sind. Dabei handelt es sich um sekretierte Glykoproteine, die ein Adhäsionskissen bilden, wodurch die Anheftung der Spore auf der Blattoberfläche gewährleistet wird, und welche dabei durch sekretierte Cutinasen und Esterasen unterstützt werden (Pascholati *et al.*, 1993; Mercure *et al.*, 1994b; Mercure *et al.*, 1994a; Anderson und Nicholson, 1996). Nach der Anheftung der Spore erfolgt die Differenzierung eines kurzen Keimschlauches, der ein Appressorium bildet. Für die Differenzierung dieser Infektionsstrukturen spielt die Beschaffenheit der Pflanzenoberfläche eine wichtige Rolle. Für *C. graminicola* haben sich harte, hydrophobe Flächen als besonders effektiv erwiesen (Chaky *et al.*, 2001). Nach der Differenzierung der Appressorien werden von diesen ebenfalls Adhäsive ausgeschieden, um die Anheftung an die Wirtsoberfläche zu gewährleisten. Reife Appressorien sind unter dem Lichtmikroskop durch ihre dunkelbraune Färbung, welche durch die Einlagerung von Melanin in die Appressorienzellwand hervorgerufen wird, gut erkennbar. Es wurde vermutet, dass

Melanin die Permeabilität der Zellwand drastisch herabsetzen würde, sodass die im Appressorium synthetisierten, osmotisch wirksamen Substanzen die Zelle nicht verlassen können. Dadurch baut sich ein osmotisches Potential auf, infolgedessen Wasser einströmt (De Jong *et al.*, 1997). Es kommt zum Aufbau eines enormen Turgors, mit dessen Hilfe die Penetrationshyphye in die Wirtszelle eindringt. Für diesen Druck konnte eine Kraft von ca. 17 μN ermittelt werden (Bechinger *et al.*, 1999).

Melanindefiziente Mutanten von *M. oryzae* (Chumley und Valent, 1990), *C. lindemuthianum* (Wolkow *et al.*, 1983) oder *C. lagenarium* (Kubo *et al.*, 1982) sind nicht mehr in der Lage, intakte Wirtsoberflächen zu penetrieren. Aus diesen Gründen wurde für phytopathogene Pilze, die melanisierte Appressorien zur Penetration der Wirtsoberfläche nutzen, Melanin als unverzichtbar für die Generierung des Turgors angesehen. Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass Melanin für die Turgorgenerierung in *C. graminicola* nicht erforderlich ist. Melanindefiziente *C. graminicola*-Stämme ($\Delta pks1$) sind nicht mehr in der Lage, intakte Maisblätter zu infizieren. Die auf der Blattoberfläche differenzierten $\Delta pks1$ -Appressorien ruptuierten häufig, jedoch zeigten Zytorrhizieexperimente, dass der in den $\Delta pks1$ -Appressorien generierte Turgor im Vergleich zum Wildtyp nicht reduziert war. Diese Ergebnisse wurden durch Experimente zur Penetrationskompetenz auf artifiziellen PTFE-Membranen bestätigt (Ludwig *et al.*, 2014). Aufgrund dieser Studie kann angenommen werden, dass Melanin weniger für die Generierung von appressorialem Turgor als für die Zellwandstabilität von *C. graminicola* von Bedeutung ist. In einer anderen Arbeit konnte für den Erreger des Sojabohnenrosts, *Phakopsora pachyrhizi*, der die Wirtsoberfläche mittels nichtmelanisierter Appressorien penetriert, gezeigt werden, dass der in diesen Appressorien generierte Druck größer ist als der in melanisierten *C. graminicola*-Appressorien. Außerdem konnte festgestellt werden, dass keine verminderte Penetrationsrate auf artifiziellen Membranen vorlag (Ludwig, 2012). Dass Melanin für die Turgorgenerierung nicht erforderlich ist, konnte kürzlich in zwei Studien gezeigt werden (Loehrer *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 2014). Diese Ergebnisse tragen zur kritischen Betrachtung der Aussage bei, dass ein hoher Turgor nur in melanisierten Appressorien aufgebaut werden kann. Lange Zeit ging man auch davon aus, dass Glycerol der vorherrschende, wenn nicht sogar alleinige Osmolyt ist, der zur Generierung des osmotischen Potentials bei turgorgetriebenen Penetrationsprozessen erforderlich ist (De Jong *et al.*, 1997). Kürzlich konnte für *Phakopsora pachyrhizi*-Appressorien nachgewiesen werden, dass es sich bei den osmotisch wirksamen Substanzen hauptsächlich um

das C₆-Polyol Mannitol (49 %), gefolgt von C₅-Polyolen, Glucose, Glycerol und Myo-Inositol handelte (Loehrer *et al.*, 2014).

Nachdem nun *C. graminicola* die Wirtsoberfläche penetriert hat, werden in der Wirtsepidermiszelle ein Infektionsvesikel und Primärhyphen gebildet, die die Plasmamembran der Wirtszelle vorerst nicht durchdringen. Dadurch bleibt die Integrität der Wirtszelle erhalten. In dieser Phase der Infektion lebt der Pilz biotroph im apoplastischen Bereich der Zelle. Nach ca. 48 h werden invasive Sekundärhyphen differenziert, welche in benachbarte Zellen eindringen und die nekrotrophe Lebensphase einleiten. Zusätzlich werden zellwandabbauende Enzyme sekretiert (Bergstrom und Nicholson, 1999). Als Folge der destruktiven Lebensweise treten äußerlich nekrotische Blattflecken in Erscheinung. Aufgrund des biphasischen Infektionsverlaufs spricht man von Hemibiotrophie (Perfect *et al.*, 1999; Perfect und Green, 2001). Mit der Bildung neuer Konidien in den Acervuli, die auf nekrotischem Gewebe entstehen, wird der asexuelle Entwicklungszyklus abgeschlossen.

I.3 Epigenetische Regulationsmechanismen

Eine zentrale Rolle für die Steuerung biologischer Prozesse nehmen molekulare Regulationsmechanismen ein, die im Gebiet der ‚Epigenetik‘ untersucht werden. Die ‚Epigenetik‘ unterlag im 20. Jahrhundert mehreren Bedeutungsänderungen. Conrad Hal Waddington erwähnte erstmals den Begriff ‚Epigenetik‘ und beschrieb damit einen Prozess, bei dem der Genotyp den Phänotyp verursachte (Waddington, 1942). Zu dieser Zeit war allerdings die physische Natur von Genen als Vererbungseinheiten noch unbekannt. Eine restriktivere Bedeutung bekam die ‚Epigenetik‘ mit der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Genexpression. Robin Holliday definierte ‚Epigenetik‘ als „das Studium von Mechanismen der zeitlichen und räumlichen Kontrolle der Gen-Aktivität, während der Entwicklung komplexer Organismen“ (Holliday, 1990). Durch den Einschluss des Begriffs ‚Vererbbarkeit‘ wird unter ‚Epigenetik‘ eine Reihe von Mechanismen mitotischer und/oder meiotisch vererbbarer Veränderungen der Genfunktion verstanden, die nicht auf Mutationen, also Änderungen in der DNA-Sequenz selbst, zurückzuführen sind (Russo *et al.*, 1996).

Die Epigenetik-Forschung untersucht die Summe von Chromatinveränderungen, welche kollektiv unterschiedliche Genexpressionsmuster etablieren und propagieren, aber auch zu Stilllegungen im Genom führen können (Allis *et al.*, 2007). Diese Variabilität der Genexpression wird durch epigenetische Modifikationen und Mechanismen ermöglicht, die

sich in Reaktion auf Umweltreize verändern können. Zu diesen Veränderungen zählen DNA-Methylierung (Ng und Bird, 1999), Histonmodifikationen (Spencer und Davie, 1999), aber auch RNA-Silencing (RNA-Inaktivierung bzw. -Interferenz). Auf die Histonmodifikationen soll im Folgenden weiter eingegangen werden.

I.3.1 Histonmodifikationen

Angesichts der Tatsache, dass ein menschlicher Zellkern mit einem Durchmesser von 10 μm DNA-Moleküle mit einer Gesamtlänge von etwa zwei Metern beinhaltet (Turner, 2007), wird deutlich, dass DNA effizient verpackt werden muss. In einer eukaryontischen Zelle wird die DNA im Zellkern an Histone gebunden und dadurch zu einer komplexeren Struktur, dem Chromatin, organisiert. Histone sind relativ kleine basische Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-12 kDa. Man unterscheidet die relativ hoch konservierten Kern-Histone H2A, H2B, H3, H4 und das variabelere, weniger konservierte Linker-Histon H1. Zu einem Oktamer assemblieren jeweils zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4. Um dieses winden sich 145-147 bp der DNA und bilden den Nukleosomenkern. Die funktionelle Einheit aus Nukleosomenkern, Linker-DNA und Linker-Histon H1 wird als Nukleosom bezeichnet (Luger *et al.*, 1997) (Abb. 2). Das Chromatosom ist eine Untereinheit des Nukleosoms aus den Bestandteilen Nukleosomenkern und Linker-Histon H1 mit den zusätzlichen 23 Basenpaaren Linker-DNA, die an das Linker-Histon H1 gebunden sind (Simpson, 1978).

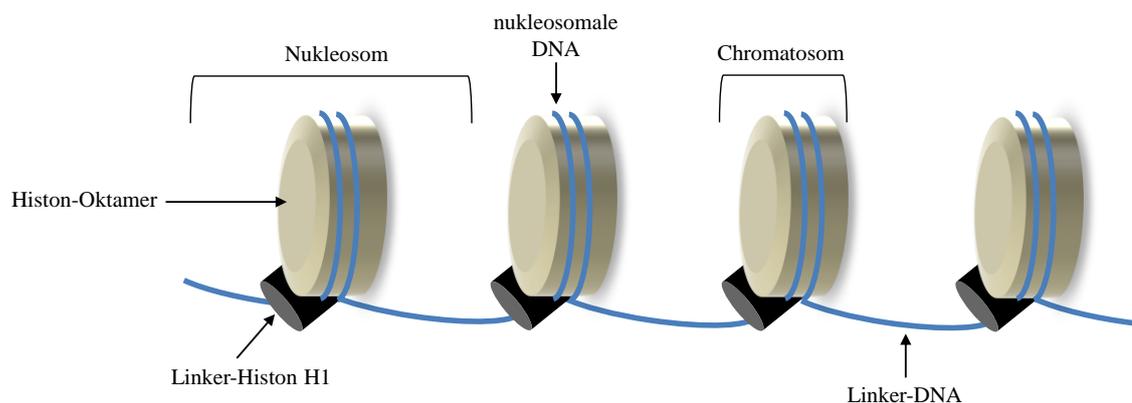


Abb. 2: Schematische Darstellung der Grundeinheiten des Chromatins. Das Histon-Oktamer besteht aus jeweils zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4.

Die Organisation in Nukleosomen trägt zu einer dichten Packung bei, da die lineare Ausdehnung der DNA drastisch verringert wird. Als nächstes nehmen die Nukleosomen eine helikale Struktur an und bilden ein Solenoid, woraus der nächst höhere Verpackungsgrad der DNA resultiert. Die Solenoidstruktur wird durch das Linker-Histon H1 stabilisiert (Thoma *et al.*, 1979). Mittels dieser organisierten Verpackung und der epigenetischen Modifikationen ist es möglich, die DNA so effizient zu kompaktieren, dass sie im Zellkern Platz findet und gleichzeitig gewährleistet wird, dass trotz dieser Kondensation grundlegende Prozesse wie Transkription und Replikation ablaufen können. Hierfür muss zuvor der Zugang zur DNA ermöglicht werden, was durch Histonmodifikationen realisiert wird. Dafür werden an speziellen Aminosäuren in den exponierten N-terminalen Enden von Histonen, durch die Aktivität spezifischer Enzyme, Modifikationen wie Acetylierung (Kouzarides, 2000), Methylierung (Chen *et al.*, 1999), Phosphorylierung (Hsu *et al.*, 2000), ADP-Ribosylierung (Jacobson und Jacobson, 1999) und Ubiquitinierung (Baarends *et al.*, 1999) vorgenommen. Bisher konnten über 50 dieser epigenetischen Markierungen kartiert werden (Jenuwein, 2006). Abbildung 3 gibt eine Auswahl an möglichen epigenetischen Modifikationen an den jeweiligen exponierten N-Termini der Histone wieder. Diese Markierungen sind reversibel, wodurch ein dynamisches Umschalten innerhalb eines breiten Spektrums zwischen transkriptionsaktiven und -inaktiven Chromatinzuständen (Euchromatin bzw. Heterochromatin) möglich wird (Turner, 2007).

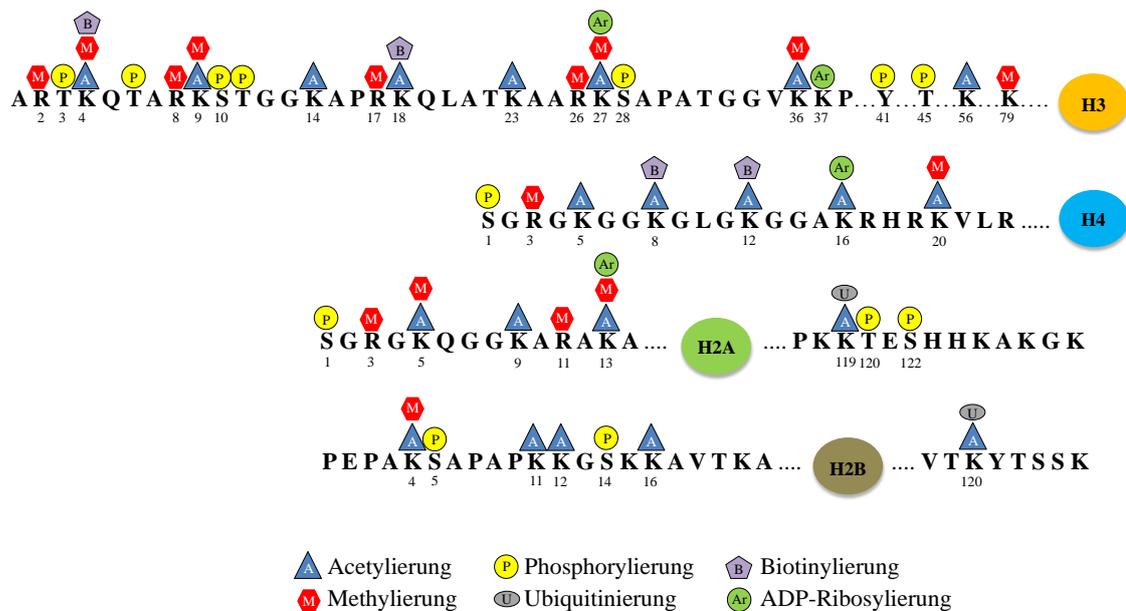


Abb. 3: Schematische Darstellung möglicher epigenetischer Markierungen an ausgewählten Aminosäureresten der Histone H3, H4, H2A und H2B.

Diese Zusammenstellung orientiert sich an Histonmodifikationskarten von abcam (www.abcam.com (07.10.2016)) und Active Motif (www.activemotif.com; 07.10.2016).

I.3.1.1 Histonacetylierung als epigenetische Modifikation

Histonacetylierung ist eine ubiquitär vorkommende Histonmodifikation (Csordas, 1990). Man unterscheidet zwischen der Acetylierung von ϵ - und α -aminoterminalen Lysinresten, wobei letztere während der Synthese (cotranslational) von H2A und H4, aber auch bei der vieler anderer Proteine eine Rolle spielt. Soweit man weiß, können einmal erfolgte α -aminoterminal Acetylierungen weder verändert werden, noch kommt ihnen eine Bedeutung in der Regulation der Chromatinstruktur zu (Csordas, 1990).

Der Grad der Acetylierung kann durch die Aktivität zweier Enzyme dynamisch verändert werden. Die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf Histone durch Histonacetyltransferasen (HATs) bewirkt eine Neutralisation des Ladungszustandes der Lysinreste. Diese äußert sich in einer Schwächung der Histon:DNA-Interaktion (Allfrey und Mirsky, 1964), der Histon:Histon-Interaktion zwischen benachbarten Nucleosomen (Luger *et al.*, 1997; Wolffe und Hayes, 1999) und der Interaktion von Histonen mit regulatorischen Proteinen (Hecht *et al.*, 1995; Edmondson *et al.*, 1996). Die Entfernung der Acetylgruppe erfolgt durch Histondeacetylasen (HDACs). Daraus resultiert z.B. eine Stabilisation der Histon:DNA-Interaktion und dies hat zur Folge, dass Promotorelemente für aktivierende Transkriptionsfaktoren nicht zugänglich sind (Leipe und Landsman, 1997). HDACs bewirken somit transkriptionelles Gensilencing.

Da weder HATs noch HDACs direkt an DNA binden können, erfolgt eine Rekrutierung durch DNA-bindende Aktivator- bzw. Repressorproteine (Abb. 4) (Kurdistani und Grunstein, 2003; Allis *et al.*, 2007). Histonacetyltransferasen und -deacetylasen sind somit Teil größerer Proteinkomplexe.

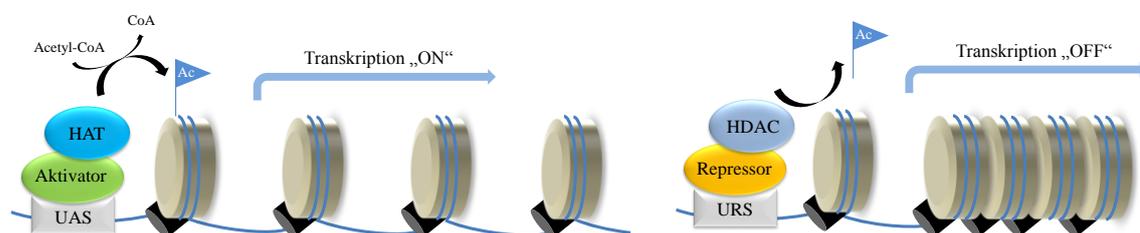


Abb. 4: Auswirkungen des Acetylierungsgrades auf die Transkription.

Die Erzeugung von lokal acetyliertem (Ac) bzw. deacetyliertem Chromatin erfolgt durch die indirekte Bindung von HATs an eine UAS (upstream activating sequence) bzw. von HDACs an eine URS (upstream repressive sequence) eines Promotors über einen sequenzspezifischen DNA-Aktivator bzw. -Repressor (nach Allis *et al.*, 2007).

I.3.1.2 Histondeacetylasen

Anhand von Sequenzähnlichkeiten und Cofaktor-Abhängigkeiten konnten bislang zwei Familien von HDACs identifiziert werden: (1) NAD⁺-abhängige HDACs, welche Homologe des Silent information regulator 2 (Sir2) aus Hefe sind und (2) „klassische“ HDACs, deren Aktivität von dem Vorhandensein von Zink abhängt (Yang und Seto, 2007). Das katalytische Zentrum enthält ein Zink-Ion, welches durch Seitenketten von Histidin- und Asparaginresten cheliiert wird (siehe rot markierte Zinkbindestellen in Anhang I, Abb. 35). In Pilzen wurden zwei Klassen von „klassischen“ HDACs identifiziert: der RPD3-Typ (Klasse I) und der HDA1-Typ (Klasse II), welche jeweils Orthologen aus Hefe entsprechen (*Saccharomyces cerevisiae*) (de Ruijter *et al.*, 2003). Proteine der Klasse I-HDACs sind zumeist Teil nukleärer Multiproteinkomplexe und daher im Zellkern lokalisiert. Klasse II-HDACs regulieren zytoplasmatische Prozesse oder transduzieren Signale zwischen Zytoplasma und Zellkern (shuttling) und können somit im Zellkern oder im Zytoplasma lokalisiert sein (Khochbin und Wolffe, 1997; Verdin *et al.*, 2003; Yang und Grégoire, 2005). Das nukleozytoplasmatische Trafficking wird zum einen durch den Besitz intrinsischer Kernimport- und -exportsignale realisiert und zum anderen durch verschiedene Interaktionspartner, wenn kein NLS vorhanden ist. So wird z. B. die Kernlokalisierung von humanen Klasse II-HDACs durch das Binden von MEF2 (Myocyte enhancer factor 2) gefördert. Im Gegensatz dazu stimulieren 14-3-3-Proteine deren zytoplasmatische Retention in einer phosphorylierungsabhängigen Art (Verdin *et al.*, 2003; Gregoret *et al.*, 2004; Nishino *et al.*, 2008). Enzyme beider Klassen besitzen eine evolutionär konservierte Region und werden deshalb zur Histondeacetylase-Superfamilie zusammengefasst (Khochbin und Wolffe, 1997; Leipe und Landsman, 1997). Diese sogenannte acuC/APH-Homologiedomäne weist eine signifikante Homologie zu prokaryontischen Enzymen (Acetoin Utilization Enzyme, acuC, und Acetylpolylamin-Aminohydrolase, APH) auf, welche Reaktionen mit acetylierten Substraten katalysieren.

Die funktionelle Bedeutung von HATs und HDACs, und damit des Acetylierungsgrades, wird durch deren fundamentalen regulatorischen Einfluss in entwicklungsbiologischen Prozessen hervorgehoben. Deregulierte HATs und HDACs werden z.B. mit Krebsprogression (Leukämie, Brustkrebs), aber auch diversen menschlichen Funktionsstörungen wie Rubinstein-Tabi- und Fragiles X-Syndrom oder inflammatorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Timmermann *et al.*, 2001). Klasse I- und Klasse II-HDACs können durch den Einsatz von HDAC-Inhibitoren wie Natriumbutyrat, Trichostatin A (TSA) oder

Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA), gehemmt werden (Sawa *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2002; Herold *et al.*, 2002). TSA wurde ursprünglich aus *Streptomyces hygroscopicus*-Kulturen als Metabolit mit antibiotischer Wirkung isoliert (Tsuji *et al.*, 1976). Durch Kristallstrukturuntersuchungen konnte später gezeigt werden, dass die Inhibition durch Komplexierung des Zinkatoms im aktiven Zentrum von Histondeacetylasen vermittelt wird (Finnin *et al.*, 1999). Nachdem Histondeacetylasen als intrazelluläres Target von TSA identifiziert wurden (Yoshida *et al.*, 1990), eröffnete dies neue Möglichkeiten in der Chromatinforschung, da der Grad der Histonacetylierung manipuliert werden konnte (Yoshida *et al.*, 1995). Die Inhibitoren TSA oder SAHA verursachen in diesem Zusammenhang einen Zustand persistenter Histonacetylierung bzw. die Akkumulation acetylierter Histone, was zur Expression spezifischer Gen-Sets führen kann, die wiederum Zellarrest und Apoptose bewirken (Thiagalingam *et al.*, 2003). Die Eigenschaft der Inhibition macht HDACs zu einem attraktiven Ziel für die Behandlung humaner Erkrankungen.

Die Funktion und Bedeutung von HDACs wird an einer Reihe von Modellorganismen, z. B. *S. cerevisiae* (Bernstein *et al.*, 2000), *Caenorhabditis elegans* (Tissenbaum und Guarente, 2001), *Drosophila melanogaster* (Åström *et al.*, 2003) und *A. thaliana* (Hollender und Liu, 2008), intensiv untersucht. Studien an phytopathogenen filamentösen Pilzen liegen bereits vereinzelt vor. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivität bestimmter Histondeacetylasen für den Infektionsprozess von essentieller Bedeutung ist. In *Cochliobolus carbonum* führte die Deletion von *HDC1* zu einer stark reduzierten Virulenz (Baidyaroy *et al.*, 2001). In *Magnaporthe oryzae* konnten HDACs eine Relevanz für vegetatives Wachstum, Konidienbildung und für die Differenzierung von Appressorien nachgewiesen werden (Izawa *et al.*, 2009). Des Weiteren können *M. oryzae*-Deletionsmutanten von Tig1, das Teil des Histondeacetylase-Komplexes ist, während der Infektion keine invasiven Hyphen ausbilden, was zur vollständigen Apathogenität führte (Ding *et al.*, 2010). Die Deletion von *HDF1* in *Fusarium graminearum* und *Hda1* bzw. *Hda2* in *Fusarium fujikuroi* führte zu signifikanten Veränderungen in der Sekundärmetabolit-Biosynthese, darunter auch von Toxinen aus der Gruppe der Trichothecene (Deoxynivalenol) (Li *et al.*, 2011; Studt *et al.*, 2013). HDACs spielen aber nicht nur in Ascomyceten eine wesentliche Rolle, sondern auch für die Entwicklung von Teleutosporen des Basidiomyceten *Ustilago maydis* (Reichmann *et al.*, 2002).

I.3.2 RNA-Silencing

RNA-Silencing bzw. RNA-Interferenz (RNAi) beruht auf einem RNA-abhängigen RNA-Abbau, der in der Genforschung zur partiellen Inaktivierung ausgewählter, oft essentieller, Gene Anwendung findet, um deren Funktion zu untersuchen. Während die Transkription des Zielgens weiterhin normal abläuft, wird hingegen die Translation durch selektive Degradation von intakter kodierender mRNA vermindert, infolgedessen weniger Proteine gebildet werden. Dieser Prozess beinhaltet die Generierung von doppelsträngiger RNA (dsRNA), die anschließende Prozessierung in siRNA (short interfering RNA) und das Hinführen dieser Moleküle zur mRNA (posttranskriptionelles Gen-Silencing) oder in Chromatinregionen (transkriptionelles Gen-Silencing), um Stilllegungen auszulösen (Heterochromatisierung). So konnte z. B. in Pflanzen gezeigt werden, dass dsRNA genomische Methylierungen hervorrufen kann oder die Genexpression inhibiert, wenn die dsRNA-Sequenzen komplementäre Sequenzen zum Promotor aufweisen (Wassenegger *et al.*, 1994; Mette *et al.*, 2000).

Vermutlich handelte es sich bei diesem hoch konservierten Prozess um einen Mechanismus zum mRNA-Abbau, über den Eukaryonten verfügen, um sich vor invasiven Nukleinsäuren (z. B. Viren) zu schützen. Die Effekte von RNAi wurden erstmalig in Pflanzen an Petunien und in dem Ascomyceten *Neurospora crassa* beschrieben (Napoli *et al.*, 1990; Cogoni und Macino, 1997). Darüber hinaus konnte man nachweisen, dass dieser Mechanismus auch einen Schutz gegen das „Springen“ von transposablen Elementen bietet und repetitive Elemente durch Heterochromatisierung für Rekombinationsereignisse unzugänglich machen kann (Tabara *et al.*, 1995; Ketting *et al.*, 1997).

Damit z. B. bei einem viralen Angriff zelluläre mRNAs vom Abbau ausgeschlossen sind, muss die Zielstruktur für das RNA-Silencing doppelsträngig sein. Virale Genome, die in ihrer natürlichen Form bereits doppelsträngig vorliegen oder sich über eine Zwischenstufe aus doppelsträngiger RNA replizieren, sind davon betroffen. Bestimmte Proteine erkennen lange doppelsträngige RNAs und bilden eine Bindestelle für Ribonukleasen einer Familie, die als Dicer bezeichnet wird. Dicer schneiden dsRNA in 21-28 Nukleotid lange siRNAs (Abb. 5), wodurch das Virusgenom inaktiviert wird.

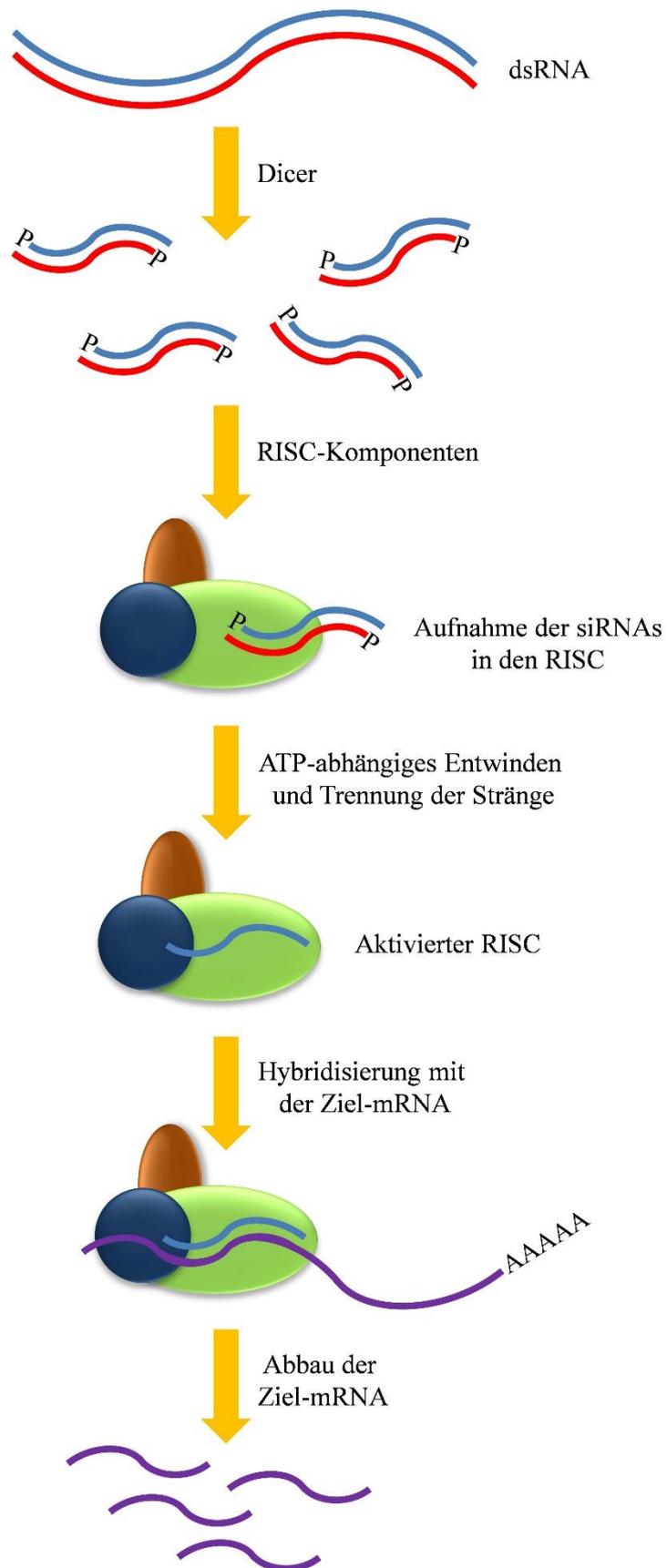


Abb. 5: Mechanismus der RNA-Interferenz.

Bei der RNA-Interferenz gibt es eine zweite Phase. Diese stellt sicher, dass z. B. bereits transkribierte Virusgene abgebaut werden können. Die durch Spaltung des Virusgenoms entstandenen siRNAs werden von dem RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) aufgenommen, dort unter ATP-Verbrauch entwunden und in Einzelstränge gespalten (Abb. 5). Die in den RISCs präsentierten siRNAs haben eine Länge von ca. 22 Nukleotiden (Hammond *et al.*, 2001). In dem aktiven RISC-Enzymkomplex hybridisieren dann die zu dem bereits aufgenommenen Strang komplementären Sequenzen (z.B. virale RNA), welches zum Abbau der mRNA durch eine Endonuklease im RISC führt (Abb. 5). Somit bestimmt der in den RISC aufgenommene Einzelstrang, welche mRNA degradiert wird. Dieser Enzymkomplex enthält u.a. sogenannte Argonaut-Proteine, denen scheinbar eine essentielle Funktion für die Nukleaseaktivität des RISCs zukommt (Hammond *et al.*, 2001). Mittlerweile ist es gelungen, den zugrunde liegenden Mechanismus weitgehend aufzuklären.

Eine erste Beschreibung des molekularen Prozesses lieferten Arbeiten in den 1990er Jahren mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*. Nach den Untersuchungen von Guo und Kemphues (1995), welche herausfanden, dass in Fadenwürmern zur Supprimierung der Genexpression sense und antisense RNA gleichermaßen effizient sind, versuchten Fire, Mello und Mitarbeiter zunächst, durch antisense RNA die Genexpression zu inhibieren (Guo und Kemphues, 1995; Fire *et al.*, 1998). Die entscheidende Entdeckung war jedoch, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA einen 10fach stärkeren Effekt hervorrief als die simultane Injektion einzelsträngiger sense- oder antisense-RNA (Fire *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis führte zu der Schlussfolgerung, dass dsRNA einen effizienten Silencing-Mechanismus auslöst, bei dem exogene dsRNA die Menge der Ziel-mRNA signifikant zu reduzieren vermag (Fire *et al.*, 1998). Für diese Entdeckung wurden Andrew Fire und Craig Mello 2006 mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin geehrt. Nach der Entdeckung der RNA-Interferenz dienten hauptsächlich *C. elegans*, *D. melanogaster* und *Mus musculus* als intensiv untersuchte Modellorganismen. Dabei wurden auch unterschiedliche Darreichungsformen der dsRNA etabliert. Diese schließen z. B. *in vivo*-Transkription und -Injektion, Fütterungsversuche (feeding), das Inkubieren in Flüssigkeit, in der sich dsRNA befindet (soaking), und die Übertragung von dsRNAs durch virale Vektoren ein (Buckingham *et al.*, 2004). Durch diese vielfältigen Verabreichungsmöglichkeiten konnte RNAi ausgiebig erforscht werden. Für die Grundlagenforschung ist von immenser Bedeutung, dass durch die Anwendung von RNAi das Studium

von Genfunktionen möglich wird, ohne dabei eine möglicherweise letale Deletion zu induzieren.

I.3.2.1 RNAi in filamentösen Pilzen

Um die Funktion essentieller Gene zu studieren, bietet sich der Einsatz von induzierbaren Promotoren oder RNAi an. Von Vorteil dabei ist, dass die RNAi-Expressionskonstrukte transient oder stabil exprimiert werden können, was bei letzteren Langzeitstudien erlaubt. Oftmals werden aber auch doppelsträngige siRNAs erzeugt und dann zusammen mit dem zu transformierenden Organismus bzw. mit der zu transformierenden Struktur (gekeimte Sporen) inkubiert (soaking) (Eslami *et al.*, 2014).

RNA-Silencing wird bereits routinemäßig zur Herabregulation von Genen in filamentösen Pilzen eingesetzt. Es wurden einige proof-of-concept-Arbeiten publiziert, die zeigten, dass das Verfahren im gewünschten Organismus angewendet werden kann. Hierbei kommen i.d.R. Fluorophore wie GFP oder DsRed zum Einsatz. GFP oder DsRed exprimierende Organismen werden dafür mit RNAi-Expressionskassetten transformiert, welche die Expression des Fluorophors herabsetzen (Kadotani *et al.*, 2003; Leng *et al.*, 2011). Besonders von Vorteil sind auch Gene, die durch das Silencing einen Phänotyp liefern, der bereits visuell wahrzunehmen ist. Für die Polyketidsynthase 1 ist z. B. bekannt, dass diese in der Melaninbiosynthese involviert ist. $\Delta pks1$ -Deletionsmutanten aus *C. graminicola* sind durch das vollkommene Fehlen von Melanin charakterisiert (Albino-Phänotyp) (Ludwig *et al.*, 2014). Das Silencing von *PKS1* in *Cochliobolus sativus* oder *Chaetomium globosum* führte zu einer graduellen Abstufung des Melaningehaltes, wodurch potentielle RNAi-Transformanten bereits frühzeitig erkannt bzw. selektiert werden konnten (Leng *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2012).

RNAi wurde in filamentösen Pilzen zum Studium von Genen herangezogen, die für Effektoren (Bolton *et al.*, 2008), zellwandabbauende Enzyme (Nguyen *et al.*, 2011; van Vu *et al.*, 2012) oder Zellwandbiogenesekomponenten (Liu *et al.*, 2013a; Oliveira-Garcia und Deising, 2013; Oliveira-Garcia und Deising, 2016) kodieren oder im Sekundärmetabolismus (Aboukhaddour *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Izumi *et al.*, 2012), im Eisenmetabolismus (Eslami *et al.*, 2014), in der ROS-Produktion (Kim *et al.*, 2011) und der Signaltransduktion (Li *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012) beteiligt sind.

I.4 Ziele der Arbeit

Epigenetische Faktoren sind an einer Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt. Als Histonmodifikation kommt dabei der Acetylierung eine besondere Stellung für die Schaffung von transkriptionsaktiven Chromatinbereichen und damit für die Aktivierung von Genen zu. Bisher publizierte Daten zeigten, dass Histondeacetylierung für die Pathogenese pflanzenpathogener Pilze bedeutsam ist (Cuperlovic-Culf und Culf, 2014). Hinsichtlich pathogener und vegetativer Differenzierung sind die Genfunktionen bisher jedoch unzureichend aufgeklärt, sodass die Grundlagenforschung hier weitere wertvolle Beiträge leisten kann. Das Verstehen dieser Regulationsmechanismen könnte zu einer Entwicklung wirksamer Bekämpfungsstrategien beitragen.

Das zentrale Ziel dieser Dissertation ist daher die umfassende funktionelle Analyse von Klasse 1- und Klasse 2-Histondeacetylasen und deren Relevanz für Differenzierungs- und Pathogenitätsprozesse von *C. graminicola*. Um dieses Ziel zu erreichen, sollen zwei unterschiedliche Herangehensweisen verfolgt werden. Der molekulare Ansatz beinhaltet die gezielte Deletion von Histondeacetylase-Genen. Befunde aus der Literatur deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei *HDA1* um ein essentielles Gen handelt. In der Forschung hat sich das RNAi-vermittelte Herabregulieren von Transkriptmengen bereits in einer Vielzahl von filamentösen Pilzen bewährt und ist eine exzellente Methodik, um essentielle Genfunktionen zu studieren. Diese Gene bzw. deren Funktionen stellen sogleich attraktive Ziele für die Wirkstoffentwicklung dar. Mittels detaillierter Mikroskopiestudien der generierten Deletionsmutanten und RNAi-Stämme sollen Erkenntnisse über den Einfluss von Histondeacetylasen auf die Morphologie differenzierter Strukturen sowie auf den Infektionsverlauf gewonnen werden.

Enzymfunktionen können außerdem über chemische Ansätze studiert werden, indem Inhibitoren oder Aktivatoren zur Modifikation der Aktivität eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit soll die Rolle der Histondeacetylierung während des vegetativen Wachstums mithilfe des spezifischen Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A untersucht werden.

Weiterhin sind Experimente geplant, um Histondeacetylasen zu lokalisieren und bezüglich einer zellspezifischen Expression zu untersuchen. Begleitend werden Metabolitanalysen durchgeführt, um den Beitrag von HDACs an der Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese zu ermitteln. Ferner sollen auch ausgewählte Histonacetyltransferase-Gene deletiert und die entsprechenden Mutanten bezüglich ihres Infektionsvermögens untersucht werden.

II. Material und Methoden

II.1 Biologisches Material

II.1.1 Bakterien

II.1.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli XL1-Blue (Stratagene) und *Escherichia coli* DH5 α (New England Biolabs, Frankfurt am Main) wurden in Petrischalen auf LB-Agar (**M2**, siehe II.2.1.1) bei 37 °C im Inkubator (Stuart SI500 Shaking Incubator, Keison, England) herangezogen. Die Kultivierung in Flüssigmedium erfolgte durch Animpfen von LB-Flüssigmedium (**M1**) mit einer Einzelkolonie und anschließender Inkubation bei 37 °C und 200 rpm im Kulturschüttler (Classic C25, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA). Zur selektiven Kultivierung von Bakterien wurde dem Medium nach dem Autoklavieren das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt.

II.1.2 Pilzmaterial

II.1.2.1 *Colletotrichum graminicola*

Das Wildtyp-Isolat M2 von *Colletotrichum graminicola* wurde als Referenzobjekt und Ausgangsmaterial verwendet (Panaccione *et al.*, 1988; Bergstrom und Nicholson, 1999). Die Kultivierung erfolgte auf Haferflockenagar (**M3**) in Petrischalen bei 23 °C, um die Konidienbildung zu induzieren. Flüssigkulturen wurden in Kompletmedium (**M4**) angesetzt und auf einem Taumelschüttler (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) fünf bis sieben Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Gewinnung des Myzels wurde das Medium abgossen, das Myzel zurückgehalten und zwischen Papiertüchern getrocknet.

Konidien aller verwendeten Isolate wurden von OMA-Kulturen (**M3**) in sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen und in 25 % (v/v) Glycerin bei -80 °C gelagert.

II.1.3 Pflanzen

II.1.3.1 *Zea mays*

Die in dieser Dissertation verwendeten Maispflanzen (*Zea mays*) waren ausschließlich von den Sorten „Mikado“ (KWS Saat AG, Einbeck) und „Golden Jubilee“ (Territorial Seed Company, Cottage Grove, OR, USA). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus für 14 Tage unter folgenden Bedingungen: Temperatur 6:00-22:00 Uhr bei 25 °C, 22:00-6:00 Uhr bei 20 °C; Belichtung von 6:00-22:00 Uhr unter Flächenstrahlern SILL 9004737199 mit PLANTASTAR 600 W E40 Lampen (OSRAM, München). Fünf Pflanzen wurden pro Topf (9 x 9 x 9,5; Göttinger, Göttingen) angezogen, welcher mit Einheitserde ED73 (Hochmoortorf, Naturton und NPK Düngung) und Vermiculit im Verhältnis 14:1 gefüllt war. Pflanzen für Ganzpflanzentests wurden einzeln in Ray Leach „Cone-tainer“™ SC10 (Stuewe & Sons, Tangent, Oregon, USA) unter den oben genannten Bedingungen angezogen. Für die Stängelinfectionen wurden 6 Wochen alte Maispflanzen (*Zea mays* cv. Golden Jubilee) verwendet, die unter der oben genannten Bedingungen angezogen und alle 2 Wochen mit Flüssigdünger (TiP) im NPK-Verhältnis 7-3-6 gedüngt wurden.

II.1.3.2 *Allium cepa*

Küchenzwiebeln wurden als unbehandeltes Bioprodukt im Lebensmitteleinzelhandel erworben.

II.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Auf Bezugsquellen von Enzymen und Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten wird an den entsprechenden Textstellen verwiesen.

Synthetische Oligonukleotide lieferten die Firmen biomers.net GmbH (Ulm) und Eurofins Genomics (Ebersberg). Sämtliche Verbrauchsmaterialien wurden über die Firma B. Heinemann (Duderstadt) bezogen.

II.2.1 Nährmedien, Puffer und Lösungen

II.2.1.1 Nährmedien

M1: LB-Flüssigmedium, Lysogeny Broth

In einem Gesamtvolumen von 1000 ml wurden 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt und 5 g NaCl in H₂O_{dest} gelöst und autoklaviert. Für die Kultivierung transformierter Bakterien mit einer Ampicillin-Resistenzkassette wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin (**L10**) zugefügt.

M2: LB-Agar

M1 mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar. Nach dem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde dem Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben (**L10**).

M3: Haferflockenagar, Oat Meal Agar, OMA, (Koneman *et al.*, 1997)

Zur Herstellung von Haferflockenagar wurden 25 g homogenisierte Haferflocken und 6 g Agar-Agar in 500 ml destilliertes Wasser gegeben und anschließend 45 Minuten autoklaviert.

M4: Komplettmedium, Complete Medium, CM (modifiziert nach (Leach *et al.*, 1982))

Je 10 ml der Stammlösung A (**L1**) und B (**L2**) wurden zusammen mit 10 g Glucose, 1 g Hefeextrakt sowie 1 g Caseinhydrolysat in H₂O_{dest} in einem Gesamtvolumen von 1000 ml gelöst und autoklaviert. Für festes Medium wurde 1,5 % (w/v) Agar-Agar hinzugegeben.

M5: Kartoffeldextrose-Agar, Potato Dextrose Agar, PDA

Zur Herstellung werden 24 g PDB (Potato Dextrose Broth) (Formedium™, Hunstanton, Norfolk, Großbritannien) und 15 g Agar-Agar in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst und anschließend 25 Minuten autoklaviert. Hygromycin B (**L11**), Nourseothricin (**L12**) bzw. Geneticin (G418) (**L13**) wurde nach dem Abkühlen in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

M6: Glucose-Minimalmedium für Wachstumsversuche

Für das Minimalmedium wurden je 10 ml der Stammlösungen A (**L1**) und B (**L2**), 5 g Glucose und 15 g Agarose vereint. Anschließend wurden alle Komponenten in 1000 ml destillierten Wasser gelöst.

M7: HMG-Medium

In einem Gesamtvolumen von 1000 ml wurden 4 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Malzextrakt und 10 g/l Glucose in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst und autoklaviert.

M8: Sporulationsmedium

In einem Gesamtvolumen von 1000 ml wurden 171,2 g Saccharose und 2 g Hefeextrakt in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gelöst und autoklaviert.

M9: Regenerationsmedium

In 1000 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ wurden 342,3 g Saccharose, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat und 6 g Agar-Agar gelöst und autoklaviert. Regenerationsmedium mit eingebetteten Protoplasten wurde zum Überschichten von Selektionsmedium (**M10**) verwendet.

M10: Selektionsmedium

M9 mit 1,5 % (w/v) Agar-Agar und 400 $\mu\text{g/ml}$ eines geeigneten Antibiotikums; Hygromycin B, Nourseothricin oder Geneticin.

Sämtliche Medien wurden, falls nicht anders angegeben, 25 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Die Zugabe von hitzesensitiven Bestandteilen erfolgte nach dem Abkühlen auf 50 °C.

II.2.1.2 Puffer**P1: DNA-Extraktionspuffer I**

7 M Harnstoff

2 % (w/v) SDS

5 mM EDTA

pH 8,0

P2: DNA-Extraktionspuffer II

150 mM NaCl
5 mM EDTA
50 mM Tris-HCl
pH 8,0

P7: 1x TAE-Puffer

20 mM Natriumacetat
2 mM EDTA
40 mM Tris-HCl
pH 8,3

P8: 1x Natriumborat-Puffer

20 mM Natriumborat
mit Borsäure pH 6,7 einstellen

P9: 6x DNA-Ladepuffer

30 % (v/v) Glycerin
60 % 10x TAE-Puffer (oder Natriumborat-Puffer)
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

P10: Transferpuffer, 20x SSC

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat
pH 7,5

P11: Maleinsäurepuffer

150 mM NaCl
100 mM Maleinsäure
pH 7,5

P12: 2x Waschpuffer

2x SSC
0,1 % (w/v) SDS

P13: 0,5x Waschpuffer

0,5x SSC

0,1 % (w/v) SDS

P14: 0,25x Waschpuffer

0,25x SSC

0,1 % (w/v) SDS

P15: Hybridisierungspuffer

5x SSC

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

0,02 % (w/v) SDS

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

P16: Waschpuffer M

150 mM NaCl

0,3 % (v/v) Tween20

100 mM Maleinsäure

pH 7,5

P17: Blocking-Puffer1 % (w/v) Blocking Reagenz in Maleinsäurepuffer (**P11**)

autoklaviert

P18: Detektionspuffer

100 mM NaCl

100 mM Tris-HCl

pH 9,5

P19: STC-Puffer

1 M Sorbitol

50 mM Tris-HCl

50 mM CaCl₂

pH 8,0; sterilfiltriert

P20: PEG-Puffer

40 % (w/v) Polyethylenglykol 4000
600 mM KCl
50 mM CaCl₂
10 mM Tris-HCl
pH 8,0

P21: McIlvaine Puffer

0,01 M Citronensäure
0,02 M Na₂HPO₄,
25 % Glycerol
pH 7,0

Die Puffer wurden, falls nicht anders angegeben, 25 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Filtersterilisationen erfolgten unter Verwendung von Minisart-Filtern (Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) mit einer Porengröße von 0,2 µm.

II.2.1.3 Lösungen**L1: Stammlösung A**

50 g Ca(NO₃)₂
ad 500 ml H₂O_{bidest}

L2: Stammlösung B

10 g KH₂PO₃
12,5 g MgSO₄ x 7·H₂O
2,7 g NaCl
ad 500 ml H₂O_{bidest}

L3: Denaturierungslösung

0,4 M NaOH

L4: Depurinierungslösung

0,25 M HCl

L5: TSS-Lösung

LB-Medium (M1) mit
10 % (w/v) PEG6000
5 % (v/v) DMSO
50 mM MgSO₄
pH 6,5; autoklaviert

L6: Lactophenol

20 % (v/v) Milchsäure
20 % (v/v) Phenol
40 % (v/v) Glycerin
20 % (v/v) H₂O_{bidest}

L7: Entfärbelösung

Ethanol:Essigsäure im Verhältnis 3:1

L8: Anilinblau-Lactophenol

0,025 % (w/v) Anilinblau in Lactophenol (L6)

L9: DAPI

0,2 µg/ml DAPI in McIlvaine Puffer (P21)

L10: Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L11: Hygromycin-Stammlösung

100 mg/ml Hygromycin B (InvivoGen, Toulouse, Frankreich) in HEPES-Puffer
geliefert

L12: Nourseothricin-Stammlösung

100 mg/ml Nourseothricin (Werner BioAgents, Jena) in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

L13: Geneticin (G418)-Stammlösung

100 mg/ml Geneticin ((Gibco™) Thermo Fisher Scientific, Schwerte) in
HEPES, sterilfiltriert

L14: Trichostatin A

10 mM Trichostatin A (AdooQ Bioscience, Irvine, CA. USA) in DMSO

L15: 5-Azacytidin (ACROS Organics (Thermo Fisher Scientific, Schwerte))

50 mM Stammlösung in H₂O_{bidest}, sterilfiltriert

Die Filtersterilisation hitzesensitiver Lösungen erfolgte unter Verwendung von Minisart-Filtern (Satorius Stedim Biotech GmbH Göttingen) mit einer Porengröße von 0,2 µm.

II.2.2 Vektoren

Tab. 1: Verwendete Vektoren

Vektor	Referenz
pAN7-1	Punt <i>et al.</i> , 1987
pNR1	Malonek <i>et al.</i> , 2004
pII99	Punt <i>et al.</i> , 1987; Namiki <i>et al.</i> , 2001; Malonek <i>et al.</i> , 2004
pREDi	Janus <i>et al.</i> , 2007
pJET1.2/blunt	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
pJET.CgHDA2.eGFP.final	Mickel, 2010
pSH1.6EGFP	Amir Sharon
pUC18	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
pJET.HP1:eGFP	Arbeitsgruppe Entwicklungsgenetik Prof. Dr. G. Reuter

II.2.3 Oligonukleotide

Tab. 2: Verwendete Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
uni-hyg.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACTGACCGGTGCCTGGATCTTC
uni-hyg.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACGGTCGGCATCTACTCTATTCC
uni-nours.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACATTCGGGCCGGATTG
uni-nours.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACACCGATGAAACGATTCTCAAC
uni-G418.F1	TGTACGACTGTCAGTTGCACAGCGGTTGTTGGATTAAG
uni-G418.R1	AAGCTAGTGAGACTCCAGACCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
Nours_F02	CTCTTGACGACACGGCTTAC
Nours_R02	GGCAGGGCATGCTCATGTAG
Nours_F03	TGACCGTCGAGGACATC
Hyg.Sonde.F1	TGAACTCACCGCGACGTCTG
Hyg.Sonde.R1	TGACGGTGTCTCCATCACAG
G418-Sonde.for	GGATTGCACGCAGGTTCTCC

G418-Sonde.for2	GCACGTA ^C CTCGGATGGAAGC
G418-Sonde.rev	GGAGCGGCGATAACCGTAAAG
pJET1.2 fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET1.2 rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
PoliC-For	CCGCTCTAGAGCCGCATTC
Ttub-Rev	AAGCTTGATATCTGTTAGTAATCATCATTAAAG
Cg-SQ_7	ACAGCGGTCATTGACTGGAG
EGFP.F1	GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG
CgHDA1-qRT.F1	TCGGTATCCTCGAACTACTC
CgHDA1-qRT.R1	CGATGACAGGCTCAAAGATG
CgH3_qRT.F1	CGAGATCCGTCGCTACCAGA
CgH3_qRT.R1	GGAGGTCGGA ^C CTTGAAGTCCT
CgACT-qRT.F1	TCCTACGAGCTTCCTGACGG
CgACT-qRT.R1	CCGCTCTCAAGACCAAGGAC
Cg-ITS2-F1.1	CGTCGTAGGCCCTTAAAGGTAG
Cg-ITS2-R1	TTACGGCAAGAGTCCCTC
CgHDA1 5'fw	CAGCTCTGAGCAGCCTGGCG
CgHDA1 5'rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGCTTCGGTCGGTGTTCAGTGG
CgHDA1 5'fw nes	AGCTAGCCCGGTCCGGTACG
CgHDA1 5'fw nes neu	TTGTAGCTGACAAACAGTCACG
CgHDA1 3'fw	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTTTCGCCCTCGCCTTTTGACTGC
CgHDA1 3'rev	TTGGGGCGACCACTCGGCATGC
CgHDA1 3'fw nes	CTAGCAATTGTGGCCAATAGC
CgHDA1 3'fw nes neu	ATAGGTAGTAGCTAGGAAATAGG
CgHDA1 Sonde2_F	CAACCCCTCCACACGTCAACC
CgHDA1 Sonde2_R	CGTGAATCTTTTACCAGATCGG
PRedPtrpC-F1	TTCTTAAGTTCGCCCTTCCTCCC
PRedTrpC-R1	CCGGAGCTGACATCGACACCAAC
SQ_Cut2-F1	ATAGTGTACCCACTGGAGATTG
SQ_Cut2-R1	TGCATGGCCAACAAATCTCCAG
CgHDA1s-XhoI.F	GAC <u>CTCGAG</u> TGGACGCCGACATCACTCTG
CgHDA1s-HindIII.R	CAGCA <u>AGCTTT</u> CCTTCTTGGCGCTATCATC
CgHDA1i-StuI.F	CTA <u>AGGCCTT</u> CCTTCTTGGCGCTATCATC
CgHDA1i-ApaI.R	CCG <u>GGGCCCT</u> TGGACGCCGACATCACTCTG
5' Flanke CgHDA1 fw	GTTCTCCCATGTGGTCACTG
CgHDA1rev ApaI_Eco81I	TAAC <u>CTTAGGGGG</u> CCCTCCTTCTTGGCGCTATCAT
GFP fw ApaI	AAC <u>GGGCCCC</u> GAAATGGTGAGCAAGGGCG
G418 rev PsiI_Eco81I	CGG <u>CCTTAGGTTATA</u> ACCGGGTCAGTAACGTAAAG
3' Fl. CgHDA1 fw PsiI	GCG <u>TTATAA</u> TGCCCTCGCCTTTTGACTG
3' Fl. CgHDA1 rev Eco81I	TAAC <u>CTTAGG</u> CAATTGTGGCCAATAGCTC
CgHDA2 5'fw	GGTCACATTTGGGCTCCTGC
CgHDA2 5'fw nes	AAGCACACCTAGATTCATCC
CgHDA2-PoliC fw	CCGCTCTAGAGCCGCATTCCCGATTCCGGCCGGATTGGTC

CgHDA2-PoliC rev	GGAATGCGGCTCTAGAGCGGTCAATACTCCATAGCATGTC
CgHDA2 3'rev	CATGAGGCCAAGGATGCCGG
CgHDA2 3'rev nes	GGCCGAGCCGTGAAAAGGTTCG
CgHDA2_T_5'for	CAATAGATCGAGGGCCTCAAG
CgHDA2_T_3'rev	CGAGCACACCATTGGTTCTCC
CgHDA3 5'fw	CAGCTCCCACCTTGTCAG
CgHDA3 5'fw nes	CTCCGTCTTGTTCACTCACTC
CgHDA3 5'rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAAGTGCGCGGGCGGGCTTCGAC
CgHDA3 3'fw	TCTGGAGTCTCACTAGCTTGCAAGAGGAATAAGATGAATC
CgHDA3 3'rev nes	GTGTTGAAGAGGGTAAGTAAGG
CgHDA3 3'rev	CCGTGATGATGACAACGC
CgHDA3 Sonde rev	GAGTCTCACGCTCTACCGATTG
CgHDA3_T_5'for	ATCTCCCAGATAGGCTGACCC
CgHDA3_T_3'rev	ATCGATCATCCAGTGCCGATTC
HDA3eGFP5'F-F1	AACAAGGATGCGGCCAGAG
HDA3eGFP5'F-F1nes	TTGCCAAGGTCCAGAGCTAC
HDA3eGFP5'F-R1	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACAGTCATCTTGTCATCTTCTG
CgHDA4 5'fw	CAAGCCTTGAACATGCCATC
CgHDA4 5'fw nes	GAAAGACATAAACAGGGCTGG
CgHDA4 5'rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGCAAAGGCGCAAGACCCATG
CgHDA4 3'fw	TCTGGAGTCTCACTAGCTTTTTGAATGTTGGAAATTAGAC
CgHDA4 3'rev nes	AAGCGGGTGAGTGAACG
CgHDA4 3'rev	CTGGAGGAGGTGAGTCAG
CgHDA4 Sonde rev	GTTGACTCGCATGGATGATGG
CgHDA4_T_5'for	CTCCTCCAACACCTGGTAAAC
CgHDA4_T_3'rev	GGTCCAACATCCCAGTACAAC
HDA4eGFP5'F-F1	GTGGCTTCGAATGCTTCAGAG
HDA4eGFP5'F-F1nes	ATGAGCGTCCGACCAGATTC
HDA4eGFP5'F-R1	AGCTCCTCGCCCTTGCTCACTTTTTGCGGAGTCTCGGGGA
CgHAT1 5'fw	CCGGCGAAGAAAGACCTG
CgHAT1 5'fw nes	GAGAGTATAGGTGGCCATTC
CgHAT1 5'rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAGGCGGCGACAGAAGTATGAGC
CgHAT1 3'fw	TCTGAAGTCTCACTAGCTTCCTTGCTCTTGTCACCTACTTC
CgHAT1 3'rev nes	GCCAAGGTCTGCAACAC
CgHAT1 3'rev	TCATGGCGCACGACTTTG
CgHAT1 Sonde rev	CAATGCGTAAAGAGCGAGAC
CgHAT1_T_5'for	TGCGACGCAGTTCTTTCTC
CgHAT1_T_3'rev	CGCGAAGTAAGTGACAAGAG
CgKAT11 5'fw	TCGCAAGTCAATCCCAGAAAG
CgKAT11 5'fw nes	CCCAGATATGCCAGCTTGTC
CgKAT11 5'rev	GTGCAACTGACAGTCGTACAGATGTGATTAATTGCGAGAAATG
CgKAT11 3'fw	TCTGGAGTCTCACTAGCTTCACATGAATTTGAAAGCTATGG
CgKAT11 3'rev nes	CCCCTCAAGAAGATCACG

CgKAT11 3'rev	CCCAATCTGCGACAAGTTCAT
CgKAT11 Sonde rev	CTAAGTGTCTTAAGGCCGAAGC
CgKAT11_T_5'for	CAGCCATGACATGACCTTTG
CgKAT11_T_3'rev	TCCAACGCCTTGCTACTG
CgELP3 5'fw	GGCGGTTATGTGTATTGGTTTG
CgELP3 5'fw nes	AAAGAGCGCAGCCTCAAC
CgELP3 5'rev	GTGCAACTGACAGTCGTACACTTGACAGAGAAGTGCGTGG
CgELP3 3'fw	GTCTGGAGTCTCACTAGCTTAGATGTCCCTGGAGACTATTAATG
CgELP3 3'rev nes	CGACCTATATCACCACCACAAC
CgELP3 3'rev	GTGCCCGGTTAGACGTTTC
CgELP3 Sonde rev	CAACGGTCCGCCATTGAAG
CgELP3_T_5'for	CTCACAACTCTTCCGAACTGG
CgELP3_T_3'rev	CTTCATCGTCATGCATTCGC
CgChsV_qRT.F1	TCCCGTCATCCCTCTACAAGTC
CgChsV_qRT.R1	ACCCTGAGACAAGGCAATGG
CgRho3_qRT.F1	CCCACCGTCTTCGAGAACTAC
CgRho3_qRT.R1	GGCGAAGCAGATCAGGATGAC
CgCot-1_qRT.F1	GAGGGTCAGTACCTGCGATTC
CgCot-1_qRT.R1	CTCGGTCTTGATCAGGGACTTC
CgSpa2_qRT.F1	AAGCTCGACGCCATGGAAG
CgSpa2_qRT.R1	TTCGGCGAGCTTGTCTCC
CgGLS1_qRT.F1	ACAAGGTTCCGAGGAGGATTC
CgGLS1_qRT.R1	GCCGTACGAGATCTGAGAAGAAG
GLRG_04203 for	TCAATCTGAGCCCTGGACAC
GLRG_04203 rev	GTCCTGAGATCGCCAAGCTG

Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

II.3 Infektionsversuche

II.3.1 Pflanzeninfektion

II.3.1.1 Gewinnung von Konidien und Einstellen der Konidienkonzentration

Colletotrichum graminicola-Konidien von 2-3 Wochen alten Haferflockenagar-Kulturen (**M3**) wurden unter sterilen Bedingungen durch mehrfaches Abschwemmen eines Areals der Petrischale in 1 ml H₂O_{dest} aufgenommen. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte lichtmikroskopisch durch Auszählen der Zellen eines Aliquots der Konidien suspension mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (LO-Laboroptik, Friedrichsdorf) bei 100facher Vergrößerung im Hellfeld (Forschungsmikroskop Eclipse E600; Nikon,

Düsseldorf). Durch Verdünnen der Konidiensuspension mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ wurde die benötigte Endkonzentration hergestellt.

II.3.1.2 Maisinokulation

Blattsegmente von 8-10 cm Länge des 3. Folgeblatts 14 Tage alter Maispflanzen (*Zea mays* cv. Mikado, *Zea mays* cv. Golden Jubilee) wurden in quadratischen Petrischalen auf Filterpapier (Rotilabo®-Rundfilter, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mittels Klebeband fixiert und anschließend das Filterpapier im Deckel angefeuchtet. Die Inokulation mit Konidien der zu untersuchenden Isolate erfolgte mit 10- μl -Tropfen einer Suspension von 10^6 Konidien/ml, welche in 0,02 % (v/v) Tween 20 aufgenommen wurden. Zu jedem Infektionsexperiment erfolgte eine Kontrollinokulation mit 0,02 % (v/v) Tween 20. In einigen Fällen wurden auch verwundete Maisblätter inokuliert. Dafür wurde mittels einer sterilen Pipettenspitze an der Inokulationsstelle eine artifizielle Läsion erzeugt. Die Inokulation erfolgte bis zur Symptomaufnahme bei Raumtemperatur. Alternativ wurden Ganzpflanzen inokuliert, die bei den unter II.1.3.1 genannten Bedingungen angezogen wurden. Diese Anzuchtmethode war nötig, da die Pflanzen vor der Inokulation waagrecht in große Plastikschrallen gelegt und die Blätter mittels Klebeband fixiert wurden. Die Ray Leach "Cone-tainer"™ wurden anschließend für die folgenden 24 h mit feuchtem Filterpapier bedeckt, um ein Austrocknen der Wurzeln zu verhindern. Die fixierten Blätter wurden mit 10- μl -Tropfen der Sporensuspension inokuliert. Es wurde darauf geachtet, dass ein Mindestabstand von 1 cm zwischen den Tropfen bestand. Die Schalen wurden anschließend mit einem Deckel und zusätzlicher Plastikfolie verschlossen und für 24 h bei 25 °C und Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen wieder aufgerichtet und in den S1-Sicherheitskabinen des Gewächshauses unter Normalbedingungen (siehe II.1.3.1) weiter kultiviert.

Für die Stängelinfektionen wurden die Blattscheiden/Hüllblätter von 6 Wochen alten Maispflanzen (*Zea mays* cv. Golden Jubilee) vom unteren Teil des Stängels bis zum dritten Nodium über der Bodenlinie entfernt. Mittels steriler Zahnstocher wurde mittig im ersten Internodium über den Stützwurzeln eine einzelne Wunde gesetzt. Die Inokulation erfolgte mit 10- μl -Tropfen mit $5 \cdot 10^6$ Sporen/ml in die Wunde hinein. Anschließend wurde die Inokulationsstelle mit Parafilm verschlossen, um die vom Pilz benötigte Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Nach einer Woche wurde der Parafilm entfernt und die inokulierten Pflanzen für eine weitere Woche im Gewächshaus mit den unter II.1.3.1 genannten Bedingungen kultiviert. Die Bonitur erfolgte 14 Tage nach der Inokulation,

wobei das infizierte Internodium längs gespalten wurde. Die Quantifizierung der Primärläsion erfolgt mit ImageJ 1.50e.

II.3.1.3 Zwiebelinokulation

Mit Hilfe von Lanzettnadel und Pinzette wurden vorsichtig Zwiebelepidermen (ca. 1 x 1 cm) präpariert und in Petrischalen auf 1,5%igem (w/v) Wasseragar fixiert. Die Inokulation erfolgte mit 10 µl einer Suspension von 10⁵ Konidien/ml in H₂O_{dest.} Der gesamte Ansatz wurde bei 23 °C im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden nach ein bis vier Tagen mikroskopisch analysiert.

II.3.1.4 Zytorrhizie

Von den zu untersuchenden Pilzstämmen wurden zunächst Sporen von Haferflockenkulturen abgespült und eine Sporensuspension von 10⁵ Konidien/ml in H₂O_{dest.} eingestellt. Mit 10 µl dieser Sporensuspension wurden Polyesterfolien (nobo OHP Transparency Film, Staples Deutschland GmbH & Co.KG, Berlin) inokuliert und diese in verschlossenen Petrischalen 24 h bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurden von den Folien mittels eines saugfähigen Tuches vorsichtig die Tropfen entfernt, sodass die nicht angehefteten Sporen beseitigt wurden. Die mikroskopische Auswertung erfolgte nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur durch Zählung der kollabierten Appressorien in wässrigen Lösungen mit PEG6000-Konzentrationen von 100-600 g/l. Gezählt wurden jeweils drei mal 100 Appressorien pro Pilzisolat. Der osmotische Druck der verwendeten PEG-Lösungen wurde mit der folgenden Gleichung berechnet: $\Pi = \alpha * C + \beta * C^2$ (Money, 1989).

Die Erhebung von Zytorrhizie-Daten für *Δhda2*-Stämme erfolgte wie beschrieben, jedoch wurde der Boden von Petrischalen inokuliert, da auf Polyesterfolien nicht genügend Appressorien gebildet wurden.

II.4 Wachstums- und Sporulationsversuche

Die Quantifizierung des vegetativen Wachstums von Wildtypisolat und RNAi- bzw. Deletionsmutanten erfolgte in Petrischalen (ø 9 cm) unter Verwendung von festen Medien (**M3**, **M5**, **M6**). Medien für Wachstumsversuche enthielten stets Agarose. Mit Hilfe eines Korkbohrers erfolgte die Entnahme von Agarblöckchen definierter Größe (ø 0,4 cm) aus der Myzelwachstumszone von OMA-Kulturen (**M3**). Sämtliche Ansätze

wurden bei 25 °C und Dunkelheit im Inkubator (Classic C25, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert.

Wachstumsversuche mit Trichostatin A oder 5-Azacytidin erfolgten in Petrischalen (5,5 cm Durchmesser) unter Verwendung von festen Medien. CM-Kulturen (**M4**) mit TSA bzw. 5-Azacytidin (0, 0,1, 0,5 und 1 ppm) wurden mit Agarblöckchen inokuliert, bei 23 °C im Dunkeln inkubiert und das Wachstum täglich gemessen.

Das Sporulationsvermögen pilzlicher Isolate wurde auf OMA (**M3**) durchgeführt. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze erfolgte die Entnahme von Sporen von OMA-Kulturen (**M3**). Die entnommenen Sporen wurden auf neue OMA-Platten transferiert. Sämtliche Ansätze wurden bei 23 °C und Dunkelheit im Inkubator (Classic C25, New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert. Die Sporen wurden 14 dpi durch Abspülen gewonnen, als die Kulturen jeweils die gleiche Fläche einnahmen, damit Sporulationsdefizite durch Wachstumsverzögerungen ausgeschlossen werden konnten. Die Sporen wurden anschließend mittels einer Thomakammer gezählt.

II.5 Molekularbiologische Methoden

II.5.1 Präparation von Nukleinsäuren

II.5.1.1 Präparation von genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA nach Döbbeling (Döbbeling *et al.*, 1997) wurde eine Flüssigkultur des Pilzes in Kompletmedium (**M4**) kultiviert. Nach circa 7 Tagen wurde das Myzel geerntet und auf saugfähigem Papier kurz abgetrocknet. Mittels eines vorgekühlten Mörsers und Pistills wurde das Myzel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerstoßen, dieses noch in gefrorenem Zustand in ein 2-ml-Reaktionsgefäß gegeben und in 800 µl Extraktionspuffer I (**P1**) aufgenommen. Nach Zugabe von 800 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Proben kräftig gemischt. Durch Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5403, Festwinkel-Rotor 16F24-11, Hamburg) für 10 min bei 14500 x g und 4 °C fand eine Phasentrennung statt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen an Chloroform versetzt und analog dem vorhergehenden Schritt extrahiert und zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA aus der wässrigen Phase mit 1 Volumen Isopropanol durch 60-minütige Inkubation bei -20 °C gefällt. Danach wurde die DNA 15 min bei 6800 x g und 4 °C sedimentiert.

Das erhaltene Pellet wurde anschließend in 700 µl Extraktionspuffer II (**P2**) resuspendiert. RNA und Proteine wurden durch eine 30-minütige Behandlung mit 3,5 µl RNase A (10 mg/ml RNase A, Roche Diagnostics, Mannheim) bei 37 °C sowie durch eine anschließende Inkubation mit 10 µl Proteinase K (20 mg/ml Proteinase K, Roche Diagnostics, Mannheim) bei 60 °C für 60 min verdaut. Danach folgten erneut eine Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol- und Chloroform-Extraktion mit anschließender Isopropanol-Fällung (siehe oben). Die präzipitierte DNA wurde 20 min bei 14500 x g und 4 °C zentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum wie eben beschrieben zentrifugiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstands mit Hilfe einer Pipette wurde das DNA-Sediment unter der Sterilbank getrocknet und anschließend in 50 µl sterilem H₂O_{bidest} aufgenommen. Anschließend wurde mittels eines NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) eine Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung durchgeführt.

II.5.1.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Anzucht der Bakterien wurden 5 ml LB-Medium (**M1**) in ein 15-ml-Greiner Röhrchen überführt und mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt. Anschließend wurde das Medium mit einer Einzelkolonie *E. coli*-Bakterien angeimpft, die das gewünschte Plasmid trugen, und für 12-16 h bei 37 °C sowie 200 rpm im Inkubationsschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) angezogen. Die Plasmidpräparation wurde mittels GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.5.1.3 Präparation von DNA aus Agarosegelen

Um unerwünschte Nebenprodukte aus PCR-Reaktionen zu entfernen oder spezifische Fragmente aus Reaktionsgemischen zu isolieren, wurde mittels GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) eine Agarosegelreinigung nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.5.1.4 Präparation von RNA

Für die Isolierung von RNA aus *in vitro*-Pilzhyphen wurde eine Flüssigkultur des Pilzes im gewünschten Medium angezogen, das Myzel nach 5 Tagen geerntet und auf saugfähigem Papier kurz abgetrocknet. Mittels eines vorgekühlten Mörsers und Pistills wurde das

Myzel unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver zerstoßen und damit ein 2-ml-Eppendorfgefäß zu einem Viertel befüllt.

Die Art der Aufarbeitung von infiziertem Pflanzenmaterial wich von dieser Vorgehensweise ab. Im Falle ausgestanzter Blattscheiben, welche in einem 2-ml-Eppendorfgefäß mit 2 x 3 mm Stahlkugeln in flüssigen Stickstoff eingefroren waren, wurde zur Homogenisierung der Tissue-Lyser (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Um ein Antauen der Proben und eine daraus resultierende RNA-Degradation zu vermeiden, wurde der Probenadapter ebenfalls in flüssigem Stickstoff vorgekühlt. Die Homogenisierung erfolgte für 60 s bei 30 Hertz.

Die Proben wurden anschließend in RLT-Buffer (Qiagen, Hilden) aufgenommen. Die weitere RNA-Isolierung erfolgte mittels peqGOLD Plant RNA Kit (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde mittels NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) eine Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung durchgeführt. Die Überprüfung der RNA-Integrität erfolgte mittels Agilent 2100 Pico6000 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Waldbronn) nach Herstellerangaben.

II.5.1.5 Reinigung von DNA-Amplifikaten

Die Methode zur Reinigung von PCR-Produkten orientierte sich wesentlich an dem Protokoll des GeneJET™ PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) und erfolgte nach Herstellervorgaben.

Die generierten PCR-Produkte, welche für die Protoplastentransformation von *C. graminicola* eingesetzt wurden, sind einer Nukleinsäurepräzipitation unterzogen worden. Dabei wurde der gesamte Ansatz mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5) und 2,5 Vol. 100 % Ethanol versetzt, gut durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Danach schloss sich eine 10-minütige Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5403, Festwinkel-Rotor 16F24-11, Hamburg) bei 13000 rpm und 4 °C an. Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet 20 min an der Luft getrocknet. Die Resuspension des Präzipitats erfolgte in 60 µl H₂O_{bidest} und wurde bis zum Einsatz für die Protoplastentransformation in Eppendorf-Reaktionsgefäßen auf Eis gelagert.

II.5.2 Gelelektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden TAE-Gele mit einer Agarosekonzentration von 0,8 bis 1 % (w/v) bzw. Natriumborat-Gele mit einer Agarosekonzentration von 1,5 % hergestellt (Seakem LE-Agarose; Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf). Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in 1x TAE- (P7) bzw. Natriumborat-Puffer (P8) gegeben und durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Zum Aushärten der flüssigen Gele wurden diese in einen Gelträger gegossen und ein Gelkamm eingesetzt. DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer (P9) versetzt und mit Hilfe einer Pipette in die Geltaschen überführt. Als Größenstandard wurden DNA-Fragmente definierter Länge (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mitgeführt. Durch Anlegen einer konstanten Spannung (60-120 V für TAE-Gele und 250 V für Natriumborat-Gele) an die Elektrophoresekammer (Modell 2; Mechanikwerkstatt Universität Konstanz bzw. Modell HU13; biostep, Jahnsdorf) wurden die Fragmente im Gel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid (1 µg/ml) 20 Minuten gefärbt. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer AlphaImager-Videodokumentationsanlage (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) aufgezeichnet.

II.5.3 Southern-Hybridisierung

II.5.3.1 Herstellung DIG-markierter Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Digoxigenin(DIG)-dUTP in einer Standard-PCR (II.5.4.1). Verwendet wurde ein spezieller DIG-dNTP-Mix, bestehend aus je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, 0,19 mM dTTP und 0,1 mM DIG-dUTP (Alkalilabil; Roche Diagnostics, Mannheim). Es wurden sowohl Hybridsonden als auch genspezifische Sonden hergestellt. Hybridsonden waren ca. 900 bp lang und bestanden aus ca. 400 bp des 3'-Bereichs des Selektionsmarkers (*hph*, *nat1*, *nptII*) und ca. 500 bp des 3'-flankierenden Bereichs des Zielgens (Terminator). Als Template wurden die entsprechenden Deletionskassetten verwendet, welche als Plasmide vorlagen, oder auch gDNA. Ein paralleler Kontrollansatz ohne DIG-dUTP wurde zusammen mit dem Sondenfragment in einem Agarosegel aufgetrennt. Aufgrund des Einbaus von DIG-dUTP wird das Fragment im Agarosegel retardiert und der Erfolg der Markierung kann am veränderten Laufverhalten der Sonde überprüft werden.

Verwendete Primer für die Hybridsonden:

CgHDA1: Cg-SQ_7 x CgHDA1 Sonde2_R

CgHDA2: Nours_F03 x CgHDA2 Sonde rev

CgHDA3: Cg-SQ_7 x CgHDA3 Sonde rev; Nours_F03 x CgHDA3 Sonde rev; G418-Sonde.for2 x CgHDA3 Sonde rev

CgHDA4: Cg-SQ_7 x CgHDA4 Sonde rev; G418-Sonde.for2 x CgHDA4 Sonde rev

CgHAT1: Cg-SQ_7 x CgHAT1 Sonde rev

CgKAT11: Cg-SQ_7 x CgKAT11 Sonde rev

CgELP3: Cg-SQ_7 x CgELP3 Sonde rev

Verwendete Primer für die genspezifischen Sonden:

Hygromycin – *hph*: Hyg.Sonde.F1 x Hyg.Sonde.R1

Nourseothricin – *nat1*: Nours_F02 x Nours_R02

Geneticin (G418) – *nptII*: G418-Sonde.for x G418-Sonde.rev

II.5.3.2 Restriktion der genomischen DNA und Gelelektrophorese

Die genomische DNA wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut. Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte) bezogen. Es wurden jeweils 10 µg genomische DNA in einem 30-µl-Ansatz mit 3 µl Restriktionsenzym im Inkubator (Stuart SI500 Shaking Incubator, Keison, England) inkubiert. Dauer, Temperatur und Puffervolumen hängen dabei vom jeweiligen Enzym ab. Nach der Reaktion erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einem 0,8%igen TAE-Agarosegel (II.5.2) für 3,5 h bei 60 V. Die Restriktion der DNA konnte anschließend durch Ethidiumbromidfärbung unter UV-Licht visuell kontrolliert werden.

II.5.3.3 Kapillartransfer

Nach erfolgter Auftrennung der DNA-Restriktionsfragmente (II.5.3.2) wurde das Gel zunächst unter leichtem Schütteln 30 min in 0,25 M HCl und anschließend für 30 min in 0,4 M NaOH inkubiert. Die DNA wurde durch einen in der Regel über Nacht angelegten, abwärts gerichteten Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) übertragen. Der Aufbau des Transfers sah wie folgt aus (von unten nach oben): Auf einen 10 cm hohen Stapel Papiertücher wurden 3 Lagen Filterpapier (Whatmann 3MM, Göttingen) gelegt. Nun folgten die Nylonmembran, das Gel, welches mit der Öffnung der Ladetaschen nach oben luftblasenfrei

auf die Membran gelegt wurde, und weitere 3 Lagen Filterpapier. Die Größe der Membran und des Filterpapiers entsprachen der Größe des Gels. Den Abschluss bildete ein Streifen Filterpapier, welcher in Gelbreite zugeschnitten war und die Verbindung zum SSC-Pufferreservoir (**P10**) darstellte. Im Anschluss an den Transfer erfolgte die kovalente Verknüpfung der DNA an die Membran durch 2-stündiges Backen bei 80 °C im Hybridisierungsinkubator (Biozym, Hess. Oldendorf).

II.5.3.4 Hybridisierung und Nachweis der gebundenen Sonde

Zunächst wurde die Membran in Hybridisierungsröhrchen (Biozym, Hess. Oldendorf) überführt. Danach erfolgte eine Prähybridisierung der Membran für 30 min im Hybridisierungspuffer (**P15**) bei 65 °C im Hybridisierungsinkubator. Die Sonde wurde für 5 min bei 100 °C denaturiert, dann sofort für 90 s in eine Eis-Kochsalz-Lösung gestellt, um die Reassoziationsreaktion der beiden DNA-Stränge zu verhindern, und schließlich direkt in den Hybridisierungsansatz gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 65 °C über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran 2 x 5 min in 2x Waschpuffer (**P10**) bei Raumtemperatur und anschließend 1 x 15 min in 0,5x Waschpuffer (**P13**), 1 x 15 min in 0,25x Waschpuffer (**P14**) bei 65 °C und 1 x 1 min in Waschpuffer M (**P16**) bei Raumtemperatur gewaschen. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu unterdrücken, erfolgte ein Blocken der Membran mit Blocking-Puffer (**P17**) für 1 h bei RT. Anschließend erfolgte die Zugabe und Inkubation des Antikörpers (anti-DIG-AP-Fab-Fragment, Roche Diagnostics, Mannheim) zum Blocking-Puffer (**P17**) in einer Verdünnung von 1:10000 für mindestens 30 min. Abschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit Waschpuffer M (**P16**) behandelt, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Als Vorbereitung für die CSPD-Reaktion (Roche Diagnostics, Mannheim) wurde die Membran 2 min in Detektionspuffer (**P18**) geschwenkt und danach luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien (Folienhalbschlauch, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) verpackt, 1 ml CSPD-Lösung (ready-to-use) hinzugegeben, für 5 min dunkel bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend zusammen mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in eine Filmkassette gelegt. Die Belichtungsdauer richtete sich nach der Signalstärke. Der Film wurde in einem automatischen Filmentwicklungsgerät (Optimax TR, MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt.

II.5.4 PCR-Anwendungen

II.5.4.1 Standard-PCR

Sämtliche Reaktionen wurden in den Geräten Biometra TProfessional Thermocycler oder Biometra TPersonal Thermocycler (Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die verwendeten Enzyme und Enzypuffer wurden von den Firmen Thermo Fisher Scientific (Schwerte) oder New England Biolabs (Ipswich) bezogen. Ein 50- μ l-Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 3: PCR mit Taq-Polymerase und PCR-Bedingungen

Reagenz	Stammkonzentration	pipettiertes Volumen		T	Zeit	Zyklen
DreamTaq Puffer	10x	5 μ l	Vorheizen	96 °C	∞	-
Primer for	10 μ M	1 μ l	Initiale Denaturierung	96 °C	2 min	1
Primer rev	10 μ M	1 μ l	Denaturierung	96 °C	30 s	
dNTPs	10 mM	2 μ l	Annealing	$T_m + 2$ °C	30 s	30-40
DNA	1-50 ng	x μ l	Elongation	72 °C	1 min/kb	
DreamTaq-Polymerase	5 U/ml	0,2 μ l	Finale Elongation	72 °C	5 min	1
H ₂ O _{bidest}	-	ad 50 μ l				

In den Fällen, in denen DIG-markierte DNA-Fragmente für Southern-Hybridisierungen generiert wurden, wurde die Taq-Polymerase von New England Biolabs (Ipswich) verwendet. Im Allgemeinen erwiesen sich für die Mehrzahl der PCR-Anwendungen 30-40 Zyklen als ausreichend. Als Annealing-Temperatur (T_m) wurde die niedrigste Schmelztemperatur der eingesetzten Primer gewählt. Die Schmelztemperatur T_m der verwendeten Primer 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 Elongationsdauer richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments (~1 kb/min).

II.5.4.2 double-joint-PCR

Um in filamentösen Pilzen Genfunktionen zu studieren, wurde von Yu *et al.* (2004) eine PCR-basierte Methode entwickelt, mit welcher es möglich ist, Gendeletionen auch ohne aufwendige Klonierungsschritte durchzuführen. Die Technik der double-joint-PCR (DJ-PCR) diente der Erzeugung von Konstrukten für eine vollständige Deletion von Genen. Das DJ-Protokoll sieht drei Teilreaktionen vor. In der ersten Reaktion wurden jeweils einzeln die 5'- und 3'-flankierenden Bereiche des Zielgens mit genomischer DNA als

Template und ein Selektionsmarker (Hygromycin-, Nourseothricin oder Geneticin-Resistenzkassette) durch spezifische Primer amplifiziert (uni-hyg.F1 x uni-hyg.R1; uni-nours.F1 x uni.nours.R1; uni-G418.F1 x uni-G418.R1). Die Vektoren pAN7-1, pNR1 und pII99 dienen hierbei als Template, wobei 5 ng Plasmid eingesetzt wurden. Die zweite Reaktion diente dazu, die drei Produkte der ersten Reaktion zu fusionieren. Diese Reaktion kommt ohne die Zugabe von Primern aus, da die Flanken spezifische Überhänge besitzen, daher teilweise mit dem Resistenzgen überlappen und somit selbst als Primer fungieren. Im Gesamtansatz wurden je 50 ng der beiden Flanken und 100 ng des Resistenzgens verwendet. In der anschließenden dritten Reaktion wurde wiederum durch spezifische (nested-) Primer, die so konstruiert wurden, dass sie von den zuvor verwendeten „Außenprimern“ etwas nach innen versetzt liegen, die vollständige Deletionskassette amplifiziert. Das Protokoll von Yu und Mitarbeitern (Yu *et al.*, 2004) wurde modifiziert, indem die 2. und 3. Teilreaktion in einer einzelnen Reaktion durchgeführt wurde. Die Fragmente wurden dafür 10 Kopplungszyklen unterworfen. Durch die besagten spezifischen Überhänge fusionierten die Fragmente und nach Zugabe der nested-Primer konnte das Deletionskonstrukt amplifiziert werden. Allerdings traten bei der finalen Amplifikation störende Nebenprodukte auf, sodass eine Gelelution (II.5.1.3) nötig wurde.

Tab. 4: PCR zur Erzeugung der Flanken und PCR-Bedingungen

Reagenz	Stammkonzentration	pipettiertes Volumen		T	Zeit	Zyklen
HF Puffer	5x	10 µl	Vorheizen	98 °C	∞	-
dNTPs	10 mM	2 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Primer for	10 µM	1 µl	Denaturierung	98 °C	30 s	35
Primer rev	10 µM	1 µl	Annealing	60 °C	30 s	
genomische DNA	50 ng	1 µl	Elongation	72 °C	1 min	
Phusion-Polymerase	2 U/ml	0,5 µl	Finale Elongation	72 °C	5 min	1
H ₂ O _{bidest}	-	ad 50 µl				

Verwendete Primer für die genspezifischen Flanken:

CgHDA1: CgHDA1 5'fw x CgHDA1 5'rev; CgHDA1 3'fw x CgHDA1 3'rev

CgHDA3: CgHDA3 5'fw x CgHDA3 5'rev; CgHDA3 3'fw x CgHDA3 3'rev

CgHDA4: CgHDA4 5'fw x CgHDA4 5'rev; CgHDA4 3'fw x CgHDA4 3'rev

CgHAT1: CgHAT1 5'fw x CgHAT1 5'rev; CgHAT1 3'fw x CgHAT1 3'rev

CgKAT11: CgHKAT11 5'fw x CgKAT11 5'rev; CgKAT11 3'fw x CgKAT11 3'rev

CgELP3: CgELP3 5'fw x CgELP3 5'rev; CgELP3 3'fw x CgELP3 3'rev

Tab. 5: PCR zur Erzeugung der Deletionskassette und PCR-Bedingungen

Reagenz	Stamm-konzentration	pipettiertes Volumen		T	Zeit	Zyklen
HF Puffer	5x	10 µl	Vorheizen	98 °C	∞	-
dNTPs	10 mM	2 µl	Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	1
Phusion-Polymerase	2 U/ml	0,5 µl	Denaturierung	98 °C	30 s	
Resistenzgen	100 ng	x µl	Annealing	60 °C	30 s	10
5'-Flanke	50 ng	x µl	Elongation	72 °C	1 min	
3'-Flanke	50 ng	x µl	Pause	4 °C	∞	-
Primer 5' for nes	10 mM	2 µl	Denaturierung	98 °C	30 s	
Primer 3' rev nes	10 mM	2 µl	Annealing	59 °C	30 s	35
H ₂ O _{bidest}	-	ad 50 µl	Elongation	72 °C	2 min	
			Finale Elongation	72 °C	5 min	1

Verwendete Primer für die Fusion:

CgHDA1: CgHDA1 5'fw nes x CgHDA1 3'rev nes

CgHDA3: CgHDA3 5'fw nes x CgHDA3 3'rev nes

CgHDA4: CgHDA4 5'fw nes x CgHDA4 3'rev nes

CgHAT1: CgHAT1 5'fw nes x CgHAT1 5'rev nes

CgKAT11: CgKAT11 5'fw nes x CgKAT11 5'rev nes

CgELP3: CgELP3 5'fw nes x CgELP3 5'rev nes

II.5.4.3 Kolonie-PCR

Um Bakterien auf das Vorhandensein des transformierten Plasmids hin zu untersuchen, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt. Als Primer wurden die genspezifischen Sondenprimer eingesetzt (II.5.3.1).

Tab. 6: Kolonie-PCR zur Selektion positiver Plasmide

Reagenz	Stamm-konzentration	pipettiertes Volumen		T	Zeit	Zyklen
DreamTaq Puffer	10x	2,5 µl	Vorheizen	95 °C	∞	-
Primer for	10 µM	0,5 µl	Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	1
Primer rev	10 µM	0,5 µl	Denaturierung	95 °C	30 s	
dNTPs	10 mM	1 µl	Annealing	T _m + 2 °C	30 s	35
DreamTaq-Polymerase	5 U/ml	0,2 µl	Elongation	72 °C	1 min/kb	
Bakterienkolonie	-	-	Finale Elongation	72 °C	3 min	1
H ₂ O _{bidest}	-	ad 25 µl				

Nach PCR wurden die Produkte in einem 1%igem TAE-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt (II.5.2), um sicherzustellen, dass die erwarteten Fragmente die korrekte Größe aufwiesen.

II.5.4.4 RT-qPCR

Die relative Quantifizierung von Transkriptmengen erfolgte mittels RT-qPCR. Als Template wurde Gesamt-RNA von infizierten Maisblättern oder von *in vitro*-Kulturen eingesetzt, welche wie unter II.5.1.4 beschrieben präpariert wurde. RT-qPCRs erfolgten mit dem MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) und der Software iQ5-Standardsoftware (Version 2.0.148.60623). Für RT-qPCRs wurde der Power SYBR[®] Green RNA-to-CT[™] Kit (Applied Biosystems GmbH; Darmstadt, Deutschland) nach Herstellerangaben eingesetzt. Das Reaktionsvolumen umfasste 20 μ l.

Tab. 7: RT-qPCR

Reagenz	Stammkonzentration	pipettiertes Volumen		T	Zeit	Zyklen
Power SYBR [®] Green RT-PCR Mix	2x	10 μ l	Reverse Transkription	48 °C	30 min	1
Primer for	10 μ M	0,5 μ l	Activation of AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	95 °C	10 min	1
Primer rev	10 μ M	0,5 μ l	Denaturierung	95 °C	15 s	
RT Enzyme Mix	125x	0,16	Annealing/Elongation	60 °C	1 min	40
RNA	25 ng	2 μ l				
H ₂ O _{bidest}	-	ad 20 μ l				

Nach erfolgter RT-qPCR wurden die PCR-Produkte in einem 1,5%igem Natriumboratgel gelelektrophoretisch aufgetrennt (II.5.2), um sicherzustellen, dass die erwarteten Fragmente die korrekte Größe aufwiesen (*CgHDA1* mit *CgHDA1_qRT.F1* x *CgHDA1_qRT.R1*: 264 bp; *CgRho3* mit *CgRho3_qRT.F1* x *CgRho3_qRT.R1*: 150 bp; *CgGLS1* mit *CgGLS1_qRT.F1* x *CgGLS1_qRT.R1*: 169 bp; *CgChsV* mit *CgChsV_qRT.F1* x *CgChsV_qRT.R1*: 161 bp; *CgSpa2* mit *CgSpa2_qRT.F1* x *CgSpa2_qRT.R1*: 150 bp; *CgCot-1* mit *CgCot-1_qRT.F1* x *CgCot-1_qRT.R1*: 156 bp; *CgPKS1* mit *GLRG_04203 for* x *GLRG_04203 rev*: 202 bp).

Die Bestimmung der relativen Transkriptmenge erfolgte mittels Normalisierung zu den Referenzgenen *CgHiston H3* (*CgH3_qRT.F1* x *CgH3_qRT.R1*) und *CgACT* (*CgACT_qRT.F1* x *CgACT_qRT.R1*) (Krijger *et al.*, 2008) nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001).

II.5.4.5 qPCR

Die Bestimmung pilzlicher Biomasse in infiziertem Blattgewebe erfolgte mittels qPCR und dem Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems GmbH; Darmstadt,

Deutschland) nach Weihmann und Mitarbeitern (Weihmann *et al.*, 2016). qPCRs erfolgten mit dem MyiQ-Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

II.5.5 Sequenzierung und Sequenzauswertung

II.5.5.1 Sequenzierreaktion und Probenvorbereitung

Die verwendete Sequenziertechnik beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide ermöglichen die Detektion der PCR-Fragmente, wobei die vier im Reaktionsmix (Applied Biosystems, Weiterstadt) vorhandenen ddNTPs durch eine Markierung mit unterschiedlichen Chromophoren identifiziert werden. Template für die Sequenzierreaktionen war Plasmid-DNA. Ein 10- μ l-Sequenzieransatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 8: Sequenzier-PCR und PCR-Bedingungen

Reagenz	Stammkonzentration	pipettiertes Volumen		T	Zeit	Zyklen
Ready Reaction Mix	-	2 μ l	Vorheizen	96 °C	∞	-
Sequencing Buffer	5x	1 μ l	Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	1
Primer	10 μ M	1 μ l	Denaturierung	96 °C	10 s	
DNA	50-500 ng	x μ l	Annealing	55 °C	10 s	30
H ₂ O _{bidest}	-	ad 10 μ l	Finale Elongation	60 °C	4 min	

Auf den Reaktionsansatz wurden anschließend 10 μ l H₂O_{dest} gegeben und durch Zugabe von 2 μ l 3 M Natriumacetat und 50 μ l 100 % Ethanol wurde die enzymatische Reaktion terminiert und markierte DNA-Fragmente gefällt. Der gesamte Ansatz wurde zunächst 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend 20 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert, mit 60 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 14000 rpm und 4 °C) unter der Sterilbank getrocknet. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

II.5.5.2 Sequenzierung und Analyse der Daten

Sequenzanalysen wurden mit dem ABI Prism 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Handhabung des Geräts erfolgte nach Herstellerangaben. Sequenzauswertung und manuelle Korrektur der Sequenzdaten wurden mit den Programmen Clone Manager Version 9.0 (Scientific & Educational Software, North Carolina,

United States), BioEdit Version 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>; Stand 07.10.2016) und Chromas Lite Version 2.1 (Technelysium, Australien) durchgeführt.

II.5.6 Klonierung

Alle verwendeten Enzyme und Puffer stammen, soweit nicht anders vermerkt, von der Firma Thermo Fisher Scientific (Schwerte).

II.5.6.1 Generierung von DNA-Fragmenten

Sämtliche klonierte DNA-Fragmente wurden mittels PCR bzw. durch Restriktion vorhandener Vektoren generiert. Nach Auftrennung der PCR-Produkte im Agarosegel (II.5.2), Ethidiumbromid-Färbung und Kontrolle unter UV-Licht wurden einzelne Banden mit Hilfe eines Skalpellens ausgeschnitten. Die anschließende Gelelution der DNA erfolgte entsprechend den Herstellerangaben mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) (siehe II.5.1.3).

II.5.6.2 Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert und in Volumina von 10-30 µl unter Zugabe des entsprechenden Volumens 10x Puffer bei enzymespezifischen Temperaturen inkubiert (Heizblock Rotilabo®-Block-Heater H 250, Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Die Menge an Restriktionsendonuklease richtete sich nach der eingesetzten DNA-Menge. Falls erforderlich, erfolgte im Anschluss eine Hitzeinaktivierung der Enzyme nach Herstellerangaben.

II.5.6.3 Ligation und Dephosphorylierung

Die von DNA-Polymerasen mit Proofreading-Funktion (Phusion DNA Polymerase; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) erzeugten PCR-Fragmente wurden mit den Reagenzien des CloneJET PCR Cloning Kit in den pJET1.2/blunt Cloning Vektor (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) ligiert.

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit komplementären Überhängen, welche durch vorherige Inkubation mit Restriktionsendonukleasen entstanden, erfolgte in 10-µl Reaktionsansätzen, bestehend aus 1 µl 10x Ligationspuffer, 0,5 µl T4 DNA-Ligase (1 Weiss Unit/µl) sowie Plasmid- und Insert-DNA im stöchiometrischen Verhältnis 1:5.

Um eine Religation komplementärer Vektorenden zu verhindern, wurden diese durch Zugabe von 0,5 U FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase/10- μ l-Restriktionsansatz und Inkubation für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert. Restriktionsenzym und FastAP™ wurden anschließend zusammen für 20 min bei 80 °C inaktiviert.

II.5.7 Transformationstechniken

II.5.7.1 Transformation von *E. coli*

II.5.7.1.1 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen orientierte sich an der TSS-Methode (transformation and storage in the same solution) nach Chung und Mitarbeitern (Chung *et al.*, 1989). Dabei wurde eine 20-ml-Vorkultur der entsprechenden Zellen in LB-Medium (**M1**) angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA) inkubiert. 2,5 ml der Übernachtskultur wurden in 250 ml LB-Medium überführt und bis zu einer $OD_{600nm} = 0,3-0,5$ angezogen. Anschließend erfolgte eine Überführung von 100 ml Zellen in sterile Zentrifugenbecher und eine 10-minütige Zentrifugation (Eppendorf Centrifuge 5403, Festwinkel-Rotor 16F24-11, Hamburg) mit vorgekühltem Rotor bei 650 x g. Von den sedimentierten Zellen wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in 10 ml eiskalter TSS-Lösung (**L5**) aufgenommen. Davon wurden jeweils 100- μ l-Aliquots in Eppendorf-Reaktionsgefäße portioniert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgt bei -70 °C.

II.5.7.1.2 Transformation und Selektion

Für die Transformation wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, der gesamte Ligationsansatz direkt zu den Zellen gegeben, wobei die Suspension vorsichtig gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert wurde. Als Positivkontrolle wurden Zellen mitgeführt, welche mit pUC18 (1 ng/ μ l) transformiert wurden. Nach einem 30-sekündigen Hitzeschock im vorgewärmten Heizblock bei 42 °C erfolgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis und anschließend die sofortige Zugabe von 900 μ l LB-Medium (**M1**) mit einer darauffolgenden Regenerationszeit von 45 min im Inkubationsschüttler bei 37 °C

und 200 rpm. Die transformierten Zellen wurden dann in 200- μ l-Aliquots auf LB_{amp}-Platten (**M2**) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert (Stuart SI500 Shaking Incubator, Keison, England).

II.5.7.2 Transformation von *C. graminicola*

Das Verfahren zur Transformation richtete sich nach Werner (Werner *et al.*, 2007), welches sich weitestgehend am Protokoll von Epstein (Epstein *et al.*, 1998) orientierte.

II.5.7.2.1 Protoplastengewinnung

Für die Anzucht der Vorkultur wurden Konidien einer 14 Tage alten CgM2-Kultur mit 500 μ l H₂O_{bidest} unter sterilen Bedingungen von OMA-Platten (**M3**) abgespült und in Erlenmeyerkolben mit 200 ml Sporulationsmedium (**M8**), einen Tag bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler (40 rpm) (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach) und weitere fünf Tage ohne Schütteln inkubiert. Die Protoplastierung der Konidien erfolgte durch Zugabe von 20 ml einer 0,7 M NaCl-Lösung (autoklaviert) mit 200 mg/ml *Trichoderma harzianum* Lysing Enzymes (Sigma-Aldrich, München), 100 mg Driselase von Basidiomycetes sp. (Sigma-Aldrich, München) sowie 2 mg Chitinase von *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich, München) bei einer 3-stündigen Inkubation bei 30 °C und 80 rpm im Inkubationsschüttler Classic C25 (New Brunswick Scientific, New Jersey, USA). Sedimentiert wurden die protoplastierten Konidien durch Zentrifugation für 10 min bei 2000 x g und 4 °C in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Rotor RTH-250; Zentrifuge Sorvall RT 7 PLUS; Sorvall Deutschland, Bad Homburg). Die Protoplasten wurden anschließend in 30 ml STC-Puffer (**P19**) gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in 1 ml STC-Puffer aufgenommen.

II.5.7.2.2 Transformation und Selektion

Zu je 100 μ l Protoplastenlösung wurde in sterilen 15-ml-Greiner Röhrchen 3-5 μ g des zu transformierenden DNA-Konstrukts gegeben. Parallel wurde ein Kontrollansatz ohne DNA mitgeführt. Sämtliche Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgten die Zugabe von 1 ml PEG-Puffer (**P20**) und eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zu jedem Aliquot wurden anschließend 5 ml flüssiges, 45 °C warmes Regenerationsmedium (**M9**) gegeben. Der gesamte Ansatz wurde dann zum Übersichten von Petrischalen mit Selektionsmedium (**M10**) verwendet. Die Inkubation der Petrischalen erfolgte bis zum Erscheinen sichtbarer Kolonien bei Raumtemperatur.

II.5.7.2.3 Gewinnung von Einzelsporisolen

Hygromycin-, nourseothricin- bzw. geneticinresistente Kolonien wurden zur Gewinnung von Konidien zunächst auf Petrischalen mit OMA-Medium (**M3**) übertragen. Nach etwa 10-14 Tagen wurden die Konidien der Transformanten mit 30 µl sterilem H₂O_{bidest} abgespült und auf PDA (**M5**) mit 100 µg/ml des selektiven Agens ausplattiert. Einzelne Kolonien wurden isoliert und wiederum auf OMA-Medium (**M3**) übertragen.

II.5.8 Deletionsstrategie und Komplementation

Die Herstellung spezifischer KO-Konstrukte für die vollständige Deletion der Zielgene erfolgte mittels DJ-PCR (s. II.5.4.2). Zunächst wurden in separaten PCR-Ansätzen jeweils ca. 1 kb 5'- und 3'-flankierende Bereiche des jeweiligen ORFs von genomischer DNA und eine Resistenzkassette von einem Vektor amplifiziert. Im Fall der Hygromycin-B-Resistenzkassette erfolgte die Amplifikation vom Vektor pAN7-1 (*gpdA*-Promotor und *hph*), der Nourseothricin-Resistenzkassette vom Vektor pNR1 (*oliC*-Promotor und *nat1*) bzw. der Geneticin-Resistenzkassette vom Vektor pII99 (*trpC*-Promotor und *nptII*). Komplementäre Überhänge der PCR-Produkte ermöglichten in einer zweiten PCR die Fusion der einzelnen Fragmente zum kompletten KO-Fragment, das anschließend zur Transformation pilzlicher Protoplasten verwendet wurde.

Die Generierung des Komplementationskonstrukts für $\Delta hda2$ erfolgte mittels PCR. Das Konstrukt bestand aus 1 kb der *CgHDA2*-Promotorregion, gefolgt vom *CgHDA2*-ORF, der Nourseothricin-Resistenzkassette (*oliC*-Promoter, *nat1*-Gen, *trpC*-Terminator) und der 3'-Flanke (Terminator) von *CgHDA2*. In einer ersten PCR wurde mit den Primern *CgHDA2* 5'fw x *CgHDA2*-PoliC rev von gDNA ein 2498 bp-langes Fragment amplifiziert, das die 5'-Flanke von *CgHDA2* und die kodierende Region von *CgHDA2* enthielt. In einer zweiten PCR wurde mit den Primern *CgHDA2*-PoliC fw x *CgHDA2* 3'rev vom *CgHDA2:eGFP*-Vektor ein 3177 bp langes Fragment amplifiziert. Bei diesem Fragment handelte es sich bereits um eine Fusion aus Nourseothricin-Resistenzkassette und 3'-Flanke von *CgHDA2*. Die Fragmente wurden anschließend mit den Primern *CgHDA2* 5'fw nes x *CgHDA2* 3'rev nes in einer PCR miteinander fusioniert. Das so generierte 5586 bp lange Komplementationskonstrukt wurde anschließend in $\Delta hda2$ -Protoplasten transformiert. Der Nachweis der korrekten Integration des Konstrukts erfolgte durch Southern-Analyse (II.5.3). Dazu wurde die DNA einzelner Transformanten mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease fragmentiert, gelelektrophoretisch

aufgetrennt, auf einer PVDF-Membran fixiert und mit einer spezifischen Sonde hybridisiert.

II.5.9 Generierung von RNAi-Stämmen

Die Basis für die Generierung eines *CgHDA1* siRNA-Expressionskonstrukts bildete der pREDi-Vektor (Janus *et al.*, 2007). Dieser basiert auf einem *trpC*-Promotor, der die Expression eines *DsRed* siRNA-hairpins kontrolliert, die durch den *trpC*-Terminator terminiert wird. Die Expression des siRNA-hairpins gewährleistet die Hybridisierung zu einer Doppelstrang-siRNA (ds siRNA) in der Zelle, was für die Bildung des RISC notwendig ist. Auf diesem Vektor basierend wurde RNAi in *C. graminicola* zur Herabregulierung von *GLS1*- und *KRE5*- bzw. *KRE6*-Transkripten bereits erfolgreich angewendet (Oliveira-Garcia und Deising, 2013; Oliveira-Garcia und Deising, 2016).

Mit Hilfe des Tools EMBOSS 6.3.1: sirna (Rice *et al.*, 2000) (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::sirna>; Stand: 07.10.2016) wurde in der Nukleotidsequenz (mRNA) von *CgHDA1* eine mögliche RNAi-Zielsequenz ausgewählt. Die dabei erhaltenen Werte spiegeln die Wahrscheinlichkeit eines effizienten Silencings in der Höhe des ‚Scores‘ wider. Hierbei ist anzumerken, dass der Algorithmus für humane und Mausequenzen generiert wurde und bislang keine Vorhersageprogramme für pilzliche Sequenzen zur Verfügung stehen. Die durch die Vorhersage erhaltene Zielsequenz wurde anschließend einer BLAST-Suche unterzogen, um sicher zu gehen, dass diese Sequenz in *C. graminicola* einzigartig ist. Dadurch sollten off-target-Effekte ausgeschlossen werden, wobei es neben dem gewünschten Abbau der komplementären Ziel-RNA außerdem zu einem unerwünschten Abbau weiterer, komplementärer RNA-Moleküle käme. Das 553 bp lange sense- bzw. antisense-Fragment entstammt dem intronlosen 3'-Bereich des Gens und wurde mit den Primern *CgHDA1s*-XhoI.F x *CgHDA1s*-HindIII.R bzw. *CgHDA1i*-StuI.F x *CgHDA1i*-ApaI.R von genomischer DNA amplifiziert. Anschließend erfolgte die Klonierung beider Fragmente in die *XhoI/HindIII* bzw. *StuI/ApaI* Restriktionsschnittstelle von pREDi. Dadurch wurden die in pREDi vorhandenen *DsRed*-Fragmente durch Fragmente des Zielgens ersetzt. Die Inserts des finalen *HDA1* RNAi-Vektors wurden anschließend durch Sequenzierung verifiziert (II.5.5). Der siRNA-Expressionsvektor trägt das *nat1*-Gen, welches unter Kontrolle des *gpd*-Promotors gestellt ist und eine Selektion mittels Nourseothricin möglich macht.

II.6. *eGFP*-Fusion

II.6.1 *CgHDA1:eGFP*

Mit den Primern 5'-Flanke CgHDA1 fw x CgHDA1 rev ApaI_Eco81I wurde ein 3042 bp langes Fragment, bestehend aus 799 bp 5'-Flanke und 2227 bp *CgHDA1*-ORF (ohne Stopcodon), amplifiziert und in pJET1.2/blunt ligiert. Der resultierende Vektor wurde mit *ApaI* und *Eco81I* hydrolysiert und ebenso das mit den Primern GFP fw ApaI x G418 rev PsiI_Eco81I amplifizierte 3720 bp lange Fragment, bestehend aus *eGFP* und der Geneticon-Resistenzkassette (*trpC*-Promotor und *nptII*). Anschließend erfolgte die Ligation beider Fragmente. Der aus dieser Ligation resultierende Vektor wurde mit *PsiI* und *Eco81I* restringiert und die mit den Primern 3' Fl. CgHDA1 fw PsiI x 3' Fl. CgHDA1 rev Eco81I amplifizierte und mit *PsiI* und *Eco81I* hydrolysierte 3'-Flanke von *CgHDA1* in den Vektor ligiert und somit der *CgHDA1:eGFP*-Vektor erhalten. Das vollständige ca. 7,7 kb große Fusionskonstrukt wurde in einer Standard-PCR (Primer: CgHDA1 5' fw x 3' Fl. CgHDA1 rev Eco81I) vom finalen *CgHDA1:eGFP*-Vektor amplifiziert und für die Transformation von CgM2-Protoplasten verwendet.

II.6.2 *CgHDA3:eGFP*

Um die Größe des finalen Konstrukts zu beschränken, wurden 1000 bp aus dem 3'-Bereich des *CgHDA3*-ORFs als rekombinierender Bereich ausgewählt. Dieser wurde mit den Primern HDA3eGFP5'F-F1 x HDA3eGFP5'F-R1 amplifiziert.

Die Arbeitsgruppe von G. Reuter (Entwicklungsgenetik, MLU Halle-Wittenberg) stellte ein Plasmid zur Verfügung (pJET.HP1:eGFP), welches eine *eGFP:G418*-Fusion (*G418* = *trpC*-Promotor und *nptII*) enthielt, welche mit den Primern EGFP.F1 x uni-G418.R1 amplifiziert wurde. Der 3'-Bereich des *CgHDA3*-Gens (Terminator) stand bereits als PCR-Produkt von der generierten Deletionskassette zur Verfügung (siehe II.5.4.2). Die Produkte wurden anschließend mittels DJ-PCR (II.5.4.2) und den Primern HDA3eGFP5'F-F1nes x CgHDA3 3'rev nes fusioniert. Das mittels nested-Primer amplifizierte *eGFP*-Konstrukt wurde anschließend für die Transformation von CgM2-Protoplasten verwendet.

II.6.3 *CgHDA4:eGFP*

Um die Größe des finalen Konstrukts zu beschränken, wurden 1000 bp aus dem 3'-Bereich des *CgHDA4*-ORFs als rekombinierender Bereich ausgewählt. Dieser wurde mit den Primern HDA4eGFP5'F-F1 x HDA4eGFP5'F-R1 amplifiziert. *eGFP* sowie der Selektionsmarker wurden wie unter II.6.2 beschrieben amplifiziert. Der 3'-Bereich des *CgHDA4*-Gens (Terminator) stand bereits als PCR-Produkt von der generierten Deletionskassette zur Verfügung. Die Produkte wurden anschließend mittels DJ-PCR (II.5.4.2) und den Primern HDA4eGFP5'F-F1nes x *CgHDA4* 3'rev nes fusioniert. Das mittels nested-Primer amplifizierte *eGFP*-Konstrukt wurde anschließend für die Transformation von CgM2-Protoplasten verwendet.

II.7. Metabolitanalytik

II.7.1 Kultivierung von *C. graminicola*

1-Liter-Schikanekolben mit 500 ml HMG-Medium (**M7**) wurden mit dem gewünschten Isolat angeimpft. Die Kultivierung erfolgt im Schüttelinkubator Multitron II (INFORS AG, Bottmingen/Basel, Schweiz) bei konstant 23 °C und 130 rpm. Zur Bestimmung des Glucosegehaltes (Diabur-Test5000; Roche Diagnostics, Mannheim) wurde ein Aliquot steril entnommen und die Kultivierung beendet, sobald keine Glucose im Kulturmedium mehr nachweisbar war.

II.7.2 Herstellung von Extrakten aus Kulturüberständen

Die Extraktion der Kulturüberstände erfolgte nach Horbach und Mitarbeitern (Horbach *et al.*, 2009). Der flüssige Kulturüberstand und das Pilzmyzel wurden durch Filtration im Büchnertrichter mit eingelegtem Rotilabo[®]-Rundfilter (Membran 90 mm, Cellulose, Typ 601A, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) separiert. Das erhaltene Kulturfiltrat wurde anschließend in einen Scheidetrichter überführt, mit dem gleichen Volumen Ethylacetat versetzt und ca. drei Minuten kräftig ausgeschüttelt. Nach der Ausbildung zweier Phasen wurde die untere Phase abgelassen, die obere Phase durch Natrimsulfat gefiltert und in einem Rundkolben aufgefangen. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuumrotationsverdampfer (Rotavapor RE-111, Büchi, Essen) entfernt. Nach der Bestimmung des Rückstandsgewichts erfolgte die Lagerung des Extrakts bei -20 °C.

II.7.3 Analytische HPLC

Analytische HPLC-Untersuchungen wurden zur qualitativen Kontrolle isolierter Substanzen durchgeführt. Das folgende analytische HPLC-System wurde verwendet:

HP 1100 Series U (Hewlett-Packard, Waldbronn)

- stationäre Phase: LiChrospher (RP 18, 125 x 4 mm, 5 µm; Merck, Darmstadt)
- Gradient: 0 %-100 % Acetonitril (AcN:H₂O), Fluss: 2 ml/min, 25 min
- Temperatur: 40 °C
- Detektion: 210-300 nm.

Injiziert wurden 25 µl Probenvolumen, wobei komplexe Stoffgemische in einer Konzentration von 5 mg Extrakt/ml und Reinsubstanzen in einer Konzentration von 0,1 mg/ml eingesetzt wurden.

II.7.4 Identifizierung von Metaboliten

Die Identifizierung von Substanzen aus komplexen Stoffgemischen erfolgte mittels analytischer HPLC (II.7.3) anhand der Parameter HPLC-Retentionszeit und UV-Absorption durch einen Abgleich mit den Daten bekannter Substanzen aus der Reinsubstanzbibliothek des IBWF.

II.8 RNA-Seq-Analysen

II.8.1 *in vivo*-RNA-Seq-Analysen

Um Transkriptabundanzen von Genen während der Mais-Infektion von *C. graminicola* zu ermitteln, wurden Ganzpflanzentests durchgeführt. Die Anzucht der Pflanzen (*Zea mays* cv. Golden Jubilee), die Durchführung der Ganzpflanzentests und die RNA-Extraktion erfolgten wie unter II.1.3, II.3.1.2 und II.5.1.4 beschrieben. Die Probenentnahme erfolgte mit einem Korkbohrer (ø 8 mm) in drei biologischen Wiederholungen nach 0, 12, 24, 48, 72 und 120 dpi. Die RNA wurde mittels Illumina HiSeq^{TN}2000 durch ServiceXS (Leiden, Niederlande) sequenziert. Illumina-Sequenzierung, RNA-Prozessierung und Mapping wurden durchgeführt wie von Schliebner und Mitarbeitern beschrieben (Schliebner *et al.*, 2014). Die RNA-Seq-Auswertung wurde von Dr. Ivo Schliebner durchgeführt.

II.8.2 *in vitro*-RNA-Seq-Analysen

Mittels RNA-Seq wurden die Transkriptome mehrerer Histondeacetylase-Mutanten mit dem Wildtyp verglichen. Als Ausgangsmaterial dienten vegetative Hyphen aus Flüssigkulturen (M7). Die RNA-Extraktion erfolgte wie unter II.5.1.4 beschrieben. Die weitere Aufreinigung der RNA und das RNA-Seq Protokoll ohne vorherige Poly(A)-Selektion erfolgten in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Knut Krohn (Universität Leipzig, Medizinische Fakultät, Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Core Unit DNA-Technologien). Von je drei Replikaten pro Genotyp wurde eine Bibliothek angefertigt, anschließend wurden diese gepoolt, um Datenverlust zu vermeiden.

Die sequenzierten Readbibliotheken der RNA-Seq wurden mit dem Adapter AGATCGGAAGAGCACACGTCTGAACTCCAGTCAC-Index-ATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTG am 3'-Ende der Sequenz geclippt und gegen das annotierte Referenzgenom des *C. graminicola* Stammes M2 gemappt. Anschließend wurde die Anzahl der gemappten Reads aller Exons pro Gen extrahiert und als Readcount pro Gen für die Expressionsanalyse genutzt. Clipping und Mapping erfolgten mit der CLC Genomics Workbench (CLC Genomics Workbench 7.0.3 2014). Die Expressionsanalyse der Daten erfolgte mittels dem Programm R (R Core Team, <http://www.r-project.org/>; Stand: 05.10.2016) unter Nutzung des Paketes EdgeR (Robinson und Smyth, 2007; Robinson und Smyth, 2008; Robinson *et al.*, 2010; McCarthy *et al.*, 2012). Dabei wurden die Expressionsdaten mittels trimmed mean of M-Values (Robinson und Oshlack, 2010) normiert, die common dispersion mithilfe der biologischen Replikate bestimmt und anschließend durch den exactTest (Robinson und Smyth, 2007) entschieden, ob ein Gen differential exprimiert ist. Die Kategorisierung in Sekundärmetabolit-Cluster, sekretierte Proteasen, Transporter, Transkriptionsfaktoren, Effektoren, Cytochrom-P450-Enzyme oder der Carbohydrate Active Enzymes (CAZ) erfolgte nach O'Connell und Mitarbeiter (O'Connell *et al.*, 2012). Gene, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, fielen in die Kategorie „ohne funktionelle Gruppe“; ferner wurden auch hypothetische Proteine angegeben. Die bioinformatische Analyse wurde von Diplom-Bioinformatiker Gunnar Hönig ausgeführt.

II.9 Dokumentation

II.9.1 Mikroskopie

II.9.1.1 Färbetechnik

Um den Infektionsverlauf von *C. graminicola* in infizierten Maisblättern zu verfolgen, erfolgte eine Färbung des Blattgewebes, wodurch eine histologische Untersuchung möglich wurde. Die Maisblattsegmente wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und in 1 ml Entfärbelösung (L7) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der vollständigen Entfärbung der Blätter wurde die Lösung entfernt und die Proben mit 1 ml einer 0,025%igen Anilinblaulösung (L8) versetzt. Die Färbung erfolgte für ca. 2-3 h bei Raumtemperatur. Die gefärbten Blätter wurden kurz in Wasser geschwenkt und anschließend mikroskopiert. Anilinblau färbt spezifisch Pilzhyphen, da diese aus Kallose, einem β -1,3-Glucan, bestehen.

Für Kern- bzw. DNA-Färbungen wurde die Probe auf einen Objektträger gegeben, 10 μ l DAPI-Lösung (L9) zugesetzt, anschließend mit einem Deckglas abgedeckt und mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe II.9.1.3).

Das Anfärben der Zellwände von vegetativen Hyphen erfolgte mit Calcofluor White Stain (Calcofluor White M2R, 1 g/l und Evans blue, 0,5 g/l; Sigma-Aldrich, München). Die Probe wurde auf einen Objektträger gegeben, mit einem Tropfen Calcofluor White Stain versetzt, gefolgt von einem Tropfen einer 10%igen Kaliumhydroxid-Lösung. Die Probe wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt, für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie und einem UV-2A-Filter analysiert (II.9.1.3).

II.9.1.2 Lichtmikroskopie

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit einem Eclipse E600-Forschungsmikroskop oder einem Stereomikroskop SMZ800 (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Die Ausstattung des optischen Systems erlaubte Beobachtungen im Hellfeld und DIC-Modus. Bilder von Untersuchungsobjekten wurden mit Hilfe einer digitalen Mikroskopkamera (Digital Sight DS-SM; Nikon, Düsseldorf) und mit Hilfe des Programms NIS-Elements D Version 3.22.11 (Nikon, Düsseldorf) aufgezeichnet. Die Programmfunktionen erlaubten zudem das Vermessen von Strukturen (Konidien, Zellen und Keimschläuche).

II.9.1.3 Fluoreszenzmikroskopie

Mit Fluoreszenzfarbstoffen gefärbte Objekte bzw. GFP-markierte Pilzisolat wurden mit den Forschungsmikroskopen Eclipse E600 bzw. Eclipse 90i Confocal Laser Scanning-Mikroskop (Nikon, Düsseldorf) untersucht. Anregungswellenlänge und Detektionsbereich wurden entsprechend den Spezifikationen der verwendeten Fluorophore gewählt. Je nach Anwendung und Experiment kamen Filter der Firma Nikon zum Einsatz, wie 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 der Untersuchungsobjekte wurden u.a. während des Scan-Prozesses generiert und zusätzlich mit Hilfe einer Mikroskopkamera (Digital Sight DS-SM; Nikon, Düsseldorf) im Durchlichtmodus aufgezeichnet.

II.9.2 Photographie und Bildbearbeitung

Bilder zur Dokumentation infizierter Blätter oder Pilzkulturen von Wachstumsversuchen wurden mit einer Sony Cybershot DSC-HX100V aufgenommen. Die Bearbeitung digitaler Bilder erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop Version 7.0 (Adobe Systems, San Jose, USA).

II.10 Bioinformatische Analyse

II.10.1 Datenbankrecherche

Homologievergleiche wie BLAST Search (Altschul *et al.*, 1997) und Datenbankrecherchen erfolgten über die Internetseiten des NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Stand: 07.10.2016). Putative Proteindomänen wurden mit dem Tool Conserved Domains der NCBI-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>; Stand: 07.10.2016) bzw. über den UniProt-Server (<http://www.uniprot.org/>; Stand: 07.10.2016) analysiert. Der ExPASy Proteomics Server des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>; Stand: 07.10.2016) stellt verschiedene Tools zur Verfügung, mit denen ebenfalls Domänen erkannt (ScanProsite) oder Eigenschaften von Proteinen (ProtParam) ermittelt werden können. Kernexportsignale (NES) wurden mit dem NetNES 1.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNES/>; Stand: 07.10.2016) (la Cour *et al.*, 2004) und Kernlokalisierungssignale (NLS) wurden mit SeqNLS (<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>; Stand: 07.10.2016) (Lin und Hu, 2013) identifiziert.

II.10.2 Phylogenetische Analyse

Phylogenetische Stammbäume wurden mit der MEGA6.06-Software generiert (Tamura *et al.*, 2013). Die Alignments dafür wurden mit MEGA6.06 nach der ClustalW-Methode (Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007) durchgeführt. Für die Stammbaumerstellung wurden folgende Parameter festgelegt:

Analysis

Analysis	Phylogeny Reconstruction
Scope	All Selected Taxa
Statistical Method	Neighbor-joining

Phylogeny Test

Test of Phylogeny	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications	1000

Substitution Model

Substitutions Type	Amino acid
Model/Method	p-distance

Rates and Patterns

Rates among Sites	Uniform rates
Pattern among Lineages	Same (Homogeneous)

Data Subset to Use

Gaps/Missing Data Treatment	Complete deletion
-----------------------------	-------------------

Die evolutionären Distanzen wurden mit der p-distance-Methode berechnet (Nei und Kumar, 2000).

II.11 Statistik

Statistische Analysen (T-Test, Rank Sum Test) wurden mit dem Programm Sigma Plot Version 11 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) und mit dem Statistiktool GraphPad (<http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>; Stand: 07.10.2016) durchgeführt. Statistische Unterschiede zwischen Gruppen wurden mittels Einweg-ANOVA analysiert, welcher ein Holm-Sidak-Test folgte.

II.12 NCBI-Zugangsnummern

Phylogenie:

C. graminicola (Cg), *Colletotrichum higginsianum* (Ch), *Botrytis cinerea* (Bc), *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bg), *Cochliobolus carbonum* (Cc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Fusarium fujikuroi* (Ff), *Mycosphaerella graminicola* (Mg), *Magnaporthe oryzae* (Mo), *Neurospora crassa* (Nc) und *Saccharomyces cerevisiae* (Sc)

BcHDA1 (XP_001549548), BcHOS2 (XP_001550994), BcHOS3 (XP_001557854), BcRPD3 (XP_001560049), BgHDA1 (CCU80714), BgHOS2 (CCU79009), BgHOS3 (CCU74646), BgRPD3 (CCU82780), CcHDC1 (AF306507), CcHDC2 (AAK35180), CcHDC3 (AF307341), CcHDC4 (AF537126), CgHDA1 (GLRG_00900), CgHDA2 (GLRG_04401), CgHDA3 (GLRG_08073), CgHDA4 (GLRG_05856), ChHDA1 (CH063_02156), ChHDA2 (CH063_04264), ChHDA3 (CH063_00172), ChHDA4 (CH063_01264), FgRPD3 (FGSG_00780), FgHDF1 (FGSG_01353), FgHDF2 (FGSG_04324), FgHDF3 (FGSG_05636), FfHDA1 (FFUJ_09787), FfHDA2 (FFUJ_01551), FfHDA3 (FFUJ_00456), FfHDA4 (FFUJ_08772), MgHDA1 (XP_003855078), MgHOS2 (XP_003855845), MgHOS3 (XP_003852175), MgRPD3 (XP_003857811), MoHDA1 (MGG_01076), MoHOS2 (MGG_01633), MoHOS3 (MGG_06043), MoRPD3 (MGG_05857), NcHDA-1 (XP_956974), NcHDA-2 (XP_964451), NcHDA-3 (XP_964367), NcHDA-4 (XP_961839), ScHDA1 (NP_014377), ScHOS2 (NP_011321), ScHOS3 (NP_015209), ScRPD3 (NP_014069), ScHOS1 (KZV07583)

RT-qPCR:

ChsV: AY064208, *Rho3*: GLRG_07559, *Cot-1*: GLRG_07772, *Spa2*: GLRG_02980, *GLS1*: GLRG_05646, *PKS1*: GLRG_04203

III. Ergebnisse

III.1 Identifizierung von Histondeacetylase-Genen in *Colletotrichum graminicola*

Da in Ascomyceten wie *Cochliobolus carbonum*, *Neurospora crassa* oder *Saccharomyces cerevisiae* bereits Histondeacetylasen identifiziert wurden, konnten mit den jeweiligen Sequenzen BLAST-Analysen gegen das Genom von *C. graminicola* durchgeführt werden.

Zur Übersicht werden die vier Histondeacetylasen von *C. graminicola* in Tabelle 9 aufgelistet. Des Weiteren gibt diese Tabelle Auskunft über die Lage des Gens im *C. graminicola*-Genom und über Orthologe in *C. carbonum* sowie in den pilzlichen Modellorganismen *N. crassa* und *S. cerevisiae*, welche durch paarweise Sequenz-Alignments identifiziert wurden.

Tab. 9: Überblick über Histondeacetylasen in *C. graminicola* und deren Orthologe in *C. carbonum*, *N. crassa* und *S. cerevisiae*

Protein	Gennummer	Lage des Gens im <i>C. g.</i> Genom	Ortholog aus <i>C. carbonum</i>	Ortholog aus <i>N. crassa</i>	Ortholog aus <i>S. cerevisiae</i>
			Identität auf Aminosäureebene		
CgHDA1	GLRG_00900	Chromosom 1	CcHDC3 59 %	NcHDA-3 65 %	ScRPD3 73 %
CgHDA2	GLRG_04401	Chromosom 3	CcHDC1 44 %	NcHDA-2 72 %	ScHOS2 49 %
CgHDA3	GLRG_08073	Chromosom 2	CcHDC3 44 %	NcHDA-1 61 %	ScHDA1 39 %
CgHDA4	GLRG_05856	Chromosom 9	CcHDC4 41 %	NcHDA-4 47 %	ScHOS3 38 %

III.1.1 Phylogenetische Analyse

Das Identifizieren von Domänen ist ein wichtiger Bestandteil von Gen- bzw. Proteincharakterisierungen. Das Vorhandensein solcher Domänen gibt zum einen Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins, zum anderen basieren phylogenetische Analysen auf der Sequenzähnlichkeit, wenn mehrere Sequenzen untereinander verglichen werden. Mittels *in silico*-Analysen (siehe II.10.1) wurden die Gen- und Proteinstrukturen der Histondeacetylasen aus *C. graminicola* ermittelt und in Abbildung 6 (B, C) schematisch dargestellt. Zur Klärung der evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse wurde mit Proteinsequenzen putativer HDACs ein multiples Sequenz-Alignment durchgeführt und diese mit MEGA6.0 ausgewertet (Abb. 6 A). Hierbei wurden neben den Modellorganismen *N. crassa* und *S. cerevisiae* phytopathogene Ascomyceten von wissenschaftlichem und/oder ökonomischem Interesse ausgewählt (Dean *et al.*, 2012). Die phylogenetische Analyse sollte die Zugehörigkeit der identifizierten Proteine zu den HDAC-Klassen veranschaulichen und eine Vorhersage über deren Funktion erlauben.

Aus der Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen geht hervor, dass die Mitglieder der klassischen HDAC-Familie in zwei phylogenetisch unterschiedliche Klassen fallen (Klasse I und Klasse II) (Abb. 6 A). Klasse I-HDACs wie CgHDA1 und CgHDA2 zeigen eine enge Verwandtschaft zum transkriptionellen Regulator RPD3, während Klasse II-HDACs wie CgHDA3 und CgHDA4 hohe Sequenzähnlichkeiten zu HDA1 aus Hefe (*S. cerevisiae*) aufweisen. Die phylogenetische Analyse zeigt auch, dass RPD3-Proteine am höchsten konserviert sind. Die Domänen-Suche in den HDAC-Aminosäuresequenzen ergab, dass in allen Proteinen die charakteristische Histondeacetylase-Superfamilie-Domäne vorkommt (Abb. 6 C). CgHDA3 verfügt über eine zusätzliche Domäne, die Arb2-Domäne, für die man eine Beteiligung bei der Histon H3K9-Methylierung, in der Heterochromatinbildung und bei der Generierung von siRNA nachweisen konnte (Buker *et al.*, 2007). Mittels NLS-Vorhersage konnten in den Aminosäuresequenzen aller HDACs von *C. graminicola* NLS identifiziert werden (score cutoff 0,8). Bei CgHDA3 konnte erst nach dem Herabsetzen des score cutoffs auf 0,3 ein NLS ermittelt werden (Abb. 6 C). Im Fall von CgHDA4 wurden mehrere NLS bestimmt. Für die Histondeacetylasen CgHDA3 und CgHDA4 konnte zudem ein NES (nuclear export signal) in den Aminosäuresequenzen identifiziert werden, was auf eine zusätzliche Funktion außerhalb des Nukleus deutet.

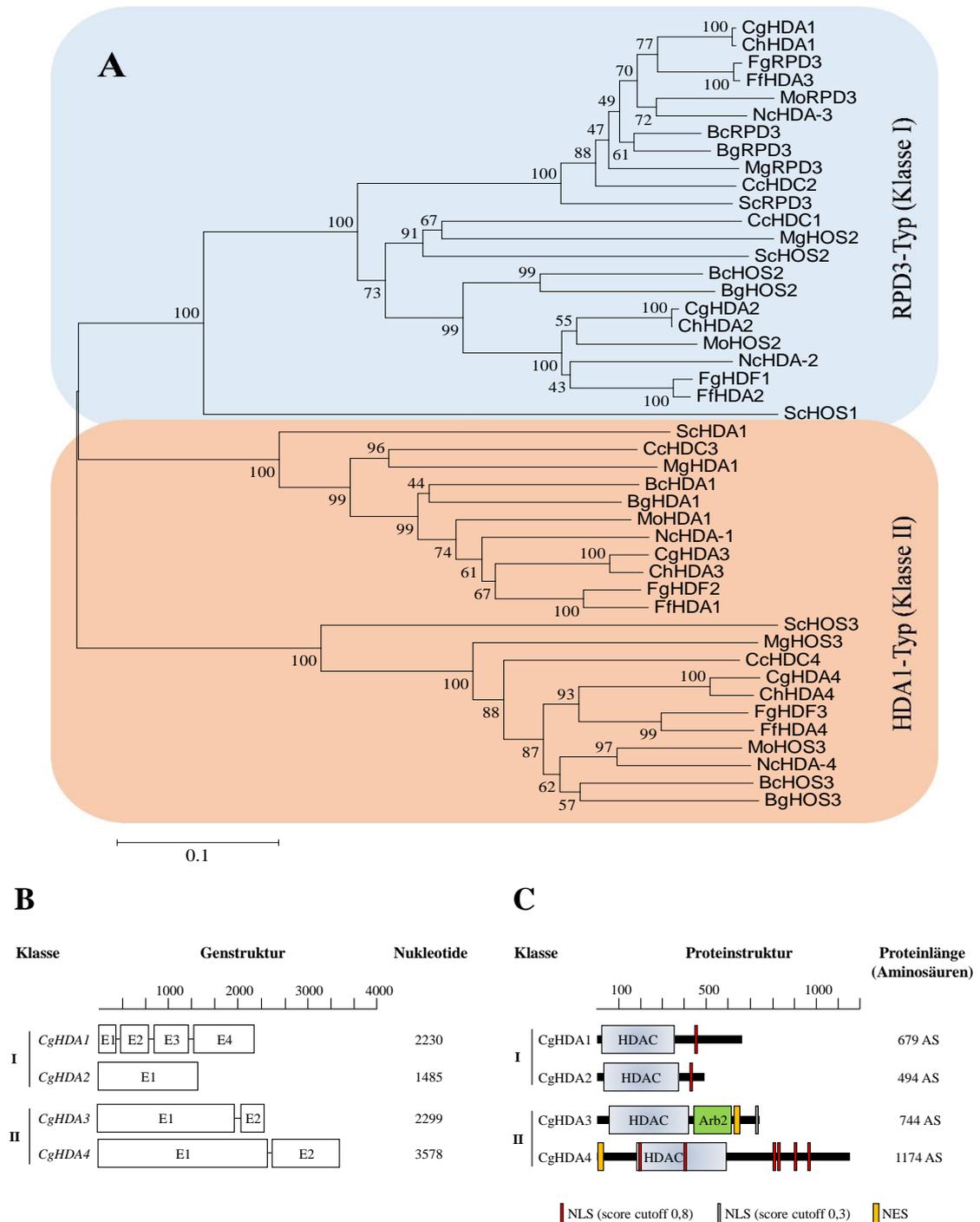


Abb. 6: *in silico*-Charakterisierung der Histondeacetylasen aus *C. graminicola*.

- (A) Phylogenetische Analyse der in ausgewählten Ascomyceten identifizierte HDACs. Dargestellt sind die über Homologievergleiche gefundenen HDACs aus *C. graminicola* (Cg), *Colletotrichum higginsianum* (Ch), *Botrytis cinerea* (Bc), *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bg), *Cochliobolus carbonum* (Cc), *Fusarium graminearum* (Fg), *Fusarium fujikuroi* (Ff), *Mycosphaerella graminicola* (Mg), *Magnaporthe oryzae* (Mo), *Neurospora crassa* (Nc) und *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).
- (B) Genstruktur der Histondeacetylasen aus *C. graminicola*. E bezeichnet Exons.
- (C) Proteinstruktur der Histondeacetylasen aus *C. graminicola*.

III.1.2 Einfluss von Trichostatin A auf *Colletotrichum graminicola*

Klasse I- und Klasse II-Histondeacetylasen können durch den Einsatz bestimmter Inhibitoren wie Trichostatin A (TSA) gehemmt werden. Für *C. graminicola* sollte daher überprüft werden, ob TSA zu morphologischen Veränderungen führt.

Da TSA in DMSO gelöst vorlag, war zunächst zu überprüfen, ob DMSO bereits morphologische Effekte induzieren kann. Der Vorversuch zeigte jedoch, dass das Lösungsmittel zu keinen morphologisch sichtbaren Veränderungen von *C. graminicola* führte (Anhang II, Abb. 36). Nach dem Zusetzen von TSA zeigten sich prägnante Effekte hinsichtlich der Koloniemorphologie (Abb. 7 A, linke Bildreihe). Die Kolonieperipherie erschien unregelmäßig und ausgefranst, während sich die der unbehandelten Kulturen dicht und regelmäßig darstellte (Abb. 7 A, vgl. 0 ppm TSA mit 0,1; 0,5 und 1,0 ppm TSA). Die Hyphen von TSA-behandelten Kulturen waren durch deren Ausmaße nahezu einzeln erkennbar. In Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration wurden zudem eindeutige Wachstumsverzögerungen festgestellt (Abb. 7 B). Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten weiterhin, dass mit steigender TSA-Konzentration der Verzweigungsgrad der Hyphen zunahm, was durch die Quantifizierung bestätigt wurde (Abb. 7 A, rechte Bildreihe und C). Daneben wurden auch Veränderungen der Zellmorphologie festgestellt. Bei 1,0 ppm TSA verloren die Hyphenzellen ihre typische zylindrische Form und erschienen deutlich runder (Abb. 7 A, rechte Bildreihe, vgl. 1,0 ppm mit 0, 0,1 oder 0,5 ppm TSA).

Neben dem Histondeacetylase-Hemmer wurden auch Versuche mit 5-Azacytidin durchgeführt, um DNA-Methyltransferasen zu inhibieren (Creusot *et al.*, 1982). Während die Modifikation des Acetylierungsgrades deutliche Effekte bei *C. graminicola* verursachte, führte hingegen die Manipulierung der DNA-Methylierung zu keinen morphologischen sichtbaren Veränderungen (Anhang III, Abb. 37). Weder die 5-Azacytidin-behandelten Kulturen noch der $\Delta dim2-1$ -Stamm, welcher über keine DNA-Methylierung mehr verfügt (Dr. Andreas Fischer und Wiebke Kummer, persönliche Kommunikation), zeigten unter den getesteten Bedingungen Wachstumsdefekte oder eine abnorme Verzweigung vegetativer Hyphen.

Die Versuche mit Inhibitoren epigenetischer Faktoren weisen darauf hin, dass der Histondeacetylierung bei der Regulierung von Differenzierungsprozessen eine bedeutende Rolle zukommt.

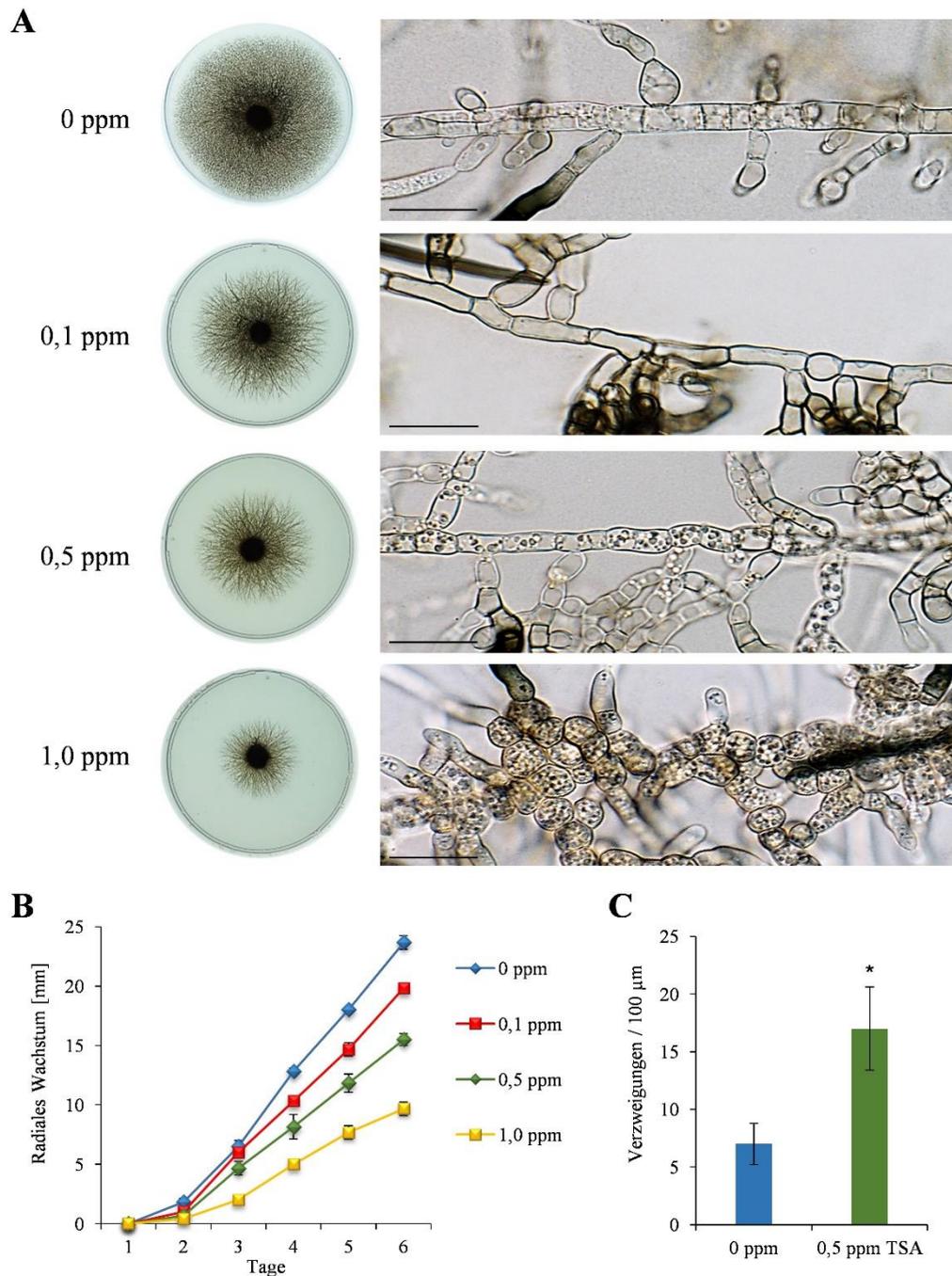


Abb. 7: Effekt von Trichostatin A (TSA) auf vegetatives Wachstum, Koloniemorphologie und Verzweigung.

- (A) Wachstumsversuch. CM-Agarplatten unterschiedlicher TSA-Konzentrationen wurden mit Agarblöckchen des Wildtyps inokuliert. Die Kulturen wurden 6 Tage nach Inokulation fotografiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden Objektträger mit CM-Agarmedium beschichtet, inokuliert und 6 dpi mikroskopiert. Maßstab = 20 µm
- (B) Radiales Wachstum auf CM-Agarplatten unterschiedlicher TSA-Konzentrationen. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen.
- (C) Quantifizierung von Verzweigungen. Über eine Länge von 100 µm wurden Verzweigungsereignisse gezählt. Signifikante Unterschiede zwischen den verwendeten TSA-Konzentrationen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 3, T-Test, p < 0,05).

III.2 Charakterisierung von *CgHDA1*

III.2.1 Deletionsmutagenese

Für *CgHDA1* wurde das Deletionskonstrukt wie unter II.5.4.2 beschrieben generiert und in Protoplasten des Wildtyp-Isolats transformiert (II.5.7.2). Hygromycin B-resistente Transformanten wurden gepickt, vereinzelt (II.5.7.2.3) und mittels Southern Blot-Analysen näher charakterisiert (II.5.3).

Der gesamte ORF von *CgHDA1* sollte bei einer erfolgreichen Deletion durch die 2055 bp große Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) ersetzt werden (Abb. 8 A). Das Ergebnis der Southern-Analyse zeigte, dass sich kein Isolat mit homologer Integration des KO-Konstrukts unter den getesteten Transformanten befand und dass in jedem Isolat das WT-Gen nachgewiesen werden konnte (Abb. 8 B).

Nachdem 35 Transformanten mittels Southern Blots analysiert wurden, wurden anschließend weitere 183 Transformanten durch PCR-Analysen untersucht (Abb. 8 C und D). Bei keiner der getesteten Transformanten konnte eine Deletion von *CgHDA1* bestätigt werden, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Deletion von *CgHDA1* zu einem letalen Phänotyp führt.

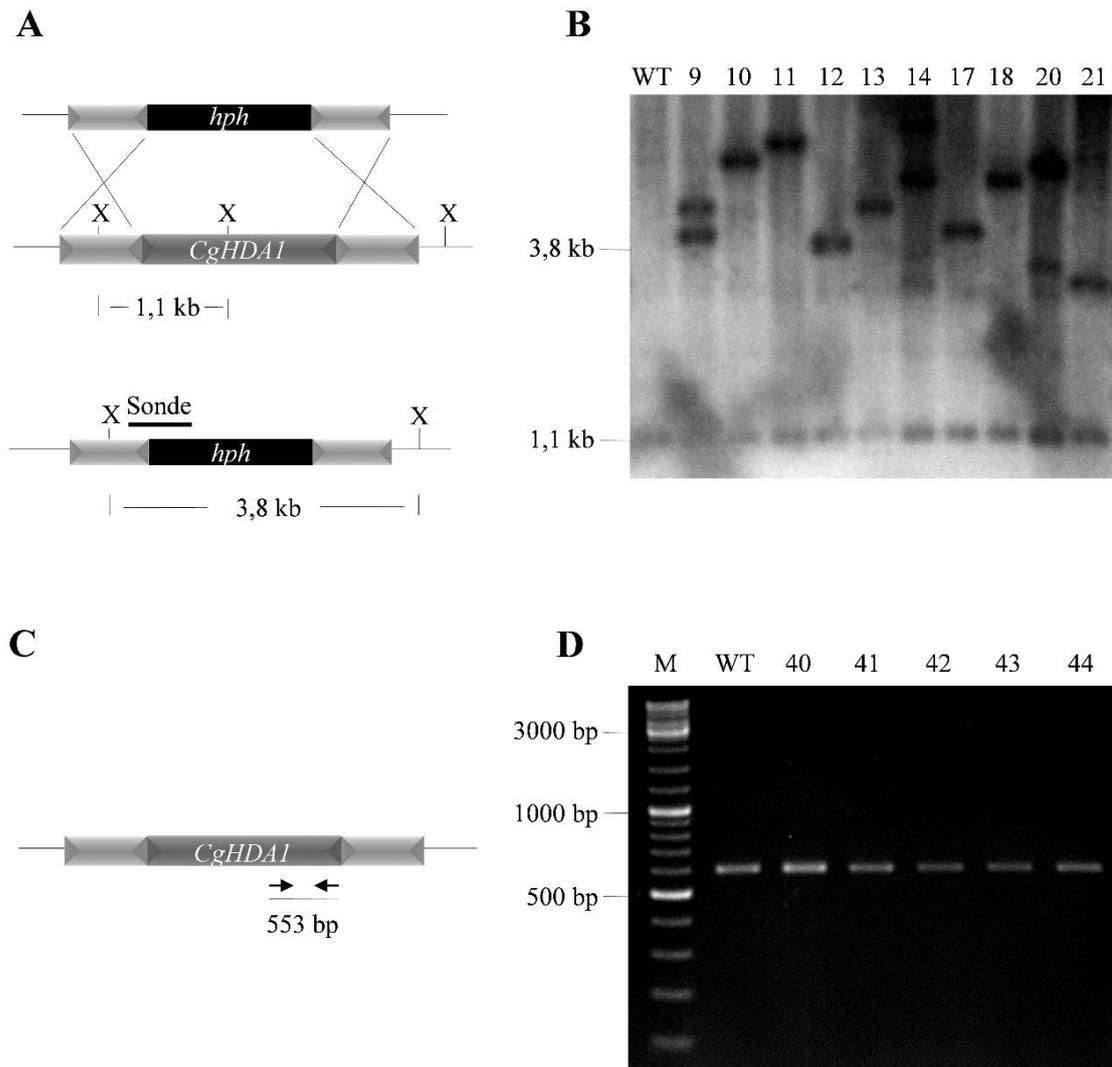


Abb. 8: *CgHDA1*-Deletionsmutagenese.

- (A) *CgHDA1*-Deletionsstrategie. X = *XbaI*, *hph* = Hygromycin-Resistenzkassette (*gpdA*-Promotor und *hph*).
- (B) Southern-Analyse. Die Restriktion der genomischen DNA wurde mit *XbaI* durchgeführt. Die Spuren bezeichnen unabhängige Isolate.
- (C) Strategie zum Nachweis von *CgHDA1* mittels PCR. Das Primerpaar CgHDA1i-StuI.F und CgHDA1i-ApaI.R amplifiziert ein 553 bp langes Fragment in der kodierenden Region von *CgHDA1* und kann somit nur an gDNA vom Wildtyp (WT) oder Transformanten mit ektopischer Integration der Resistenzkassette ein Produkt erzeugen.
- (D) PCR-Analyse zum Nachweis des *CgHDA1*-Gens. Neben dem Wildtyp (WT) sind fünf unabhängige Transformanten (40-44) gezeigt, die das WT-Gen aufweisen. Es wurden insgesamt 183 Transformanten mittels PCR untersucht.

III.2.2 Silencing von *CgHDA1*

Da es nicht möglich war, *CgHDA1*-Deletionsmutanten zu generieren, sollte mithilfe einer RNAi-Analyse die Genfunktion von *CgHDA1* studiert werden. Hierbei stellen siRNA-Expressionskonstrukte eine Alternative dar, denn diese ermöglichen eine stabile Expression der siRNA und damit die Durchführung von Langzeituntersuchungen. Das *HDA1* RNAi-Konstrukt wurde wie unter II.5.9 beschrieben generiert und in Protoplasten des *C. graminicola*-Wildtypisolats transformiert (II.5.7.2).

III.2.2.1 Charakterisierung der RNAi-Isolate durch Southern-Analyse und RT-qPCR

Um die Kopienanzahl der integrierten RNAi-Konstrukte im Genom der erhaltenen Transformanten zu bestimmen, wurden Southern-Analysen durchgeführt (Abb. 9 A, B). Neben dem Wildtyp (WT) wurden 11 RNAi-Isolate mitgeführt, welche in drei unabhängigen Transformationen gewonnen wurden.

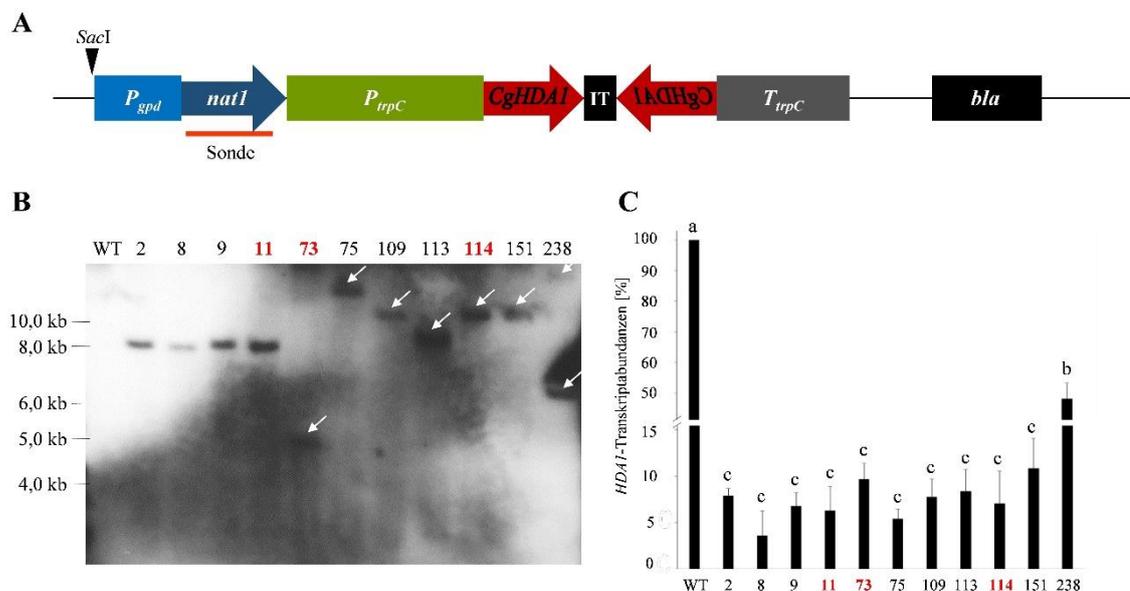


Abb. 9: Molekulare Charakterisierung der *CgHDA1*-RNAi-Transformanten.

- (A) Nachweisstrategie für die Southern-Analyse.
- (B) Southern-Blot. Die Restriktion der genomischen DNA wurde mit *SacI* durchgeführt. Die Sonde richtete sich gegen das *nat1*-Gen. Die Spuren bezeichnen unabhängige Isolate.
- (C) Erhebung von Transkriptabundanz mittels RT-qPCR. Gezeigt sind Mittelwerte dreier biologischer Wiederholungen mit Standardabweichungen. Die Zugehörigkeit zu den Signifikanzgruppen wird durch Kleinbuchstaben über den einzelnen Säulen angegeben (Einweg-ANOVA und Holm-Sidak-Test, $p < 0,05$). Die Normalisierung erfolgte mit den *C. graminicola*-Referenzgenen *CgHiston H3* und *CgACT*. Diese Daten wurden von Iris Gase generiert.

Wie in Abbildung 9 B ersichtlich wird, zeigt der WT kein Hybridisierungssignal, da dieser nicht über das pRNAi-HDA1-Konstrukt verfügt. Bei der Integration des gesamten pRNAi-HDA1-Plasmids sollte das kleinste nachzuweisende Fragment bei ca. 7 kb liegen. Dieses Ergebnis wurde für nahezu alle Isolate erhalten, Isolat 73 weicht jedoch von diesem Ergebnis ab. Hier konnte durch die *natI*-Sonde ein ca. 5 kb großes Fragment detektiert werden. Durch den Einsatz der Sonde konnte bei den Isolaten 2, 8, 9, 11, 73, 75, 109, 113, 114 und 151 unabhängig voneinander jeweils eine Einzelintegration des RNAi-Konstrukts nachgewiesen werden. Im Fall von Isolat 238 detektierte die *natI*-Sonde zwei Fragmente. Ob es sich auch um eine Dreifachintegration handeln könnte, blieb im Blot unklar. Da durch die eingesetzte Sonde nur das *natI*-Resistenzgen nachweisbar war, nicht aber das RNAi-Konstrukt an sich, und bei dem Isolate 73 zudem eine nicht vollständige Integration des RNAi-Vektors vorliegt, wurden alle Isolate mittels PCR auf die Anwesenheit der RNAi-Fragmente hin untersucht. Durch diesen Nachweis konnte in allen RNAi-Stämmen das RNAi-Konstrukt detektiert werden (Anhang IV, Abb. 38). Die Analyse der mRNA-Mengen mittels RT-qPCR zeigte, dass die *HDA1*-RNAi-Stämme signifikant geringere Transkriptabundanz aufwiesen (Abb. 9 C). Eine Korrelation zwischen Integrationshäufigkeit des RNAi-Vektors und Transkriptabundanz wurde nicht festgestellt.

III.2.2.2 Morphologische Charakterisierung anhand von Wachstumsversuchen

Die phänotypische Charakterisierung der *HDA1* RNAi-Isolate erfolgte zunächst in Wachstumsversuchen auf unterschiedlichen Kulturmedien (Abb. 10 A und B). Dabei zeigten die *HDA1* RNAi-Isolate 11, 114 und 73 auf den Standardkulturmedien OMA und PDA im Vergleich zum Wildtyp (WT) einen unterschiedlich stark ausgeprägten Wachstumsdefekt bzw. eine graduelle Abnahme des vegetativen Wachstums (vgl. WT und RNAi-Isolate; OMA und PDA). Alle weiteren *HDA1* RNAi-Isolate verhielten sich phänotypisch wie Isolat 11, welches zusammen mit den Isolaten 114 und 73 für die weitere Charakterisierung ausgewählt wurde. Auffällig war auch die verstärkte Pigmentierung der vegetativen Hyphen der RNAi-Isolate (vgl. WT und RNAi-Isolate; OMA). Minimalmedium (MM) konnte innerhalb von neun Tagen von den *HDA1* RNAi-Isolaten nicht besiedelt werden, während das Wachstum des Wildtyp-Isolats nicht beeinträchtigt war (Abb. 10 A und B, vgl. WT und RNAi-Isolate; MM).

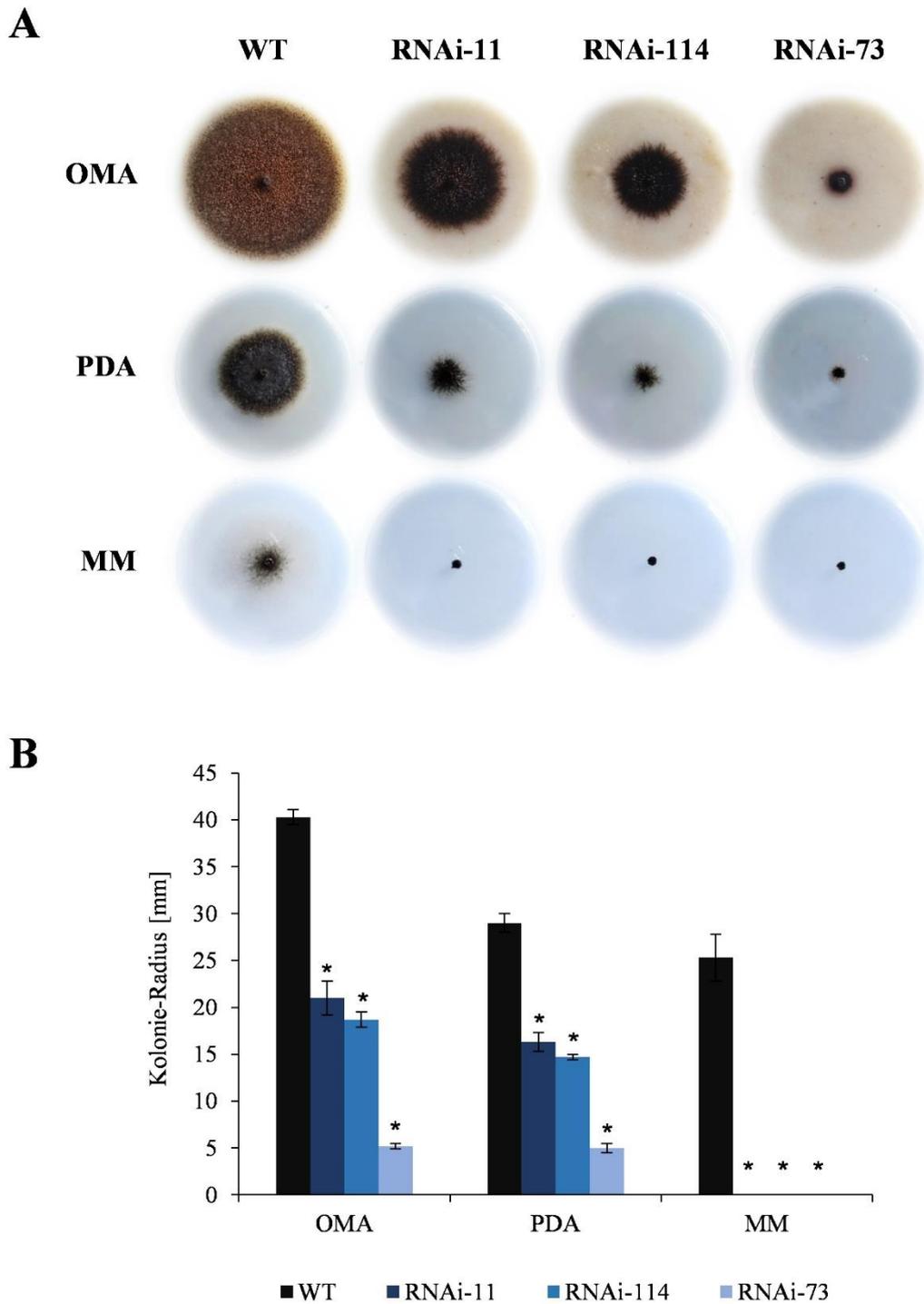


Abb. 10: Charakterisierung des vegetativen Wachstums.

(A) Wachstum und Phänotyp von WT und *HDAI* RNAi-Isolaten auf OMA, PDA und Minimalmedium (MM), 9 dpi.

(B) Quantifizierung des radialen Wachstums. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten der Kolonieradien nach neun Tagen mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDAI* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 3, T-Test, p < 0,05).

III.2.2.3 Mikroskopische Charakterisierung der RNAi-Isolate

Nach dem Transferieren der *HDA1* RNAi-Isolate auf PDA (M5), Regenerationsmedium (M9) oder Kompletmedium (M4) konnten Unterschiede in der Koloniemorphologie beobachtet werden. Abbildung 11 A zeigt Detailstudien der Kolonieperipherie von Wildtyp (WT) und den *HDA1* RNAi-Isolaten. Die Hyphen des WT-Isolats waren durch diffuses Wachstum gekennzeichnet und die einzelnen Hyphen waren sehr dünn (WT, PDA und RM). Dagegen erschienen die Hyphen der RNAi-Isolate vom Durchschnitt her wesentlich umfangreicher und waren dadurch einzeln erkennbar. Weiterhin wiesen diese Hyphen eine deutlich ausgeprägtere Pigmentierung auf. Zudem deutete sich ein buschigeres, verzweigteres Hyphenwachstum an (Abbildung 11 A, vgl. WT mit RNAi-Isolaten; PDA und RM). Da bereits makroskopisch signifikante Unterschiede in der Koloniemorphologie von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten zu beobachten waren, schlossen sich detaillierte Mikroskopiestudien an, um diesen Phänotyp näher zu charakterisieren (Abb. 11 B). Diese sollten zunächst klären, ob es sich bei den von RNAi-Isolaten gebildeten Hyphen um einzelne Hyphen oder um Hyphenaggregate handelte. Hierfür wurden Hyphen von der Hyphenspitze zum Koloniezentrum hin mikroskopisch verfolgt. Durch diese Untersuchung konnte gezeigt werden, dass es sich bei den von RNAi-Isolaten gebildeten Hyphen um einzelne, jedoch stark verzweigte Hyphen handelte (vgl. Abb. 11 B WT und RNAi-11, Anhang VI. Übersichtsaufnahmen I sowie Anhang VII. Übersichtsaufnahmen II). Im Vergleich zu den Hyphen der RNAi-Isolate, konnten bei WT-Hyphen keine Verzweigungen nahe der Hyphenspitze beobachtet werden, während die Hyphen der RNAi-Isolate frühzeitig verzweigten und zum Koloniezentrum hin einen immensen Verzweigungsgrad aufwiesen. Die Abbildungen im Anhang VII. geben anschaulich wieder, dass diese Strukturen Ausmaße vom mehreren 100 µm annehmen können. Neben dem Verzweigungsphänotyp wurde zudem eine signifikante Veränderung der Zellmorphologie von vegetativen Hyphen festgestellt. Während WT-Hyphen von länglicher, zylindrischer Form waren, wirkten die einzelnen Hyphenzellen der RNAi-Stämme komprimiert und bulbös (Abb. 12 A, vgl. WT mit RNAi-Isolaten). Die bulböse Hyphenform war ausgeprägter, wenn die RNAi-Isolate in Flüssigmedium kultiviert wurden, zudem wurden in den Hyphenzellen vakuoläre Strukturen sichtbar (vgl. Abb. 11 C, DIC, mit Abb. 12, A). Weiterhin war eine verstärkte Pigmentierung der pilzlichen Zellwände deutlich sichtbar (Abb. 12 A, vgl. WT mit RNAi-Isolaten).

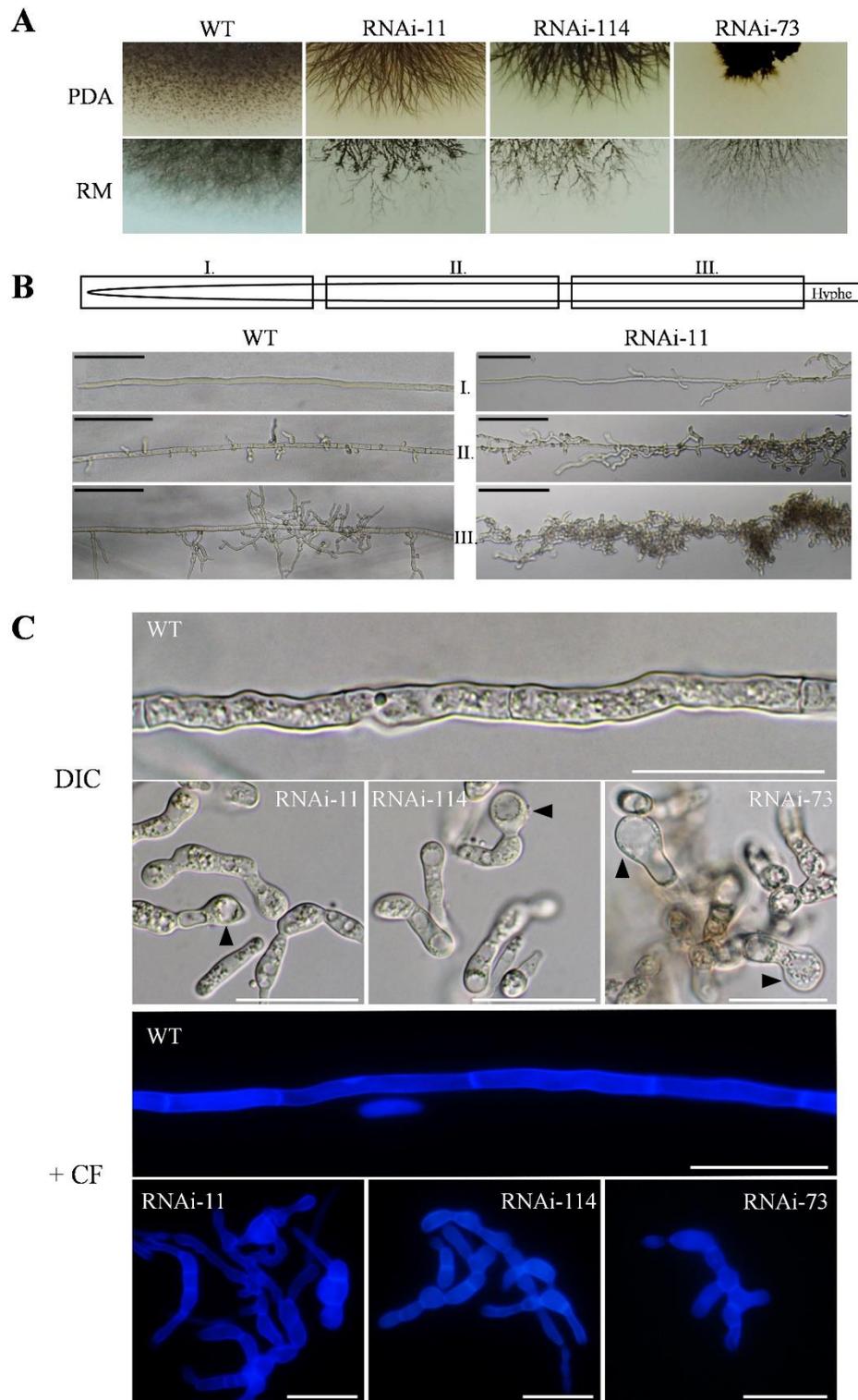


Abb. 11: Morphologische Charakterisierung der von *HDAI* RNAi-Isolaten differenzierten vegetativen Hyphen.

- (A) Detailstudie der Kolonieperipherie von WT und *HDAI* RNAi-Isolaten auf PDA und Regenerationsmedium (RM), 7 dpi.
- (B) Mikroskopische Untersuchung der Hyphenmorphologie von WT und *HDAI* RNAi-Isolat auf festem Medium (Komplettmedium). Maßstab = 100 μ m.
- (C) Mikroskopische Untersuchung der Hyphenmorphologie von WT und *HDAI* RNAi-Isolat in flüssigem Regenerationsmedium. Maßstab = 20 μ m.

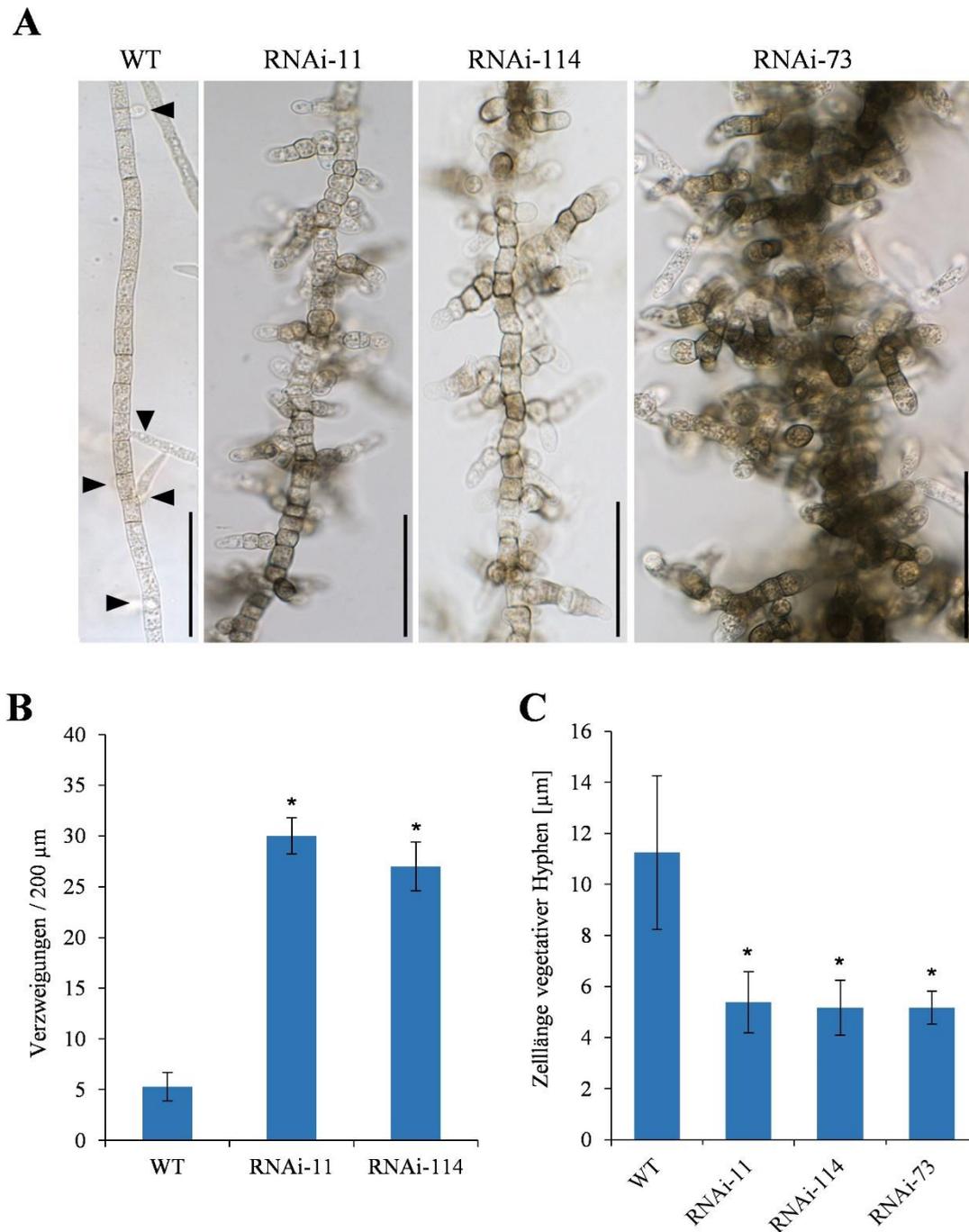


Abb. 12: Charakterisierung der *HDA1* RNAi-Isolate.

- (A) Detailstudie von Hyphen nahe der Kolonieperipherie von WT- und *HDA1* RNAi-Isolaten auf mit Regenerationsmedium beschichteten Objektträgern, 10 d. Pfeilspitzen bei WT zeigen auf Verzweigungen. Maßstab = 50 μm .
- (B) Quantifizierung von Verzweigungen. Je Isolat wurden Verzweigungen pro 200 μm gezählt. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stamm sind mit einem * gekennzeichnet (n = 3, T-Test, p < 0,05).
- (C) Ermittlung der Zelllängen. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stamm sind mit einem * gekennzeichnet (n = 150, Mann-Whitney Rank Sum Test, p < 0,05).

Durch profunde mikroskopische Analysen konnte weiterhin festgestellt werden, dass von den einzelnen Hyphenzellen der *HDA1* RNAi-Isolate mehrere Verzweigungen in dreidimensionaler Lage gebildet wurden (Abb. 12 A, RNAi-11, RNAi-114). Die Quantifizierung des Verzweigungsgrades in der Nähe der Kolonieperipherie erbrachte für das WT-Isolat, dass innerhalb von 200 μm , was etwa 22 WT-Zellen entspricht, fünf Verzweigungen ermittelt werden konnten (Abb. 12 B, WT). Für die RNAi-Isolate 11 und 114 wurden auf einer Länge von 200 μm rund 40 Zellen gezählt, von denen rund 30 Verzweigungen abgingen (Abb. 12 A und B, RNAi-11, RNAi-114). Das Hyphenwachstum von RNAi-Isolat 73 stellte sich als sehr irregulär dar. Aufgrund der frühen und enormen Verzweigung (Abb. 12 A, RNAi-73), konnte keine Quantifizierung der Verzweigungsrate durchgeführt werden. Die Vermessung der Zelllänge vegetativer Hyphen zeigte, dass *HDA1* RNAi-Isolate signifikant kleinere Zellen bildeten (Abb. 12 C).

Um den pleiotropen Phänotyp von *HDA1* RNAi-Stämmen näher zu untersuchen, wurden Gene ausgewählt, die in der Zellwandbiogenese (Chitinsynthase Klasse V: *ChsV*; Glucansynthase: *GLS1*), in der Melaninbiosynthese (Polyketidsynthase: *PKS1*) oder in apikalem Wachstum oder Verzweigungsprozesse (GTPase: *Rho3*; NDR-Proteinkinase: *Cot-1*; Polarisomkomponente: *Spa2*) involviert sind. Aus den in Abbildung 13 gezeigten RT-qPCR-Analysen wird ersichtlich, dass die Gene *GLS1*, *Spa2* und *PKS1* im RNAi-11-Isolat im Vergleich zum Wildtyp signifikant hochreguliert sind. Dieses Ergebnis weicht von dem der RNAi-Stämme 114 und 73 ab, denn dort lagen die Gene *GLS1* und *PKS1* nicht dereguliert vor (Abb. 13, vgl. RNAi-11 mit RNAi-114 und RNAi-73). Die RNAi-Isolate 114 und 73 zeigten untereinander identische Transkriptmengen der untersuchten Gene (Abb. 13, vgl. RNAi-114 und RNAi-73). Die RT-qPCR-Analysen zeigten jedoch deutlich, dass *Spa2* in allen drei RNAi-Isolaten signifikant hochreguliert ist, was darauf hindeutet, dass Polaritätskomponenten direkt oder indirekt durch *HDA1* reguliert werden könnten.

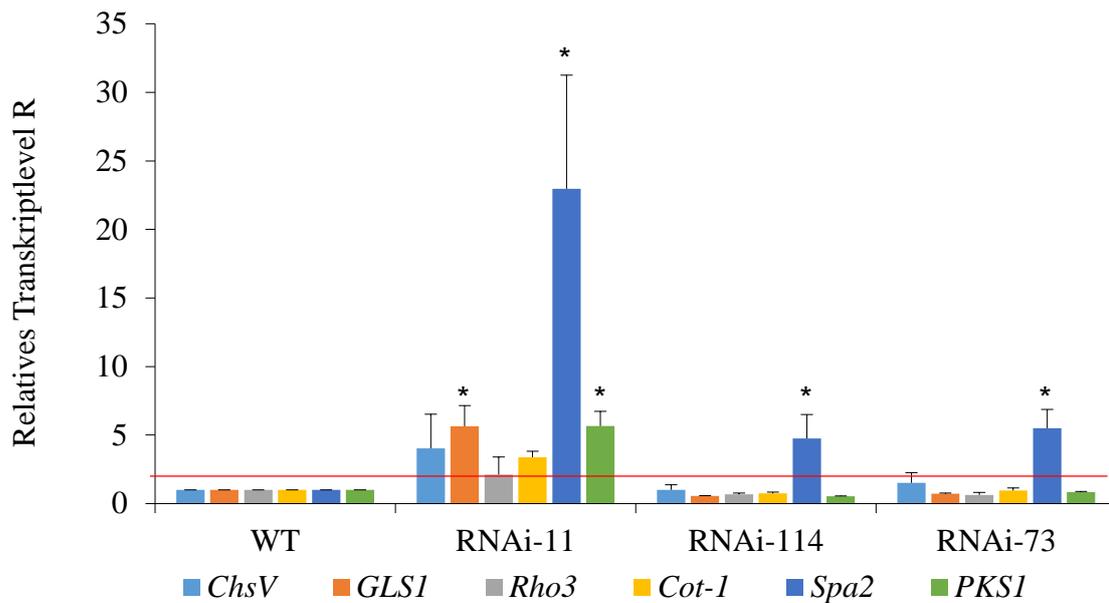


Abb. 13: RT-qPCR Analysen von Wildtyp (WT) und *HDA1* RNAi-Isolaten.

Expressionslevel von *CgChsV*, *CgGLS1*, *CgRho3*, *CgCot-1*, *CgSpa2* und *CgPKS1* in 10 Tage alten RM-Kulturen. Die RNA dreier biologischer Wiederholungen wurde vereinigt. Die Transkriptmengen sind dargestellt als relative Werte im Vergleich zum Wildtyp, welcher auf 1 gesetzt wurde. Als induziert gilt ein Gen ab einem Wert von $R > 2$ (roter Linie), als reprimiert ab einem Wert von $R < 0,5$. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte dreier technischer Wiederholungen mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet ($n = 3$, T-Test, $p < 0,05$). Die Normalisierung erfolgte zu den Transkriptmengen der Referenzgene *Histon H3* und *Actin*. Diese Daten wurden von Iris Gase generiert.

III.2.2.4 Makroskopische und mikroskopische Charakterisierung der asexuell gebildeten Konidien von *HDA1* RNAi-Stämmen

Weiterhin schlossen sich mikroskopische Untersuchungen der asexuell gebildeten Konidien an. RNAi-Stämme bildeten auf Haferflockenagar im Vergleich zum Wildtyp sichtbar weniger Sporenlager, in denen signifikant weniger Konidien differenziert wurden (Abb. 14 A und B, vgl. WT mit RNAi-Isolaten). Die Vermessung der Konidienlänge ergab, dass RNAi-Stämme im Vergleich zum WT signifikant kleinere Konidien bildeten (Abb. 14 C). Besonders deutlich zeigte sich dies bei RNAi-73. Konidien dieses Isolats sind ca. 10 μm kleiner als WT-Konidien (vgl. WT und RNAi-73). Trotz der Effekte auf die Konidienlänge hatte das Silencing von *HDA1* keinen Einfluss auf die Konidienform. Die untersuchten Isolate bildeten die charakteristischen sichelförmigen Konidien (Abb. 14 D, vgl. WT mit RNAi-Isolaten).

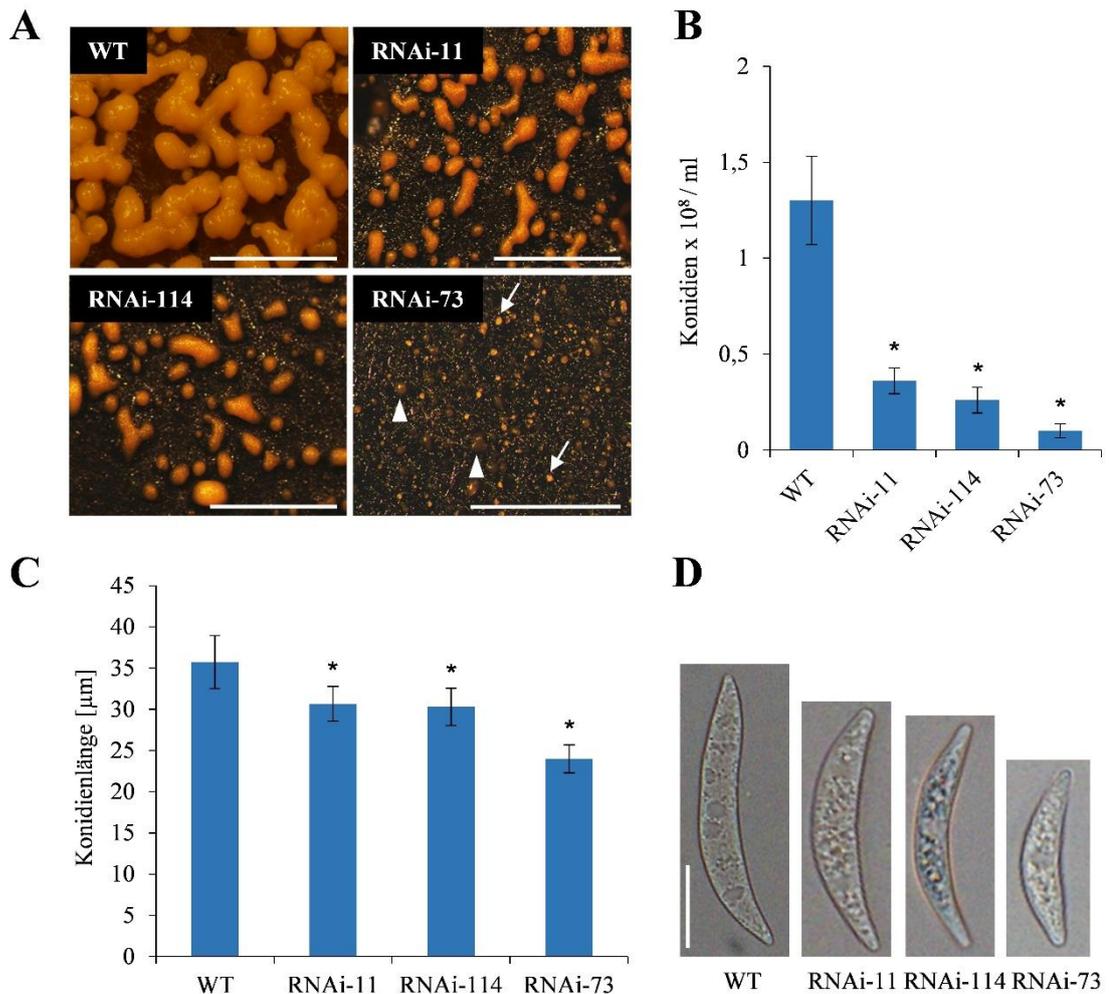


Abb. 14: Sporulation und Konidienmorphologie von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten.

- (A) Acervulidifferenzierung. Detailaufnahmen aus dem Zentrum 14 Tage alter Kulturen von WT und *HDA1* RNAi-Stämmen auf Haferflockenagar. Maßstab bei WT, RNAi-11 und RNAi-114 = 4 mm, bei RNAi-73 = 1 mm. Pfeile bei RNAi-73 weisen auf Sporenlager mit orangener Sporenmatix, Pfeilspitzen auf noch farblose Sporenlager.
- (B) Sporulationsversuch. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stamm sind mit einem * gekennzeichnet (n = 8, T-Test, p < 0,05).
- (C) Konidienlänge von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten. Die Konidien wurden von 14 d alten OMA-Kulturen gewonnen. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stamm sind mit einem * gekennzeichnet (n = 90, Mann-Whitney Rank Sum Test, p < 0,05).
- (D) Konidienmorphologie von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten. Die Konidien wurden von 14 d alten OMA-Kulturen gewonnen. Maßstab = 10 µm.

III.2.2.5 Infektionsversuche

Um den Beitrag von Histondeacetylase 1 zur Virulenz oder Pathogenität zu ermitteln, wurden Infektionsversuche durchgeführt (Abb. 15).

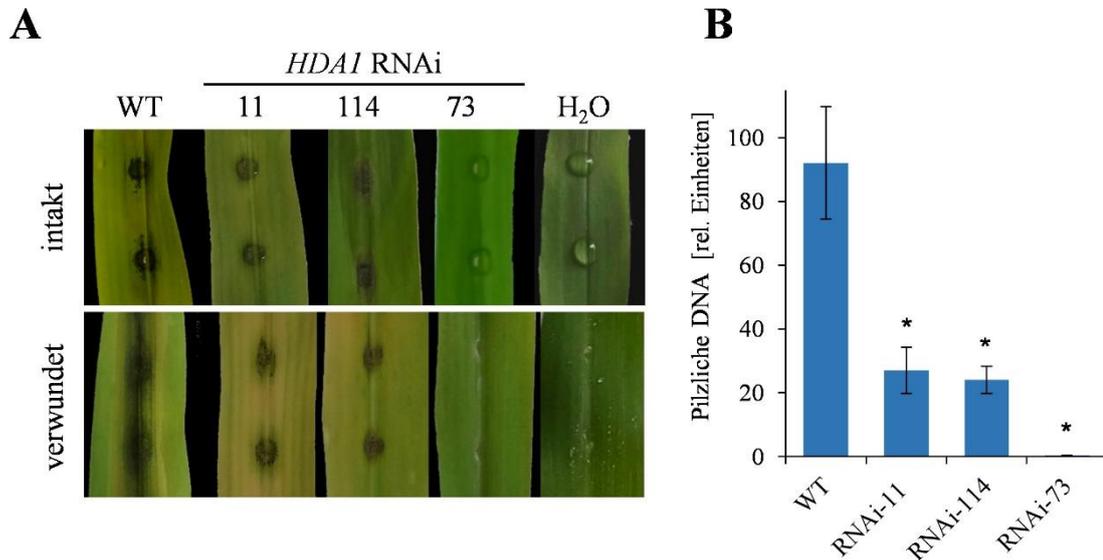


Abb. 15: Pathogenitätstest.

- (A) Infektionstests mit WT und *HDAI* RNAi-Stämmen auf der Maissorte Golden Jubilee. Die Dokumentation der Symptome erfolgte nach fünf Tagen.
- (B) Bestimmung der pilzlichen Biomasse in intakten Maisblättern (Golden Jubilee) mittels qPCR. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDAI* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 3, T-Test, p < 0,05). Diese Daten wurden von Iris Gase generiert.

Die mit *HDAI* RNAi-Konidien inokulierten intakten Maisblätter der Sorte Golden Jubilee zeigten im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduzierte Anthraknose-Symptome (Abb. 15 A). Mittels qPCR-Analysen konnte bestätigt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp signifikant verminderte Mengen an pilzlicher DNA im Blattgewebe vorlagen (Abb. 15 B, vgl. WT und *HDAI* RNAi-Stämme). Dem Isolat RNAi-73 war es nicht möglich, Läsionen hervorzurufen (Abb. 15 A, intakt). Das Ergebnis dieses Versuchs konnte auf verwundeten Blättern reproduziert werden (Abb. 15 A, verwundet). Während der Wildtyp auf verwundeten Blättern ausgeprägte und ineinander übergehende Läsionen hervorrief, verursachten die *HDAI* RNAi-Isolate 11 und 114 an den Inokulationsstellen Symptome von verminderter Ausprägung. Ineinander übergehende Läsionen wurden nie beobachtet. Zudem wurde festgestellt, dass das RNAi-73-Isolat auch auf verwundeten Maisblättern keine Läsionen hervorzurufen vermochte. Die mit RNAi-73-Konidien

inokulierten Verwundungsstellen waren identisch zu denen nicht inokulierter Blättern (Abb. 15, vgl. *HDAI* RNAi-73 und H₂O). Auf der im Vergleich zu Golden Jubilee etwas resistenteren Sorte Mikado, konnte die verminderte Symptomausprägung auf intakten und verwundeten Blättern reproduziert werden (Anhang VIII; Abb. 42).

III.2.2.6 Mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs auf intakten Maisblättern

Da die *HDAI* RNAi-Stämme eine verringerte Virulenz zeigten, erfolgte die mikroskopische Analyse von Infektionsstrukturen und des Infektionsverlaufs, um den Defekt näher zu untersuchen. Außerdem sollte überprüft werden, ob morphologisch veränderte Infektionsstrukturen differenziert werden.

Für die RNAi-Isolate konnte zunächst beobachtet werden, dass neben multiplen Keimungsereignissen (Abb. 16 B) auch signifikant längere Keimschläuche differenziert wurden (Abb. 16 A 1 dpi, B und C, vgl. WT und RNAi-Isolate, und Anhang VIII. Abb. 43). Mehr als 50 % der RNAi-11- und RNAi-114-Konidien und ca. 80 % der RNAi-73-Konidien wiesen mehr als ein Keimungsereignis auf (Abb. 16 A vgl. WT und RNAi-Isolate bei 1 dpi und Abb. 16 B). Die mikroskopischen Analysen zeigten dahingehend, dass RNAi-Isolate vorwiegend von beiden Konidien-Enden (bipolar) auskeimten, während Keimschläuche bei WT-Konidien nahezu mittig angelegt waren (Abb. 16 A, vgl. WT und RNAi bei 1 dpi sowie Anhang VIII. Abb. 43). Auffallend war nicht nur, dass oftmals hakenförmige Keimschläuche von den Enden der RNAi-73-Konidien differenziert wurden, sondern auch, dass mehrere Keimschläuche von beliebigen Punkten der Konidien ausgebildet wurden (Abb. 16 A, vgl. WT bei 1 dpi und RNAi-73 Pfeile 1-4 dpi). Verlängerte Keimschläuche sowie multiple Keimungsereignisse konnten auf artifiziellen Oberflächen reproduziert werden (Anhang VIII. Abb. 43).

Aus Abbildung 16 A geht weiterhin hervor, dass im Vergleich zum Wildtyp alle RNAi-Isolate in der Lage waren, melanisierte Appressorien zu bilden (vgl. WT und RNAi-Isolate, 1 dpi). Für die RNAi-Isolate 11 und 114 wurde beobachtet, dass die differenzierten Primär- und Sekundärhyphen keinerlei morphologische Veränderungen im Vergleich zum WT aufwiesen (Abb. 16, vgl. WT, RNAi-11 und RNAi-114, 2 und 3 dpi). Die mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufs ergab jedoch, dass das Blattgewebe im Vergleich zum Wildtyp weniger stark besiedelt war. Nach 4 dpi wurden vom WT zahlreiche Acervuli gebildet, welche asexuelle Sporen entließen und somit den Entwicklungszyklus beendeten. Im Vergleich zum WT bildeten die RNAi-Stämme 11

und 114 in diesem Entwicklungsstadium oftmals Hyphenaggregate bzw. unreife Sporenlager aus (Abb. 17). In vielen Fällen wurden keine bzw. sehr wenige Setae pro Acervulus differenziert (Abb. 16, vgl. WT und RNAi bei 4 dpi mit Abb. 17).

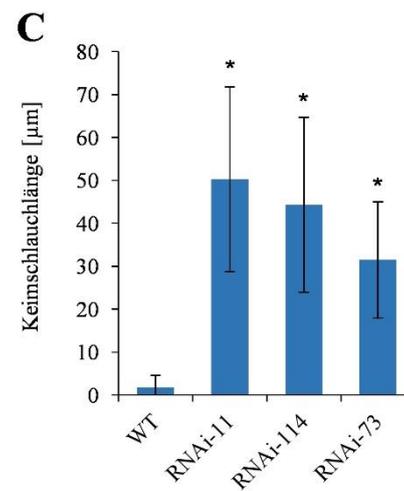
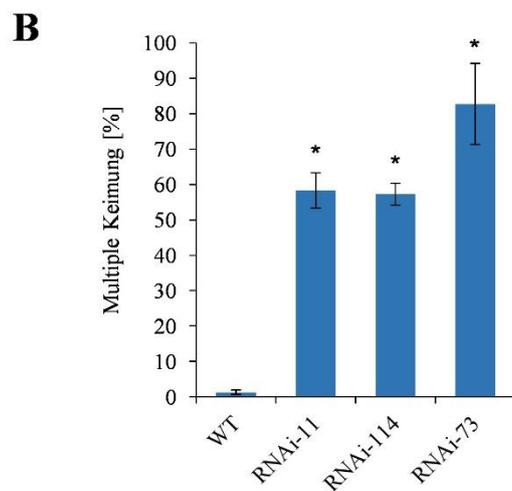
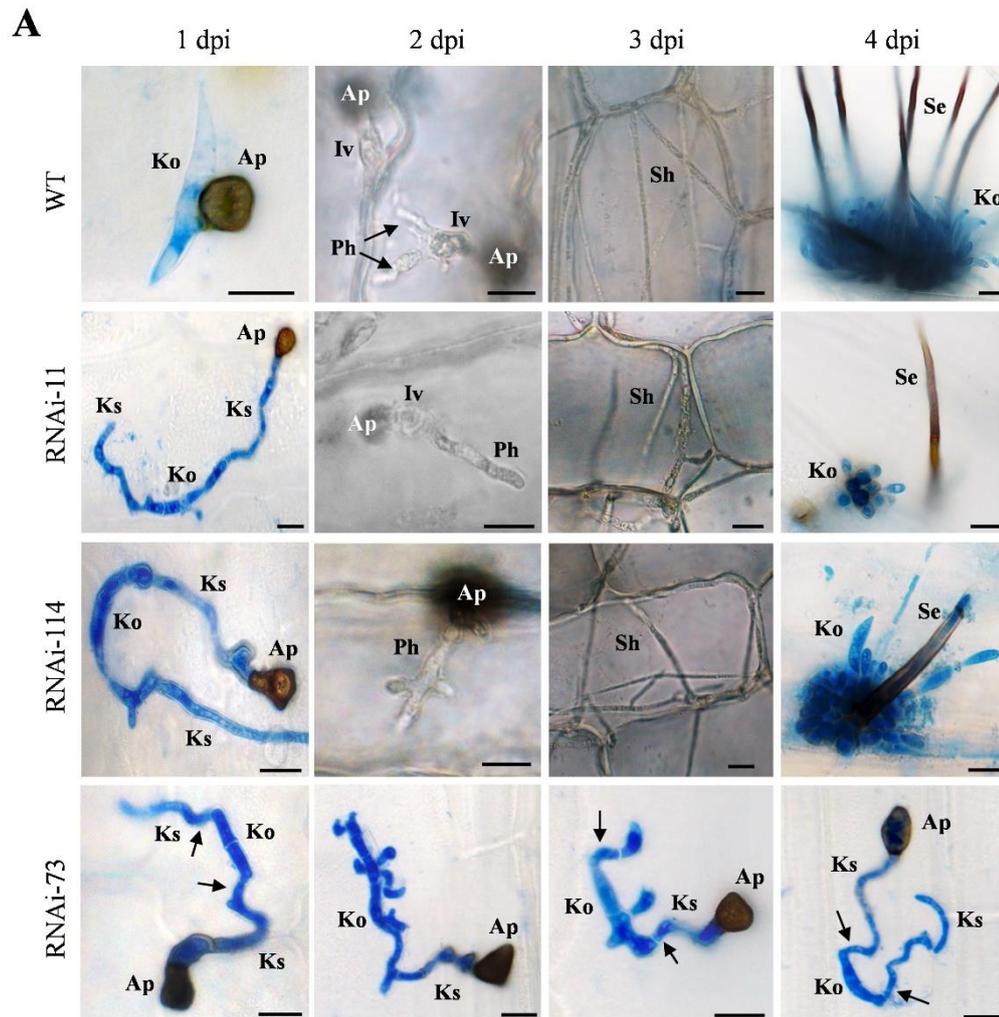


Abb. 16: Differenzierung von Infektionsstrukturen von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten.

- (A) Differenzierung von Infektionsstrukturen von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten auf Maisblättern (Golden Jubilee) während des Infektionsverlaufs. Anilinblau gefärbt. Ko = Konidie, Ks = Keimschlauch, Ap = Appressorium, Iv = Infektionsvesikel, Ph = Primärhype, Sh = Sekundärhype, Se = Seta. Pfeile weisen bei RNAi-73 auf hakenförmige Keimschläuche. Maßstab = 10 μ m.
- (B) Multiple Keimung der RNAi-Isolate auf Maisblättern (Golden Jubilee). Keimungsereignisse >1 wurden als multiple Keimung definiert. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 300, T-Test, p < 0,05).
- (C) Quantifizierung der Keimschlauchlänge von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten auf Maisblättern (Golden Jubilee). Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDA1* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 150, T-Test, p < 0,05).

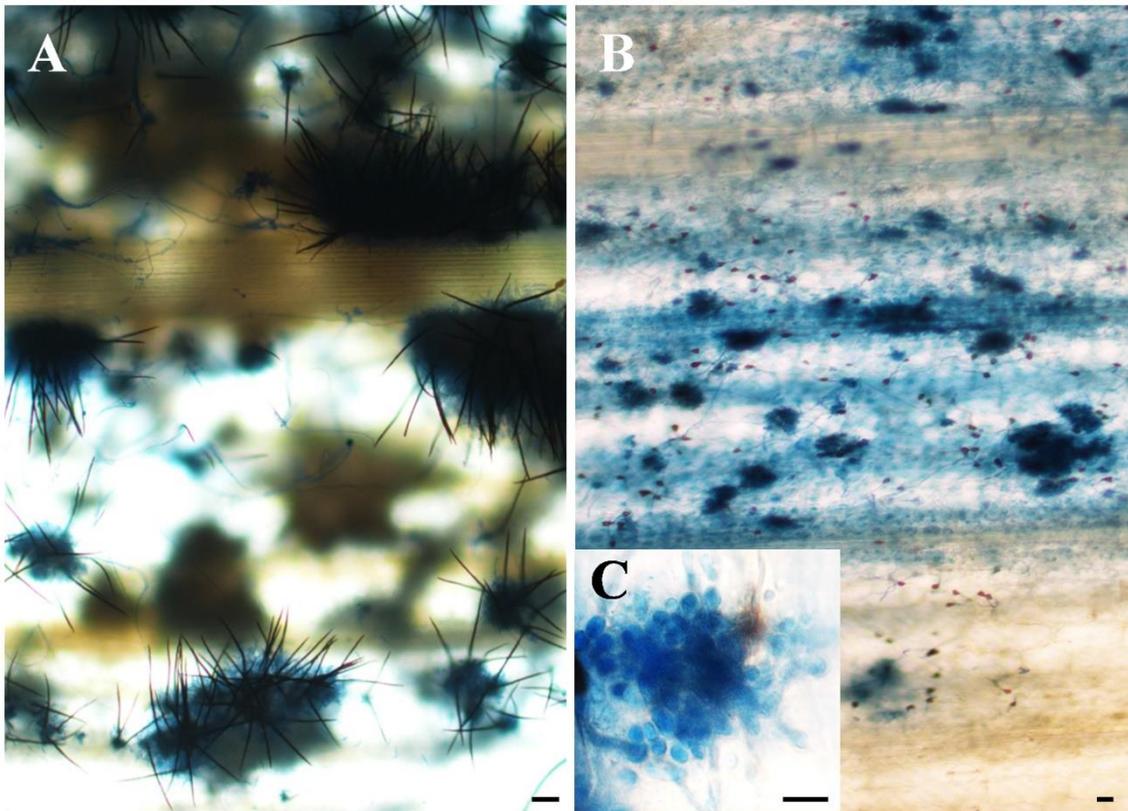


Abb. 17: Differenzierung von Acervuli von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolat 11 auf intakten Maisblättern (Golden Jubilee).

- (A) und (B) Übersichtsstudien der Inokulationsstellen von WT (A) und RNAi-Stamm (B). Anilinblau gefärbt. Als repräsentatives RNAi-Isolat wurde RNAi-11 dargestellt, RNAi-114 zeigt einen äquivalenten Phänotyp. Nach vier Tagen differenzierte der RNAi-Stamm oftmals nur Hyphenaggregate bzw. noch nicht voll entwickelte Sporenlager aus. In vielen Fällen wurden keine bzw. sehr wenige Setae pro Acervulus differenziert. Maßstab = 50 μ m.
- (C) Detailstudie eines unreifen Acervulus aus (B). Anilinblau gefärbt. Maßstab = 10 μ m.

Die von RNAi-Isolaten differenzierten Appressorien wiesen erhebliche funktionelle Defizite auf. Während noch ca. 20-25 % der von den RNAi-Isolaten 11 und 114 gebildeten Appressorien intakte Maisblätter zu penetrieren vermochten, wurde für das RNAi-Isolat 73 kein Penetrationsereignis nachgewiesen (Abb. 18 A, vgl. WT und RNAi-11, RNAi-114 bzw. RNAi-73). Bei der mikroskopischen Untersuchung drei bzw. fünf Tage alter Proben konnte ebenfalls kein Penetrationsereignis festgestellt werden. Um die beobachteten Penetrationsdefekte von *HDA1* RNAi-Isolaten näher zu untersuchen, wurden zunächst die Penetrationssporen untersucht und Papillenbildungsraten ermittelt. Die RNAi-Stämme mit stark reduzierter Penetrationsrate (Isolate 11 und 114) als auch das Isolat mit fehlendem Penetrationsvermögen (Isolat 73) waren in der Lage, die charakteristischen Penetrationssporen auszubilden (Abb. 18 B, vgl. WT mit RNAi). Eine vermehrte Papillenbildung konnte im Vergleich zum Wildtyp nicht festgestellt werden (Abb. 18 C). Weiterführend wurden Zytorrhizie-Experimente durchgeführt (Abb. 18 D und E). Diese sollten zeigen, ob das in den Appressorien der RNAi-Stämme aufgebaute osmotische Potential im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist. Kollabierte Appressorien waren durch die Ausbildung einer Falte von nicht kollabierten Appressorien zu unterscheiden (Abb. 18 E, Pfeile, vgl. WT und RNAi bei 0 bzw. 400 g/l PEG6000). Fünfzig Prozent der Wildtyp- bzw. *HDA1* RNAi-Appressorien kollabierten in einer PEG6000-Lösung von 350 g/l, was nach Money (1989) einem osmotischen Potential von ca. 2,6 MPa entspricht.

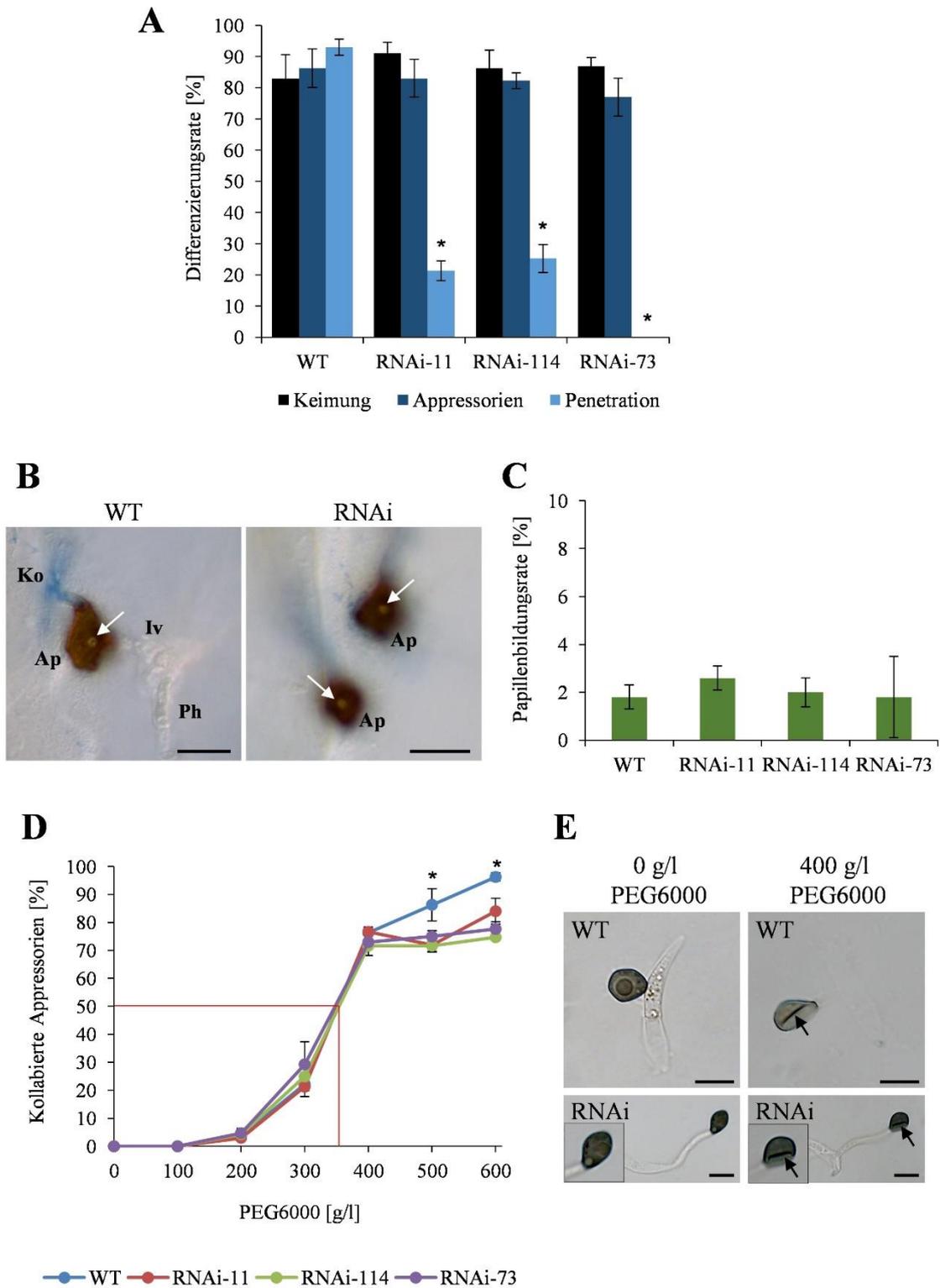


Abb. 18: Infektionsstrukturen, Papillenbildung und Appressorienfunktionalität von Wildtyp und *HDA1* RNAi-Isolaten.

- (A) Quantifizierung von Infektionsstrukturen von WT und RNAi-Isolaten auf Maisblättern (Golden Jubilee). Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDAI* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 300, T-Test, p < 0,05).
- (B) Penetrationsporen von Wildtyp und RNAi-Isolaten 2 dpi. Pfeile weisen auf die Penetrationspore. Ko = Konidie, Ap = Appressorium, Iv = Infektionsvesikel, Ph = Primärhyph. Konidien und Keimschläuche sind Anilinblau gefärbt. Maßstab = 10 µm.
- (C) Papillenbildung von Maisblättern (Golden Jubilee) nach 48 h, die mit dem Wildtyp bzw. RNAi-Isolaten inokuliert wurden. Es wurden je 100 Appressorien von drei unabhängigen Infektionsstellen auf darunter gebildete Papillen untersucht und der prozentuale Anteil Papillen bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten ermittelt werden (n = 300, T-Test, p > 0,05).
- (D) Prozentuale Anzahl kollabierter Appressorien des Wildtyps und der *HDAI* RNAi-Stämme auf Polyesterfolie in PEG6000-Konzentrationen von 0-600 g/l. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und *HDAI* RNAi-Stämmen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 300, T-Test, p < 0,05).
- (E) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Appressorien auf Polyesterfolie ohne und nach Zugabe von 400 g/l PEG6000. Bei den Detailaufnahmen in den Bildern des RNAi-Stamms handelt es sich um Vergrößerungen des im Bild gezeigten Appressoriums. Pfeile weisen auf kollabierte Appressorien. Maßstab = 10 µm.

III.2.2.7 Mikroskopische Untersuchung des Infektionsverlaufs auf verwundeten Maisblättern

Nach der mikroskopischen Analyse intakter Maisblätter erfolgte die Untersuchung von verwundetem Blattmaterial (Abb. 19). Hierbei wurde festgestellt, dass die umliegenden Zellen nahe der Verwundungsstelle eine dichte Besiedlung durch den WT aufwiesen, während sich im Gewebe, welches durch das RNAi-Isolat 11 besiedelt wurde, deutlich weniger Hyphen befanden (Abb. 19, vgl. A und C). Nach 4 dpi wurde sowohl vom WT als auch vom RNAi-11-Isolat der asexuelle Entwicklungszyklus abgeschlossen (Abb. 19, B und D). Die von den RNAi-Stämmen differenzierten Sporenlager scheinen zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zum WT weniger entwickelt zu sein und weniger Sporen zu produzieren. Jedoch sind diese Sporenlager ausgereifter als jene, welche auf intakten Maisblättern gebildet wurden (vgl. Abb. 17 B und C mit Abb. 19 D).

Die Inokulation verwundeter Maisblätter mit RNAi-73-Konidien zeigte, dass von den Sporen Hyphen differenziert wurden, welche jedoch nicht in der Lage waren, durch die Verwundung ins das umliegende Gewebe einzuwachsen (Abb. 19 E und F). Durch das Anfärben mittels Anilinblau konnte nachgewiesen werden, dass zwar pilzliche Hyphen gebildet wurden, diese sich jedoch nur auf der Blattoberfläche bzw. lokal in oder über der artifiziellen Läsion befanden (Abb. 19 E und F). Die sich um die Läsion herum befindlichen Zellen zeigten keinen Befall mit pathogenen Hyphen. RNAi-73-Stämme sind somit auch auf verwundeten Blättern nicht in der Lage, Symptome zu entwickeln. Das Ausbleiben von Acervuli zeigt zudem, dass der asexuelle Entwicklungszyklus nicht abgeschlossen werden konnte (Abb. 19 F).

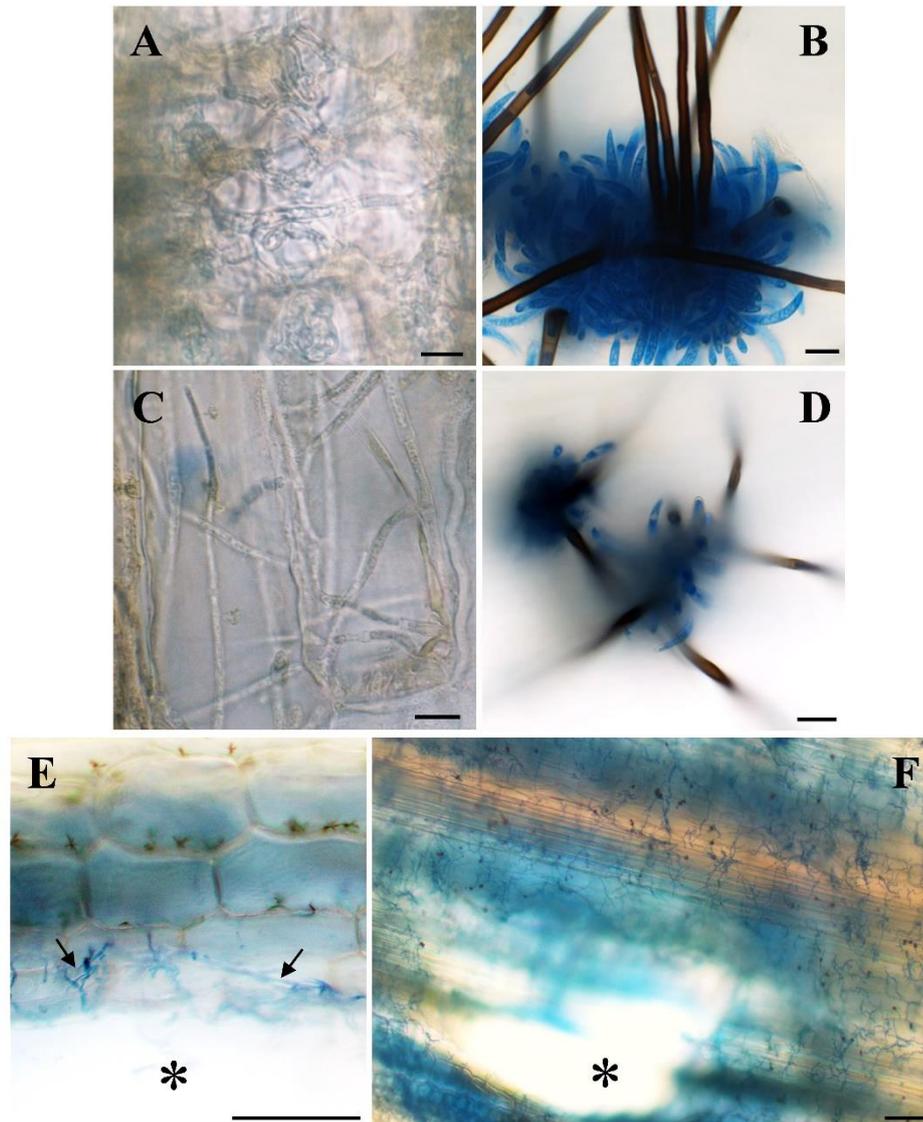


Abb. 19: Mikroskopische Analyse verwundeter Maisblätter (Golden Jubilee), welche mit WT und RNAi-Stämmen inokuliert wurden.

(A) und (B) WT, 3 bzw. 4 dpi.

(C) und (D) RNAi-11, 3 bzw. 4 dpi. RNAi-114 zeigte äquivalente Defekte wie RNAi-11.

(E) Detailstudie einer Verwundungsstelle, in die RNAi-73-Konidien inokuliert wurden. Das Sternchen markiert die Verwundung. Pfeile weisen auf pilzliche Hyphen auf der Pflanzenoberfläche.

(F) Übersichtsbild einer artifiziellen Läsion, welche mit RNAi-73-Konidien inokuliert wurde (4 dpi). Das Sternchen markiert die Verwundung.

Maßstab in A-D 10 µm, in E und F 100 µm. Alle Proben sind Anilinblau gefärbt.

III.3 Charakterisierung von *CgHDA2*

Die Deletion von *CgHDA2* führte aufgrund eines stark verminderten Penetrationsvermögens zu Apathogenität auf intakten Maisblättern (Mickel, 2010). Vereinzelt erfolgreiche Penetrationsversuche endeten mit der Ausbildung von kurzen Primärhyphen, die nicht in das umliegende Wirtsgewebe einwuchsen. $\Delta hda2$ -Stämme waren zudem durch eine verminderte Virulenz in Stängelinfektionsversuchen charakterisiert (Anhang IX. Abb. 44 B und C). Des Weiteren zeigte sich auf allen angebotenen Kohlenstoffquellen, wie Arabinose, Glucose, Xylose, Saccharose, Maiszellwände, Pektin, Zellulose, aber auch auf Vollmedien wie OMA und PDA, ein erheblicher Wachstumsdefekt (Mickel, 2010). Außerdem konnte eine erhebliche Beeinträchtigung des Sporulationsvermögens sowie signifikant kleinere Konidien festgestellt werden (Abb. 20 D-G). Damit Phänotypen auf ein Deletionsereignis zurückzuführen sind, sind Komplementationsanalysen eine wichtige experimentelle Komponente im Rahmen der Charakterisierung von Deletionsmutanten. $\Delta hda2$ konnte durch ein Konstrukt (Abb. 20 A), bestehend aus dem *CgHDA2*-ORF unter Kontrolle der *CgHDA2*-Regulatorbereiche (Promotor, Terminator), genetisch komplementiert werden. Als Selektionsmarker diente die Nourseothricin-Resistenzkassette. Nach der Transformation des Konstrukts in $\Delta hda2$ -Protoplasten konnten auf nourseothricinhaltigem Selektionsmedium Kolonien gewonnen werden, die nach der Einzelsporisation zunächst mittels Southern-Analyse charakterisiert wurden (Abb. 20 B). Die 2055 bp große Hygromycin-Resistenzkassette von $\Delta hda2$ sollte durch den *CgHDA2*-ORF und die Nourseothricin-Resistenzkassette ersetzt werden. Für alle getesteten Isolate konnte eine homologe Integration des Komplementationskonstrukts im gewünschten Locus nachgewiesen werden. Sichtbar wurde dies durch eine Größenverschiebung des detektierten DNA-Fragments von 5,5 kb ($\Delta hda2$) auf 7,0 kb (Abb. 20 B). Diese Isolate wurden anschließend charakterisiert. Das Einbringen des WT-Gens in den $\Delta hda2$ -Stamm führte zum vollständigen Wiedererlangen des Wachstums- und des Sporulationsvermögens und auch das Längendefizit der Sporen wurde aufgehoben (Abb. 20 C-G). Außerdem führte die Komplementation zur Wiederherstellung des Infektionsvermögens, wie in Infektionsversuchen nachgewiesen werden konnte (Abb. 20 H). Diese Ergebnisse konnten durch qPCR-Analysen bestätigt werden (Abb. 20 I). Die Quantifizierung von Infektionsstrukturen zeigte zudem, dass der Penetrationsdefekt völlig aufgehoben wurde (Abb. 20 J).

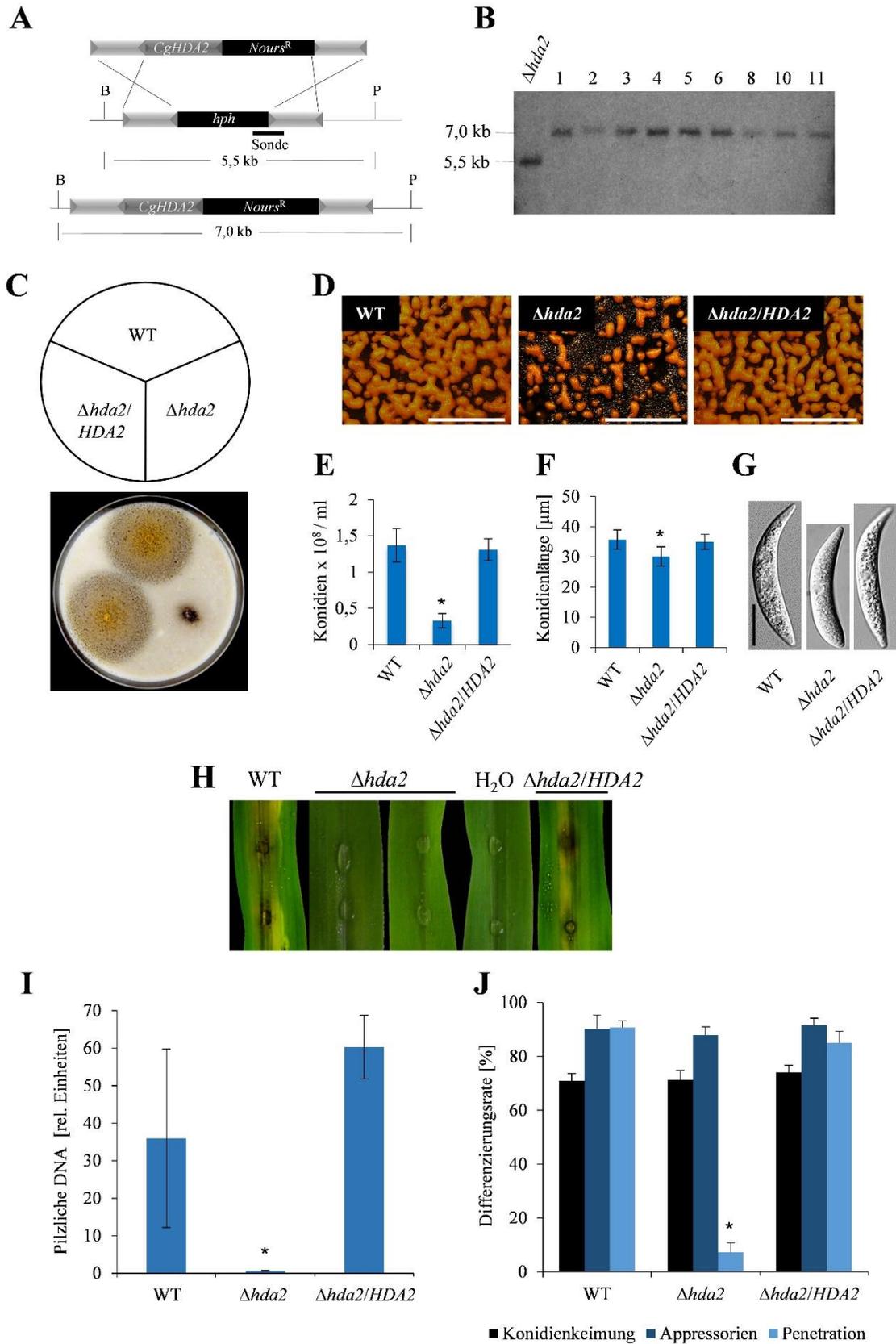


Abb. 20: *CgHDA2*-Charakterisierung und *Δhda2*-Komplementation.

- (A) $\Delta hda2$ -Komplementationsstrategie. *hph* = Hygromycin-Resistenzkassette (inkl. *gpdA*-Promotor), *NourseR* = Nourseothricin-Resistenzkassette (*oliC*-Promotor, *nat1*, *tub1*-Terminator).
- (B) Southern-Analyse. Die Restriktion der genomischen DNA wurde mit *Bsu36I* = B und *PsiI* = P durchgeführt. Die Spuren bezeichnen unabhängige Isolate.
- (C) Vegetatives Wachstum auf OMA. Der Wachstumsversuch zeigt fünf Tage alte Kulturen.
- (D) Acervulidifferenzierung. Detailaufnahmen aus dem Zentrum 14 Tage alter Kulturen von Wildtyp und $\Delta hda2$ - bzw. $\Delta hda2/HDA2$ -Stamm auf Haferflockenagar. Maßstab = 4 mm.
- (E) Sporulationsversuch. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat, dem $\Delta hda2$ -Stamm und dem komplementierten Isolat $\Delta hda2/HDA2$ sind mit einem * gekennzeichnet (n = 8, T-Test, p < 0,05).
- (F) Konidienlänge von Wildtyp und $\Delta hda2$ oder dem komplementierten Isolat $\Delta hda2/HDA2$. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und $\Delta hda2$ oder dem komplementierten Isolat $\Delta hda2/HDA2$ sind mit einem * gekennzeichnet (n = 90, Mann-Whitney Rank Sum Test, p < 0,05).
- (G) Konidienmorphologie von Wildtyp und $\Delta hda2$ - bzw. $\Delta hda2/HDA2$ -Stamm. Die Konidien wurden von 14 d alten OMA-Kulturen gewonnen. Maßstab = 10 μ m.
- (H) Inokulation intakter Maisblätter (Golden Jubilee) mit Konidien des Wildtyps (WT), des $\Delta hda2$ -Stammes oder dem komplementierten Isolat $\Delta hda2/HDA2$. Die Bonitur erfolgte 5 dpi.
- (I) Bestimmung der pilzlichen Biomasse in intakten Maisblättern (Golden Jubilee) mittels qPCR. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat dem $\Delta hda2$ -Stamm oder dem komplementierten Isolat $\Delta hda2/HDA2$ sind mit einem * gekennzeichnet (n = 3, T-Test, p < 0,05). Diese Daten wurden von Iris Gase generiert.
- (J) Quantifizierung von Infektionsstrukturen auf Mais (Golden Jubilee) 2 dpi. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und dem $\Delta hda2$ -Stamm oder dem komplementierten Isolat $\Delta hda2/HDA2$ sind mit einem * gekennzeichnet (n = 300, T-Test, p < 0,05).

Die von $\Delta hda2$ -Stämmen differenzierten Appressorien wiesen erhebliche funktionelle Defizite auf. Weniger als 10 % der von den $\Delta hda2$ -Stamm gebildeten Appressorien waren in der Lage, intakte Maisblätter zu penetrieren (Abb. 20 J). Um die beobachteten Penetrationsdefekte der $\Delta hda2$ -Isolate näher zu untersuchen, wurden zunächst die Papillenbildungsraten ermittelt und Penetrationsporen untersucht (Abb. 21 A und B). Eine vermehrte Papillenbildung konnte im Vergleich zum Wildtyp nicht festgestellt werden (Abb. 21 A) und auch die typischen Penetrationsporen wurden differenziert (Abb. 21 B). Weiterführend wurden Zytorrhizie-Experimente durchgeführt (Abb. 21 C und D). Diese sollten zeigen, ob das in den Appressorien der $\Delta hda2$ -Isolate aufgebaute osmotische Potential im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist. Kollabierte Appressorien waren durch die Ausbildung einer Falte von nicht kollabierten Appressorien zu unterscheiden (Abb. 21 D, Pfeile, vgl. WT und RNAi bei 0 bzw. 400 g/l PEG6000). Fünfzig Prozent der Wildtyp- bzw. $\Delta hda2$ -Appressorien kollabierten in einer PEG6000-Lösung von 350 g/l, was nach Money (1989) einem osmotischen Potential von ca. 2,6 MPa entspricht.

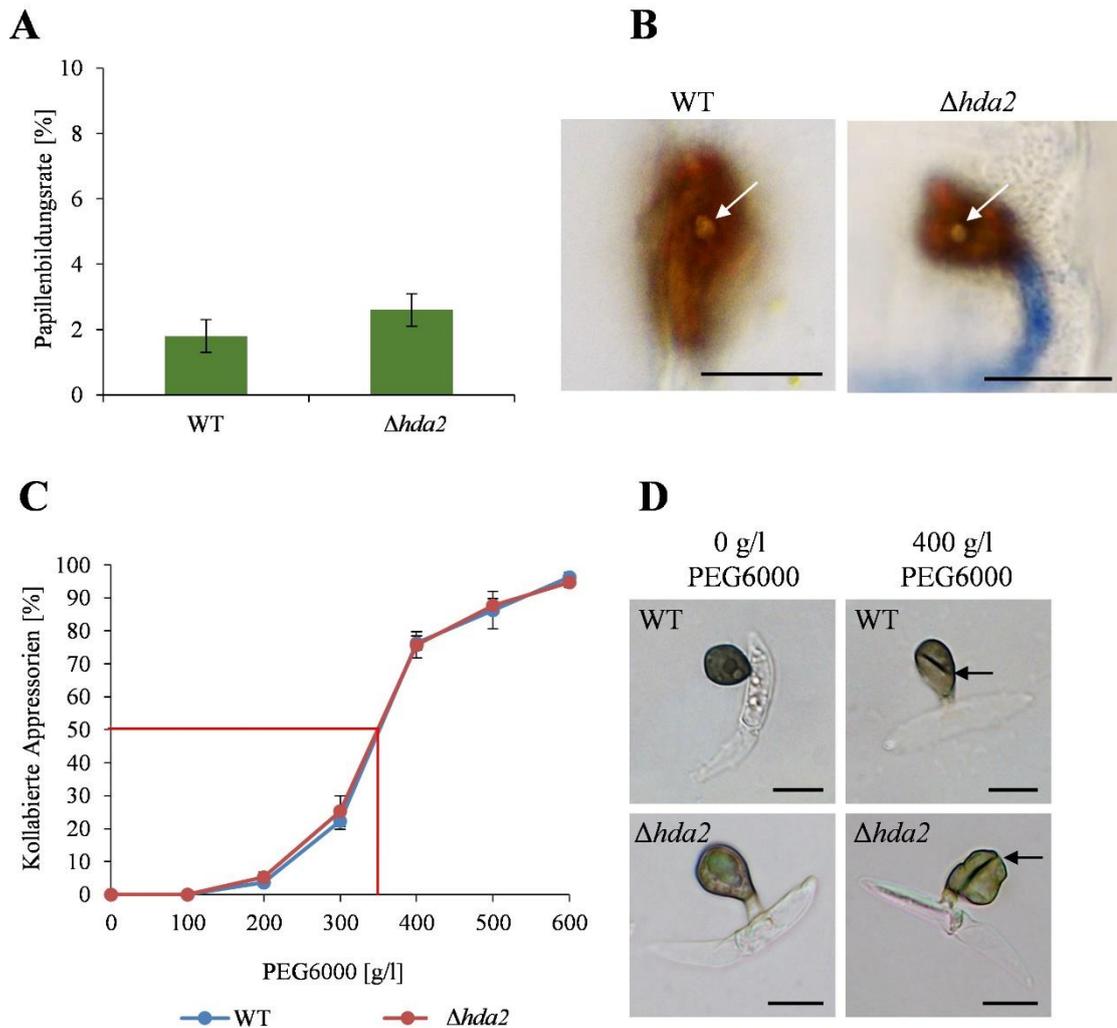


Abb. 21: Papillenbildung von Maisblättern und Appressorienfunktionalität von $\Delta hda2$ -Stämmen.

- (A) Papillenbildung von Maisblättern (Golden Jubilee) nach 48 h, die mit dem Wildtyp (WT) und $\Delta hda2$ -Stamm inokuliert wurden. Es wurden je 100 Appressorien von drei unabhängigen Infektionsstellen auf darunter gebildete Papillen untersucht und der prozentuale Anteil Papillen bestimmt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten ermittelt werden ($n = 300$, T-Test, $p > 0,05$).
- (B) Penetrationssporen von Wildtyp und $\Delta hda2$ -Stamm 2 dpi. Pfeile weisen auf Penetrationssporen. Keimschläuche sind Anilinblau gefärbt. Maßstab = 10 μm .
- (C) Prozentuale Anzahl kollabierter Appressorien des Wildtyps und des $\Delta hda2$ -Stamms auf Petrischalen in PEG6000-Konzentrationen von 0-600 g/l. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Isolaten ermittelt werden ($n = 300$, T-Test, $p > 0,05$).
- (D) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Appressorien auf Petrischalen ohne und nach Zugabe von 400 g/l PEG6000. Pfeile weisen auf kollabierte Appressorien. Maßstab = 10 μm .

III.4 Charakterisierung von *CgHDA3* und *CgHDA4*

III.4.1 Deletionsmutagenese und morphologische Charakterisierung

Für die Gewinnung von *CgHDA3*- bzw. *CgHDA4*-Deletionsstämmen wurden Deletionskonstrukte generiert und in Protoplasten des Wildtyp-Isolats transformiert. Anschließend erfolgte die Einzelsporisolation auf hygromycinhaltigem Selektionsmedium. Die erhaltenen Transformanten wurden in Southern Blot-Analysen charakterisiert (Abb. 22). Der gesamte ORF von *CgHDA3* bzw. *CgHDA4* sollte bei einer erfolgreichen Deletion durch die 2055 bp große Hygromycin-Resistenzkassette (*hph*) ersetzt werden (Abb. 22 A). Das Ergebnis der Southern-Analyse zeigte, dass für *CgHDA3* (Isolate 3, 6, 27) und *CgHDA4* (Isolate 7, 15, 30) jeweils drei Deletionsstämme erhalten wurden (Abb. 22 B, D). Für die Generierung eines Doppeldeletionsstammes ($\Delta hda3/\Delta hda4$) wurde eine *HDA3*-Deletionskassette mit Nourseothricin-Resistenzkassette assembliert und in $\Delta hda4$ -Protoplasten transformiert. Durch die Southern-Analyse konnte ein Isolat mit einer Doppeldeletion bestätigt werden (Abb. 22 F, Isolat 4).

Die weitere Charakterisierung der Deletionsmutanten erfolgte mittels Wachstums- und Sporulationsversuchen (Abb. 23). Der Wachstumsversuch zeigte, dass $\Delta hda3$ -Stämme durch ein reduziertes vegetatives Wachstum charakterisiert sind, während sich das der $\Delta hda4$ -Stämme nicht vom Wildtyp unterschied (Abb. 23 A und B). Zusätzlich erschienen $\Delta hda3$ -Stämme stärker pigmentiert im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 23 A). Auch im Sporulationsversuch bildeten $\Delta hda3$ -Isolate signifikant weniger Sporen als der Wildtyp, während die Deletion von *CgHDA4* keine Sporulationsdefizite verursachte (vgl. Abb. 23 C und D). Der $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstamm zeigte in beiden Versuchen die Charakteristika des $\Delta hda3$ -Stammes (Abb. 23 A-D, vgl. Wildtyp mit Deletions- bzw. Doppeldeletionsstamm). Ferner zeigten die Sporen der Δhda -Stämme im Vergleich zum Wildtyp keine morphologischen Unterschiede bezüglich Sporenlänge oder Morphologie (Abb. 23 E und F).

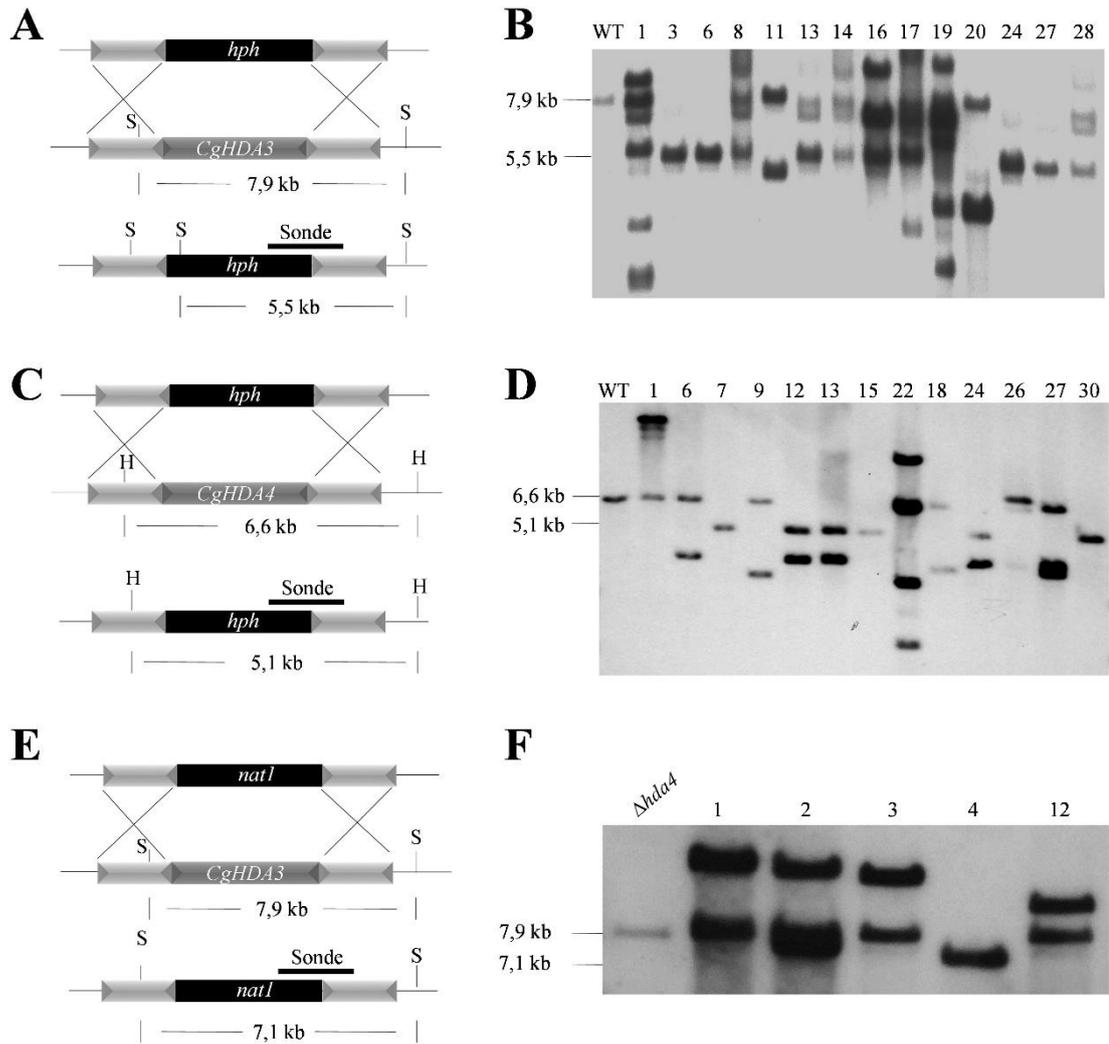


Abb. 22: Generierung von $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes.

Southern-Analysen (B), (D) und (F). Die Restriktion der genomischen DNA wurden mit S = *SacI* (A) und (E), H = *HindIII* (C) durchgeführt. Die Spuren in (B), (D) und (F) bezeichnen unabhängige Isolate. *hph* = Hygromycin-Resistenzkassette (*gpdA*-Promotor und *hph*), *nat1* = Nourseothricin-Resistenzkassette (*oliC*-Promotor und *nat1*).

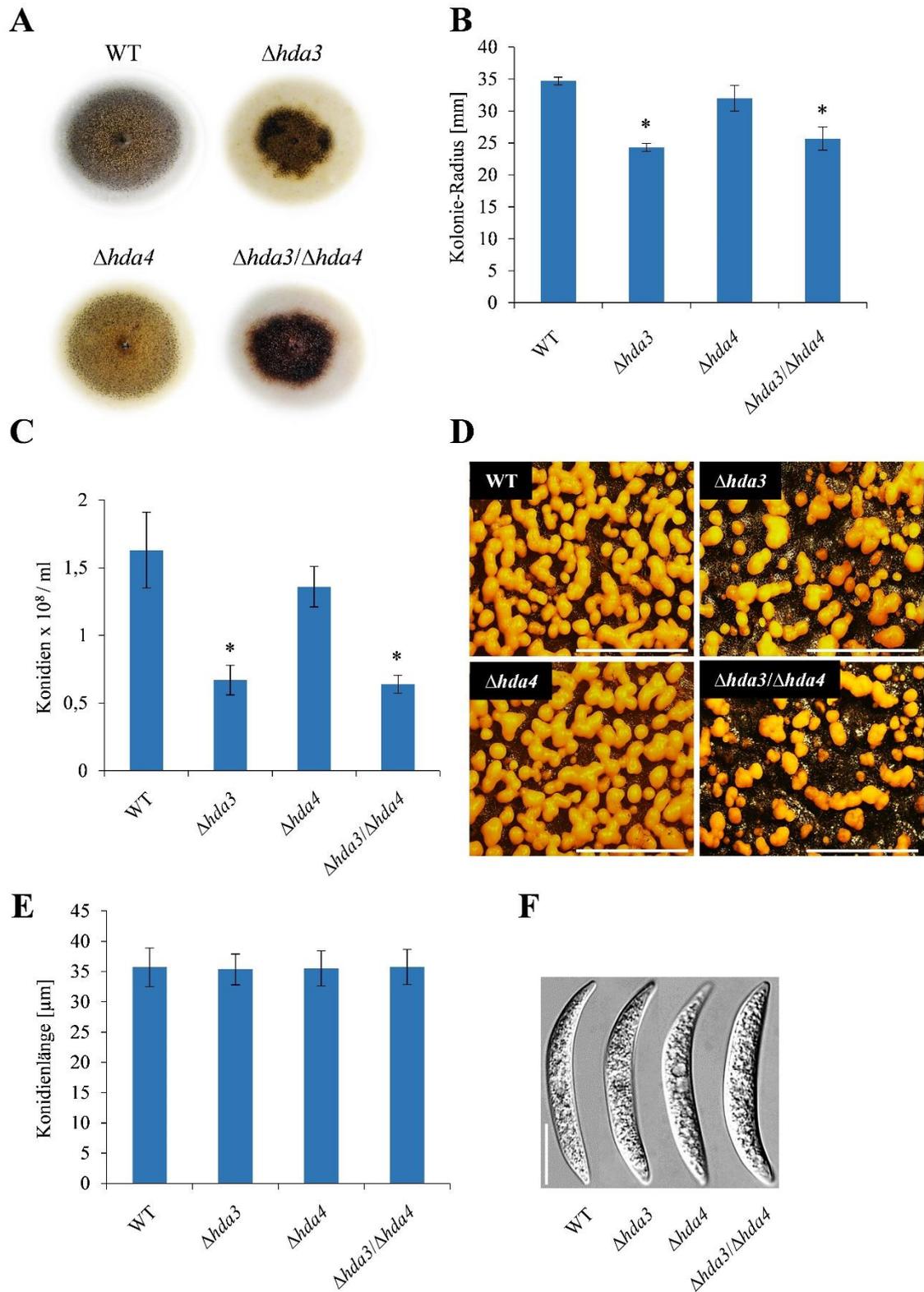


Abb. 23: Charakterisierung von $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes.

- (A) Koloniemorphologie von Wildtyp (WT), $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstamm sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes. Die Stämme wurden neun Tage nach Inokulation fotografiert.
- (B) Quantifizierung des radialen Wachstums. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten der Kolonieradien nach neun Tagen mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und Δhda -Sämlingen sind mit einem * gekennzeichnet (n = 3, T-Test, p < 0,05).
- (C) Sporulationsversuch von Wildtyp und Δhda -Sämlingen. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstamm sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes sind mit einem * gekennzeichnet (n = 8, T-Test, p < 0,05).
- (D) Acervulidifferenzierung. Detailaufnahmen aus dem Zentrum 14 Tage alter Kulturen von WT und $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstamm sowie des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes auf Haferflockenagar. Maßstab = 4 mm.
- (E) Konidienlänge von Wildtyp und Δhda -Sämlingen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Isolat und Δhda -Sämlingen festgestellt (n = 90, Mann-Whitney Rank Sum Test, p > 0,05).
- (F) Konidienmorphologie von Wildtyp und Δhda -Sämlingen. Die Konidien wurden von 14 d alten OMA-Kulturen gewonnen. Maßstab = 10 μ m.

III.4.2 Infektionsversuche

Um den Beitrag der Histoneacetylase 3 und 4 an Virulenz oder Pathogenität zu ermitteln, wurden Infektionsversuche durchgeführt (Abb. 24 A). Die makroskopische Bonitur der mit $\Delta hda3$ - oder $\Delta hda4$ - bzw. $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Konidien inokulierten Maisblätter konnte keinen Unterschied zum Wildtypisolat (WT) nachweisen. Zusätzlich zu den Deletionsstämmen wurde als Kontrolle ein Isolat mit ektopischer Integration der Deletionskassette mitgeführt. Im Vergleich zu den Deletionsstämmen weisen diese Isolate jeweils ein intaktes *CgHDA3*- bzw. *CgHDA4*-Gen auf. Wie erwartet, verursachten diese Isolate die typischen Anthraknose-Läsionen (Abb. 24 A, Ekt.). Damit sollte ausgeschlossen werden, dass Virulenz- bzw. Pathogenitätsdefekte auf die Anwesenheit der Resistenzkassette allein zurückgeführt werden. qPCR-Analysen bestätigten zudem, dass sich die von dem $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ - bzw. dem $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Stamm gebildete pilzliche Biomasse im Vergleich zum Wildtyp quantitativ nicht unterschied (Abb. 24 B).

Weiterführend schlossen sich mikroskopische Untersuchungen des Infektionsverlaufs an. Diese Ergebnisse zeigten, dass sich die von den Deletionsstämmen gebildeten Infektionsstrukturen morphologisch nicht von denen des Wildtyps unterschieden (Abb. 24 C). Ferner konnten weder in der zeitlichen noch in der quantitativen Differenzierung von Infektionsstrukturen Unterschiede festgestellt werden (Anhang X. Abb. 45).

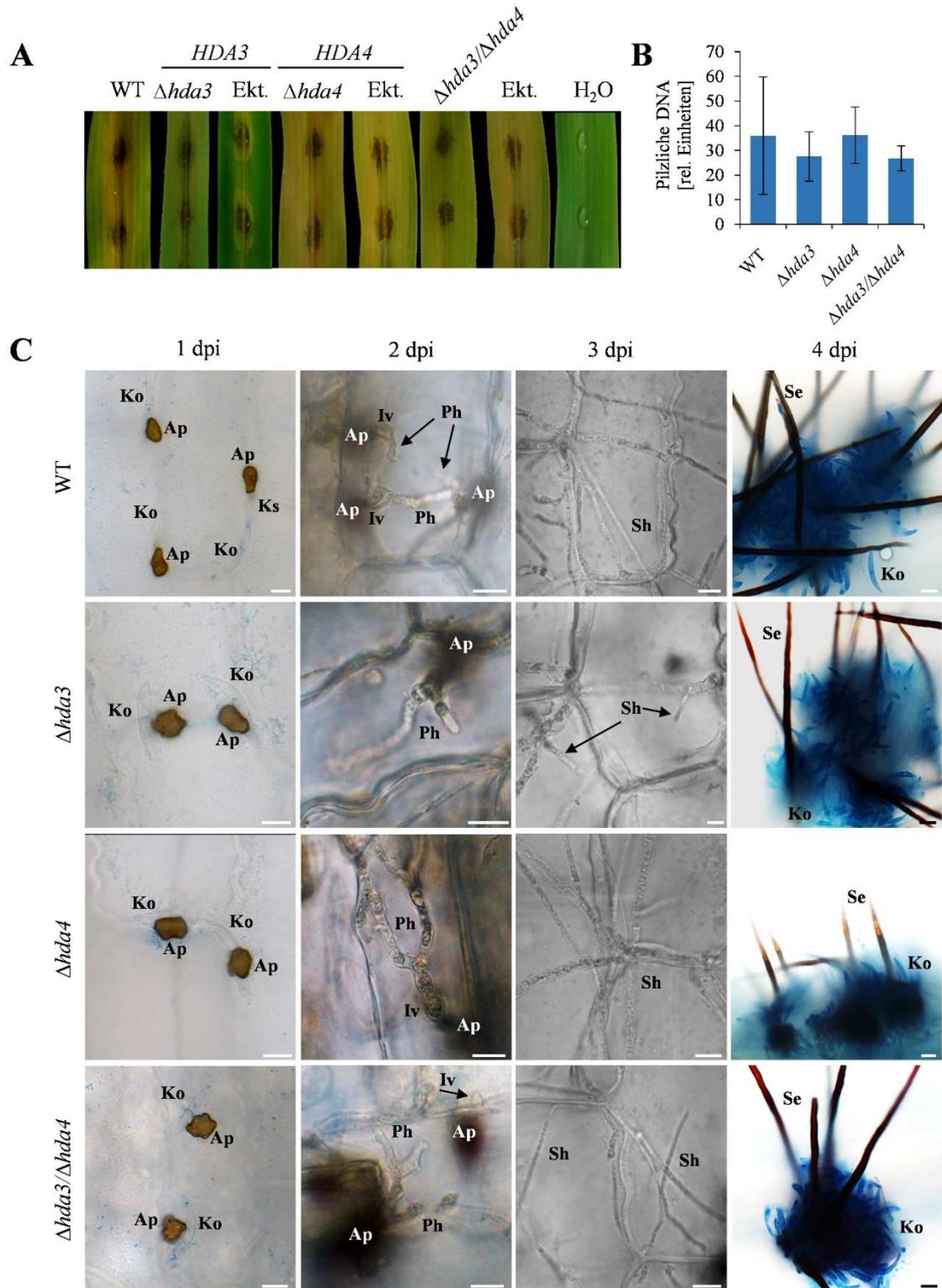


Abb. 24: Die Bedeutung von *CgHDA3* und *CgHDA4* für die Infektion von Mais durch *C. graminicola*.

- (A) Infektionsversuche auf Maisblättern (Golden Jubilee) mit Wildtyp (WT) und den $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie dem $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstamm bzw. mit Isolaten mit ektopischer Integration der Resistenzkassette (Ekt.) 5 dpi.
- (B) Bestimmung der pilzlichen Biomasse in intakten Maisblättern (Golden Jubilee) mittels qPCR. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichung. Es konnten keine signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und den $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie dem $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstamm ermittelt werden ($n = 3$, T-Test, $p > 0,05$). Diese Daten wurden von Iris Gase generiert.
- (C) Mikroskopische Analyse des Infektionsverlaufs. Maisblätter wurden mit 10- μ l-Tropfen einer 10^5 Konidiensuspension inokuliert und täglich mikroskopiert. Anilinblau gefärbt. Maßstab = 10 μ m. Ko = Konidie, Ks = Keimschlauch, Ap = Appressorium, Iv = Infektionsvesikel, Ph = Primärhypselle, Sh = Sekundärhypselle, Se = Seta.

III.5 Vergleichende Charakterisierung

III.5.1 Lokalisation von Histondeacetylasen

Wichtige Aspekte der funktionellen Charakterisierung von Genen sind die Lokalisation der Genprodukte sowie die Analyse der Genexpression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Mittels einer *eGFP*-Fusion sollten die in *C. graminicola* identifizierten Histondeacetylasen HDA1, HDA2, HDA3 und HDA4 lokalisiert werden. Die *eGFP*-Konstrukte wurden wie unter II.6. beschrieben generiert und in Protoplasten des *Colletotrichum graminicola*-Wildtypisolats M2 transformiert. Anschließend erfolgten die Gewinnung von Einzelsporisolaten und deren Charakterisierung durch Southern-Analyse (detaillierte Darstellungen zur *eGFP*-Fusionsstrategie sowie Southern Blots finden sich im Anhang XI. Abb. 46). Der HDA2:eGFP-Stamm wurde bereits in einer eigenen vorhergehenden Arbeit generiert (Mickel, 2010). Alle eGFP-Stämme wurden zunächst detailliert charakterisiert (Abb. 25).

Die eingehende Charakterisierung der eGFP-Stämme zeigte, dass diese im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede hinsichtlich Infektionsvermögen, Wachstum und Sporulation aufweisen und somit davon ausgegangen werden kann, dass die Funktion der Proteine durch den eGFP-tag nicht beeinträchtigt wurde (Abb. 25).

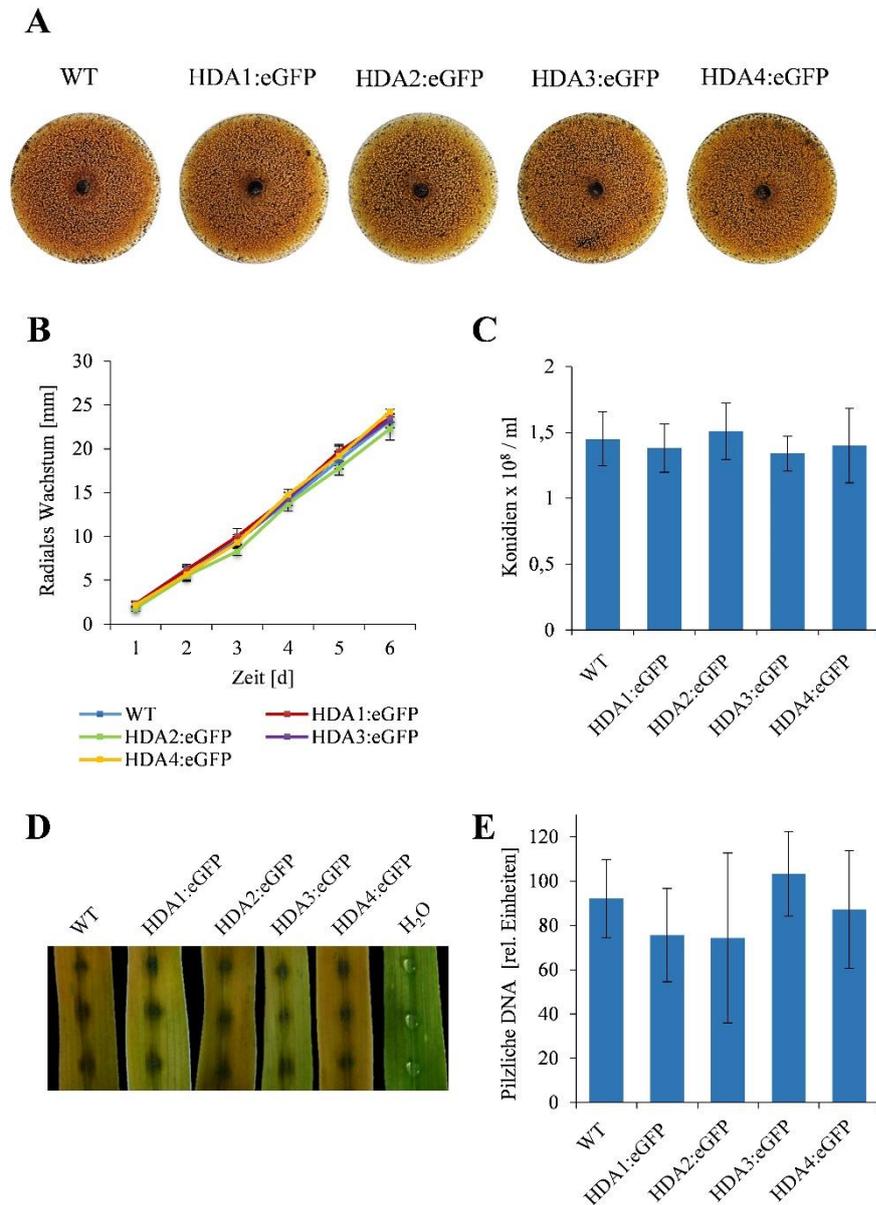


Abb. 25: Charakterisierung von eGFP-Reporterstämmen.

- (A) Vegetatives Wachstum auf OMA. Der Wachstumsversuch zeigt sieben Tage alte Kulturen.
- (B) Quantifizierung des radialen Wachstums auf Haferflockenagar. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Isolat und eGFP-Reporterstämmen ermittelt werden ($n = 3$, T-Test, $p > 0,05$).
- (C) Sporulationsversuch. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Isolat und eGFP-Reporterstämmen ermittelt werden ($n = 8$, T-Test, $p > 0,05$).
- (D) Pathogenitätstest. Die Inokulation intakter Maisblätter (Golden Jubilee) erfolgte mit Konidien des Wildtyps (WT) bzw. den eGFP-Stämmen. Die Bonitur erfolgte 5 dpi.
- (E) Bestimmung der pilzlichen Biomasse in intakten Maisblättern (Golden Jubilee) mittels qPCR. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen ermittelt werden ($n = 3$, T-Test, $p > 0,05$). Diese Daten wurden von Iris Gase generiert.

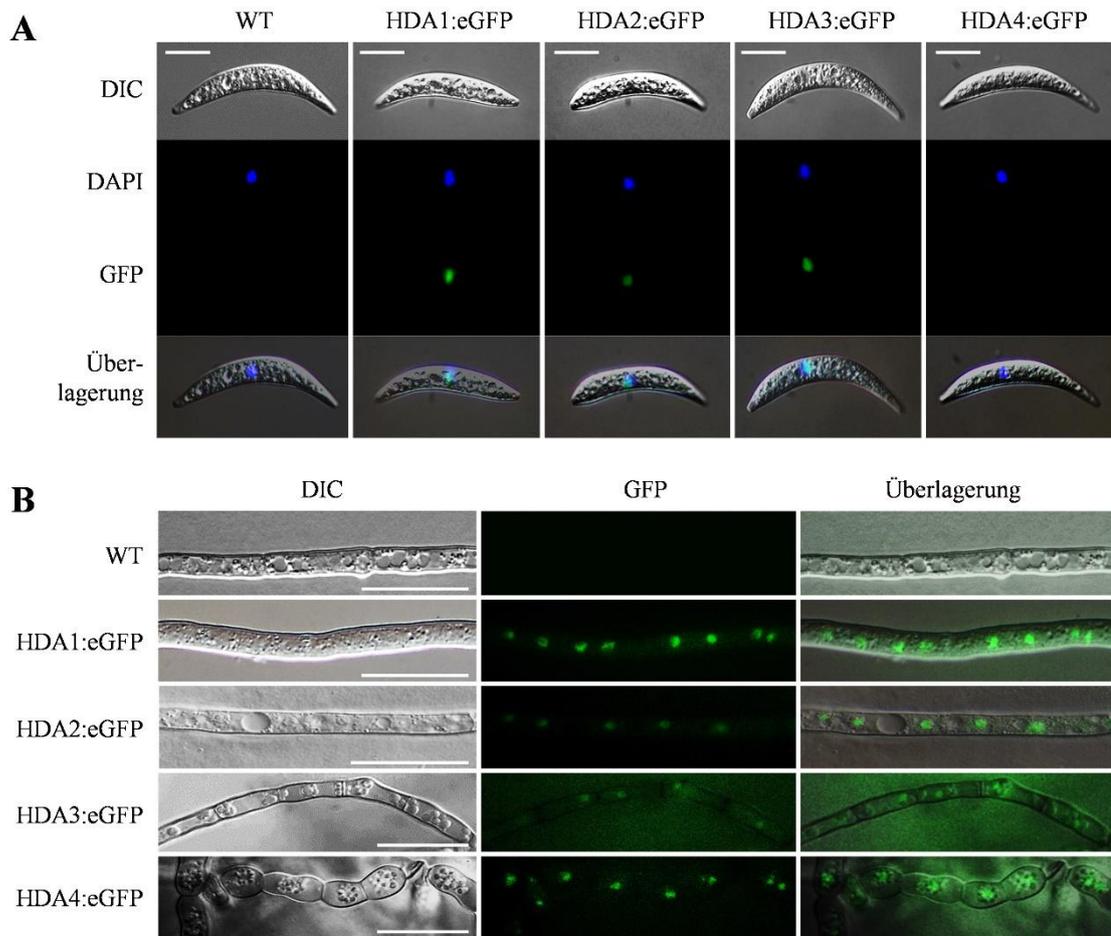


Abb. 26: Lokalisation von Histondeacetylasen.

(A) Lokalisation von Histondeacetylasen in acht Tage alten Konidien. Die Kernlokalisierung wurde mittels DAPI verifiziert. Maßstab = 10 μ m.

(B) Lokalisation von Histondeacetylasen in 12 Tage altem vegetativen Myzel. Maßstab = 20 μ m.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse von acht Tage alten asexuellen Sporen ergab eine deutliche GFP-Fluoreszenz im Zellkern von HDA1:eGFP-, HDA2:eGFP- und HDA3:eGFP-Konidien (Abb. 26 A). Im Zellkern von HDA4:eGFP-Konidien konnte hingegen keine Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 26 A, HDA4:eGFP). Die Kernlokalisierung wurde mittels DAPI-Färbung verifiziert (Abb. 26 A, DAPI). In den Zellkernen von vegetativer Hyphen hingegen konnte neben HDA1, HDA2 und HDA3 auch HDA4 detektiert werden (Abb. 26 B). Die Fluoreszenzsignale der GFP-Fusionsproteine von HDA2, HDA3 und HDA4 waren relativ schwach und nicht in allen Hyphen detektierbar.

In 12 Tage alten PDA-Kulturen konnte das GFP-Fusionsprotein der Histondeacetylase 3 in den Zellkernen vegetativer Hyphen detektiert werden (Abb. 27, HDA3:eGFP, Pfeil). Zusätzlich zur Kernlokalisierung von HDA3 in Konidien zeigten die mikroskopischen Analysen jedoch auch eine deutliche Fluoreszenz im Zytoplasma von Konidien (Abb. 27, Pfeilkopf). Auch die von HDA4:eGFP-Stämmen gebildeten Konidien wiesen entweder granuläre (Abb. 27, HDA4:eGFP, Pfeilkopf) oder eine gleichmäßige zytoplasmatische (Abb. 27, HDA4:eGFP, Pfeil), oft aber auch keine Fluoreszenz auf (Abb. 27 Sternchen).

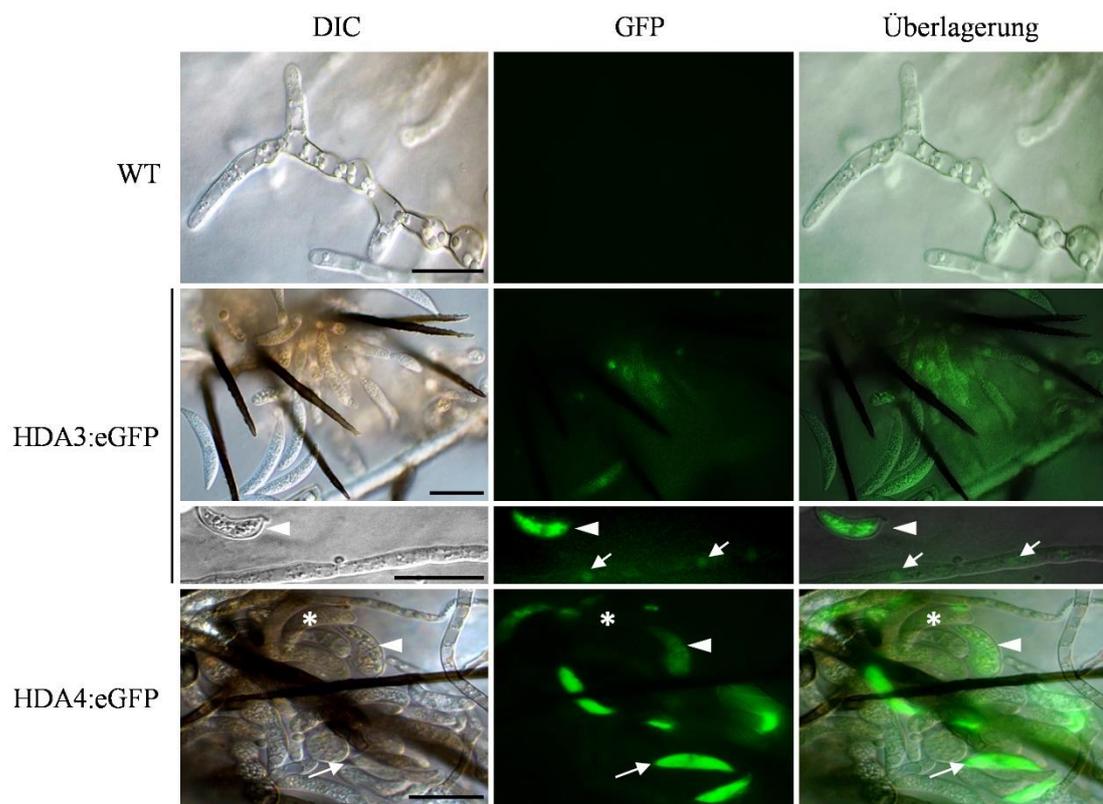


Abb. 27: Lokalisation von Histondeacetylase in vegetativen Hyphen von 12 Tage alten PDA-Kulturen.

Maßstab = 20 µm

Neben der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von asexuellen Konidien und vegetativem Myzel schlossen sich weiterführende Analysen an, um die eGFP-Reporterkonstrukte während des Infektionsverlaufs zu detektieren. Aus Abbildung 28 geht hervor, dass die HDA1:eGFP-Fluoreszenz zu allen Stadien der Pathogenese sichtbar war. Anhand dieser Ergebnisse und der Kernlokalisation kann die Anzahl der Nuklei in den Infektionsstrukturen nachverfolgt werden. Während in Konidien ein Kern detektiert werden konnte, befanden sich in den Appressorien zumeist zwei Kerne (Abb. 28, HDA1:eGFP, 1 dpi). Primäre und sekundäre Infektionshyphen erschienen hingegen als vielkernige Synzytien (Abb. 28, HDA1:eGFP, vgl. 1 dpi mit 2 und 3 dpi). Die räumliche Nähe der Nuklei in den biotrophen Hyphen könnte jedoch auch auf das Vorhandensein zweier Kerne pro Zelle hindeuten (Abb. 28, HDA1:eGFP, 2 dpi).

Das HDA2:eGFP-Reporterkonstrukt konnte im Zellkern von Konidien und relativ schwach in den Nuklei von Appressorien detektiert werden (Abb. 28, HDA2:eGFP, Pfeilköpfe bei 1 dpi). In biotrophen und nekrotrophen Hyphen konnte keine Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 28, HDA2:eGFP, 2 und 3 dpi).

Die HDA3:eGFP- bzw. HDA4:eGFP-Fusionsproteine konnten 1-3 dpi nicht detektiert werden (Abb. 28, HDA3:eGFP und HDA4:eGFP, 1, 2 und 3 dpi). Hinsichtlich HDA3:eGFP konnte festgestellt werden, dass die Fluoreszenz in den Konidien verschwand, sobald ein Appressorium differenziert wurde (vgl. HDA3:eGFP in Abb. 26 mit HDA3:eGFP in Abb. 28, 1 dpi). Der asexuelle Entwicklungszyklus endet mit der Bildung neuer Konidien, die innerhalb des Acervulus abgeschnürt werden. Während Reporterstämmen, die das HDA3:eGFP-Konstrukt exprimieren, eine schwache aber sichtbare Fluoreszenz in den Zellkernen neu differenzierter Sporen zeigten, wiesen HDA4:eGFP-Stämme eine deutliche zytoplasmatische Fluoreszenz auf (Abb. 29, vgl. HDA3:eGFP, Pfeile, mit HDA4:eGFP, Pfeilköpfe). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass HDA4 weitere Funktionen außerhalb des Nukleus wahrnimmt.

Die Ergebnisse zur stadienspezifischen Expression der eGFP-Reporterkonstrukte werden unterstützt durch RNA-Seq-Analysen der Histondeacetylase-Gene während des Infektionsverlaufs (Anhang XII. Abb. 47).

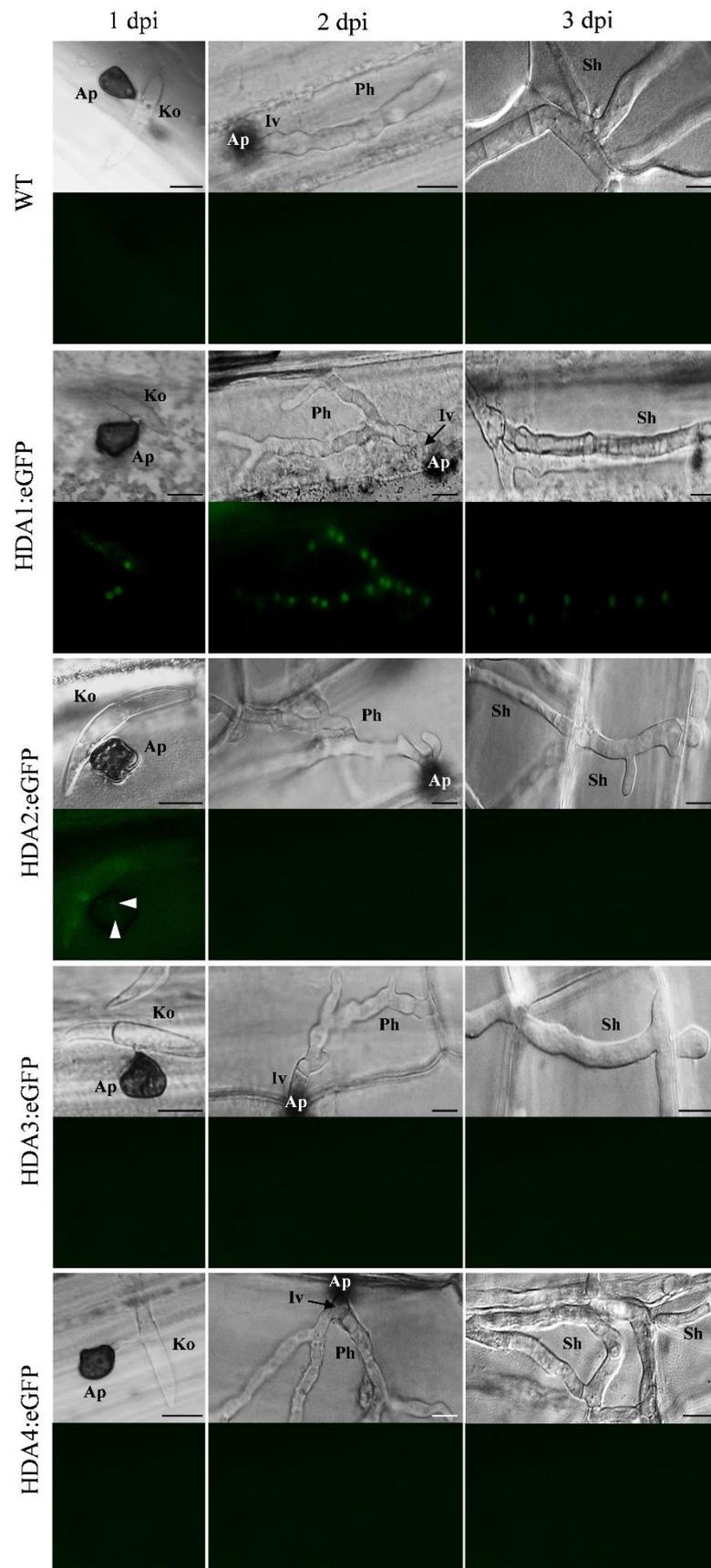


Abb. 28: Lokalisation von Histondeacetylase während der Infektion von Mais (Golden Jubilee).

Ko = Konidie, Ap = Appressorium, Iv = Infektionsvesikel, Ph = Primärhypha, Sh = Sekundärhypha. Maßstab = 10 µm.

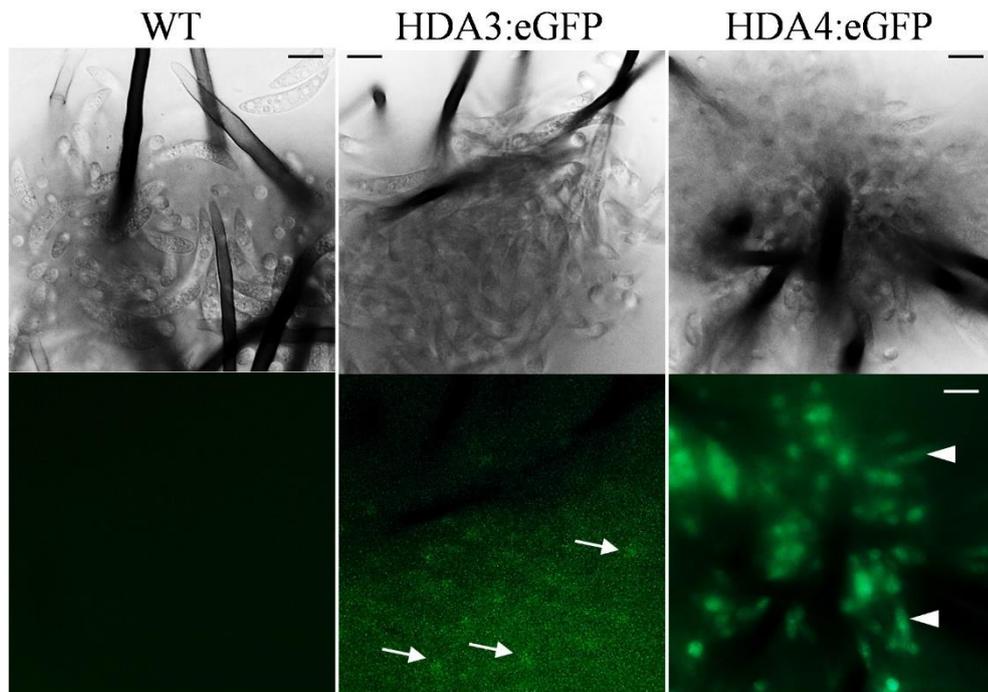


Abb. 29: Lokalisation von HDA3:eGFP und HDA4:eGFP während der Infektion von Mais (Golden Jubilee) vier Tage nach Inokulation.

Ko = Konidie, Se = Seta. Maßstab = 10 μ m.

III.5.2 Metabolitanalyse

In Pilzen konnte gezeigt werden, dass der Grad der Histonacetylierung für die transkriptionelle Regulierung von verschiedenen Prozessen, wie z. B. Sekundärmetabolismus, eine wesentliche Rolle spielt (Cichewicz, 2009; Nützmann *et al.*, 2011; Soukup *et al.*, 2012; Studt *et al.*, 2013). Für *C. graminicola* sollte daher überprüft werden, ob die Deletion von Histondeacetylase-Genen zu einem veränderten Auftreten der bisher identifizierten *in vitro* gebildeten Sekundärmetabolite führt (Horbach *et al.*, 2009).

Die HPLC-Elutionsprofile von Extrakten, die aus dem Überstand von Flüssigkulturen des Wildtypisolats und des *HDA1* RNAi-11 Isolats bzw. der Histondeacetylase-Deletionsmutanten gewonnen wurden, weisen z. T. deutliche Unterschiede auf (Abb. 30). In Extrakten des *HDA1* RNAi-11 Isolats konnten die Sekundärmetabolite Colletioanthron A, Himanimid C, Colletopyron C und Colletochinon B nachgewiesen werden, jedoch zeigten sich im Vergleich zum WT Unterschiede in der Menge der gebildeten Substanzen (Abb. 30, vgl. WT und *HDA1* RNAi-11). Die unbekannte Substanz mit einer Retentionszeit von ca. 15 min konnte bei dem *HDA1* RNAi-11-Isolat nicht nachgewiesen werden, dafür zeigten sich zwei zusätzliche distinkte Peaks bei Minute 16,5 und 21,5 (Pfeile).

Extrakte der $\Delta hda2$ -Flüssigkultur enthielten eine wesentlich geringere Anzahl unterschiedlicher Substanzen als Extrakte aus WT-Kulturen (Abb. 30, vgl. WT und $\Delta hda2$). Alleinig Himanimid C konnte unter den bekannten Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden. In Extrakten der $\Delta hda3$ -Flüssigkultur konnte vermehrt Himanimid C detektiert werden. Außerdem traten ca. bei Minute 19 und 19,5 zwei weitere unbekannte Substanzen auf (Abb. 30, vgl. WT und $\Delta hda3$, Pfeil). Das Elutionsprofil des $\Delta hda4$ -Extrakts unterschied sich hingegen nur geringfügig von dem des Wildtypisolats (Abb. 30, vgl. WT und $\Delta hda4$).

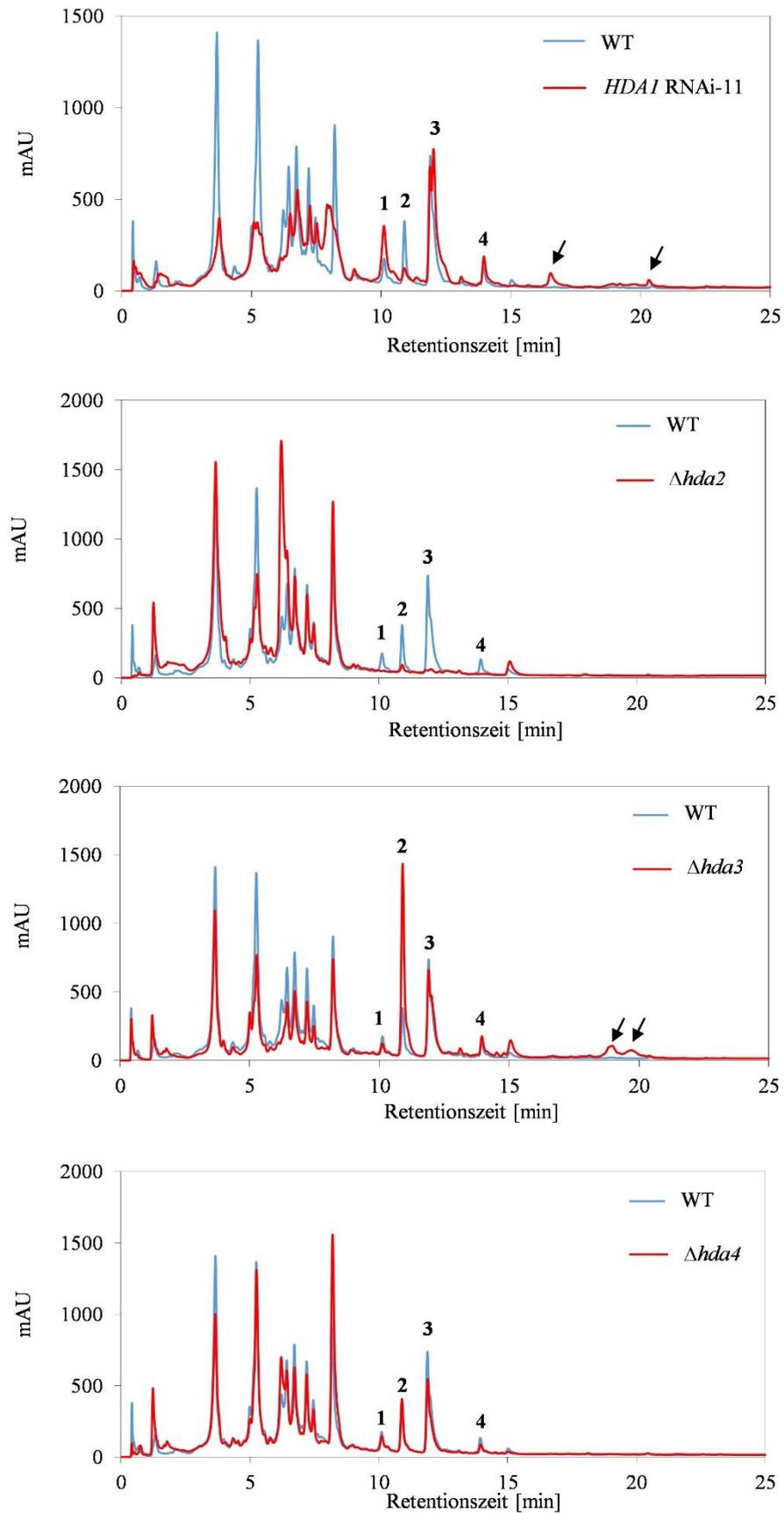


Abb. 30: HPLC-Elutionsprofile von Extrakten aus WT-, *HDA1* RNAi-11-, $\Delta hda2$ -, $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -HMG-Kulturüberständen.

Colletoanthon A (1), Himanimid C (2), Colletoanthon C (3), Colletochinon B (4).

III.5.3 RNA-Seq-Analyse von *in vitro*-Kulturen

Als globale Regulatoren sind Histondeacetylasen an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Die Datenlage zeigte bisher, dass Histondeacetylasen z. B. in Wachstumsprozesse, Sporulation, Infektionsvermögen und in die Bildung von Sekundärmetaboliten (siehe III.5.2) involviert sind. Damit diejenigen Gene gefunden werden können, welche durch Histondeacetylasen direkt oder indirekt reguliert werden, schlossen sich transkriptomweite RNA-Seq-Analysen von vegetativen Hyphen an (Abb. 31). Diese sollten zunächst einen Hinweis darauf liefern, welche Gene der sieben untersuchten Kategorien wie z. B. Sekundärmetabolit-Cluster, sekretierte Proteasen, Transporter, Transkriptionsfaktoren, Effektoren, Cytochrom-P450-Familie oder Carbohydrate Active Enzymes (CAZ)-Familie in den Deletionsstämmen $\Delta hda2$, $\Delta hda3$ und $\Delta hda4$ jeweils im Vergleich zum Wildtyp dereguliert sind. Gene, die keiner Gruppe zugeordnet werden konnten, fielen in die Kategorie „ohne funktionelle Gruppe“; ferner wurden auch hypothetische Proteine angegeben.

Die RNA-Seq-Analyse von *in vitro*-Kulturen zeigte für das $\Delta hda2$ -Isolat, dass für fast alle funktionellen Gruppen, mit Ausnahme der hypothetischen Proteine und der Effektoren, die Anzahl der herunterregulierten Gene die der hochregulierten Gene deutlich übersteigt (Abb. 31 A). Es ist eine beträchtliche Anzahl von Genen, die den funktionellen Gruppen Sekundärmetabolit-Cluster, Transporter, Cytochrom-P450-Familie oder der CAZ-Familie zugehörig sind, herabreguliert. Für das $\Delta hda3$ -Isolat zeigen die Daten, dass für die meisten funktionellen Gruppen die Anzahl der hochregulierten Gene die der herunterregulierten Gene übersteigt. Bei den Sekundärmetabolit-Clustern und der Cytochrom-P450-Familie ist eine größere Anzahl dieser Gene herunterreguliert (Abb. 31 B). Die Expressionsdaten des $\Delta hda4$ -Isolats zeigen, dass für alle funktionellen Gruppen die Anzahl der hochregulierten Gene jene der herunterregulierten Gene deutlich übersteigt (Abb. 31 C). Weiterhin wird beim Vergleich der Daten ersichtlich, dass im Falle des $\Delta hda2$ -Isolats die wenigsten und im Fall des $\Delta hda4$ -Isolats die meisten Gene im Vergleich zum WT dereguliert sind (Abb. 31, vgl. A, B und C.) Die Anzahl der deregulierten Gene beträgt in $\Delta hda2$: 557, in $\Delta hda3$: 1928 und in $\Delta hda4$: 5337. Dieses Ergebnis zeigte auch, dass die überwiegende Anzahl der Gene in den Deletionsmutanten nicht dereguliert wurde.

Zum Zeitpunkt der RNA-Seq-Analyse lagen weder *HDA1* RNAi-Isolate noch der $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Stamm vor.

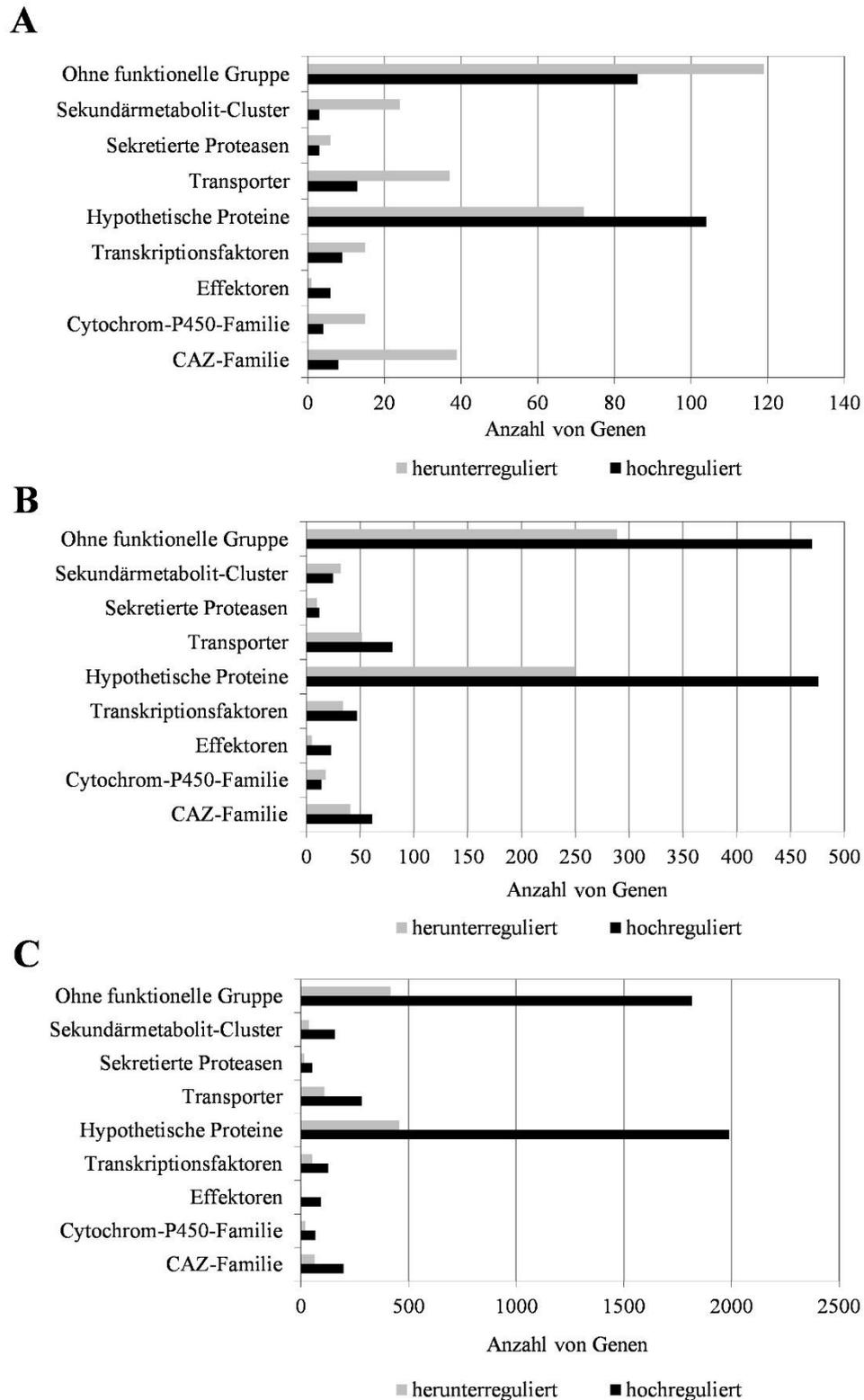


Abb. 31: RNA-Seq-Analyse von *in vitro*-Kulturen.

Gezeigt ist die Anzahl der im Vergleich zum Wildtyp signifikant deregulierten Gene (FDR < 0,05) in den Stämmen (A) $\Delta hda2$, (B) $\Delta hda3$ und (C) $\Delta hda4$ (\log_2 fold change > 0 hochreguliert, \log_2 fold change < 0 herunterreguliert). FDR = False Discovery Rate.

Bezugnehmend auf die Sekundärmetabolit-Cluster wurde eine Feinanalyse von Genen abgeschlossen, die innerhalb dieser Cluster liegen und an der Biosynthese, der Modifikation oder am Transport von Metaboliten beteiligt sind (Abb. 32 und Tab. 10). In Abbildung 32 sind zunächst die für $\Delta hda2$ -, $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -Stämme im Vergleich zum Wildtyp deregulierten Gene der Polyketidsynthesen (PKS), Nonribosomale Peptidsynthesen (NRPS) und PKS-NRPS-Hybride dargestellt. Die Daten zeigen deutlich, dass in $\Delta hda4$ -Stämmen die PKS-Gene in großer Zahl hochreguliert sind, während in $\Delta hda3$ -Isolaten eine geringere Anzahl der PKS-Gene hochreguliert vorliegt, aber auch ähnlich viele herunterreguliert sind. $\Delta hda2$ -Stämme weisen offenbar die wenigstens deregulierten Gene auf, von denen jedoch die Anzahl der herunterregulierten PKS-Gene der der hochregulierten übersteigt. Bezugnehmend auf das Metabolitprofil von $\Delta hda2$ -Stämmen konzentrierte sich die RNA-Seq-Analyse anschließend auf Metabolitcluster-Gene, die nur in $\Delta hda2$ -Stämmen herunterreguliert sind (Tab. 10). Die zum Teil starke Herabregulierung dieser Gene könnte das im Elutionsprofil nachgewiesene Fehlen von Sekundärmetaboliten erklären.

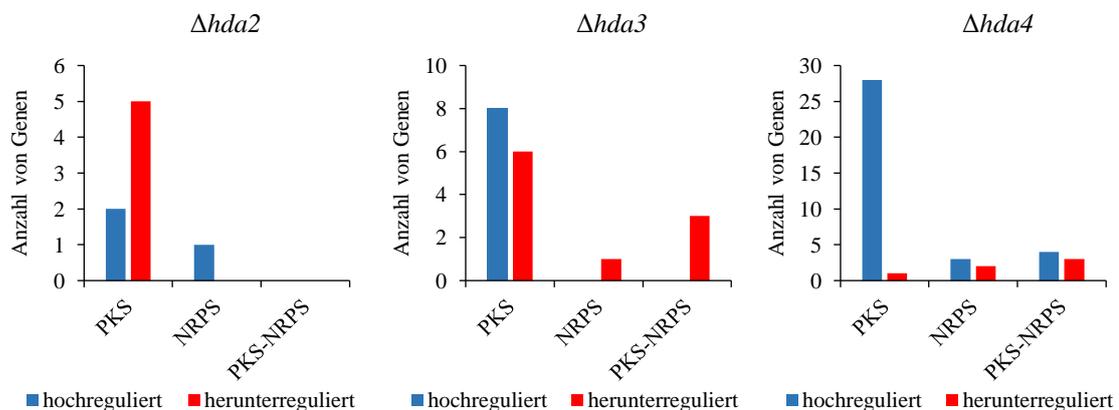


Abb. 32: RNA-Seq-Analyse von Genen, die für PKS, NRPS oder PKS-NRPS-Hybride kodieren.

Tab. 10: Gencluster mit reduzierten Transkriptabundanz in $\Delta hda2$

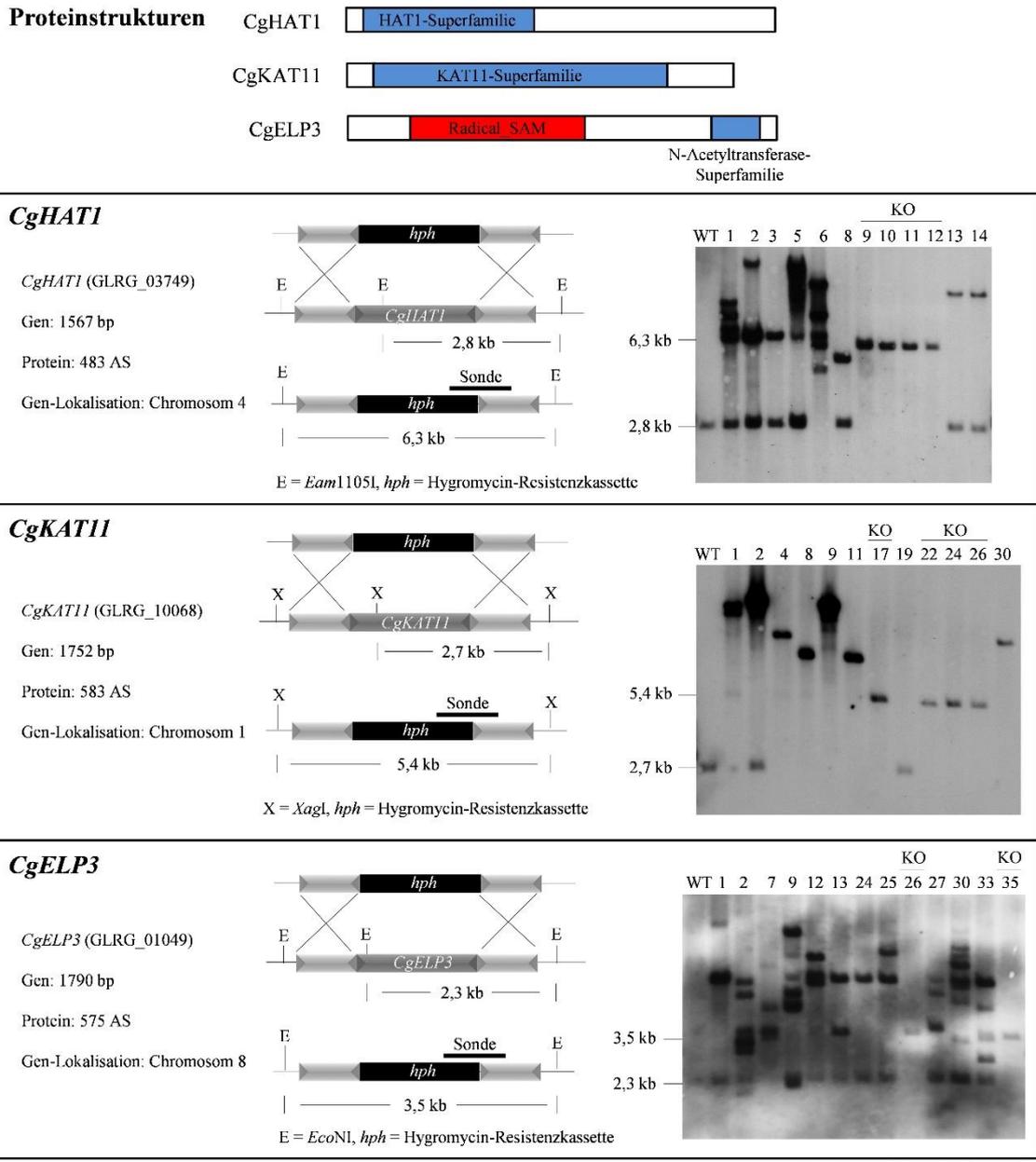
GLRG	logFC	Annotation (putative Funktion)
GLRG_07171	-3,0520	polyketide synthase
GLRG_07872	-7,7405	hypothetical protein
GLRG_07870	-2,5173	ferric reductase like transmembrane component
GLRG_08620	-3,3707	beta-ketoacyl synthase domain-containing protein
GLRG_10819	-3,5866	fungal specific transcription factor domain-containing protein
GLRG_11437	-7,8843	ABC transporter
GLRG_11774	-7,5380	trichothecene C-8 hydroxylase

FC = fold change

III.6 Beitrag ausgewählter Histonacetyltransferasen zur Infektion von Mais durch *C. graminicola*

Die erhobenen Daten zeigten bisher, dass Histondeacetylasen nicht nur an der Morphologie von fungalen Strukturen, sondern auch in Virulenz und/oder Pathogenität involviert sind. Daher war es auch von Interesse, den Beitrag von Histonacetyltransferasen (HATs) an der Symptomausprägung zu untersuchen.

Für die Histonacetyltransferase-Gene *CgHAT1*, *CgKAT11* und *CgELP3* wurden Deletionskonstrukte generiert und diese in Protoplasten des *C. graminicola*-Wildtypisolats transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels Southern Blot auf homologe Integration der Deletionskassette hin untersucht und mit bestätigten Deletionsstämmen Infektionsversuche durchgeführt (Abb. 33). Die Deletion keines dieser Gene zeigte einen Einfluss auf die Infektion von Mais, da alle KO-Stämme die typischen Anthraknose-Läsionen verursachten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass den Genen *CgHAT1*, *CgKAT11* und *CgELP3* keine Bedeutung für die Infektion von Mais durch *C. graminicola* zukommt.



Alle Skizzen nicht maßstabsgerecht.

Pathogenitätstest

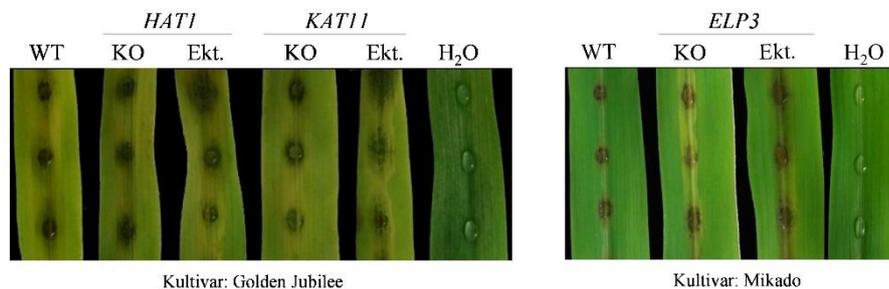


Abb. 33: Übersicht über deletierte Histonacetyltransferasen in *C. graminicola* mit Proteinstrukturen, Deletionsstrategie, Southern Blot und Pathogenitätstest (4 dpi).

IV. Diskussion

IV.1 *Colletotrichum graminicola* als Modellorganismus

Erreger der Gattung *Colletotrichum* verursachen an zahlreichen wirtschaftlich bedeutenden Nutzpflanzen Anthraknosesympptome, aber auch Frucht- und Stängelfäulen. Enorme Schäden entstehen durch *Colletotrichum*-Arten in tropischen und subtropischen Regionen und gefährden die Versorgung der lokalen Bevölkerung mit wichtigen Grundnahrungsmitteln wie Maniok, Hirse und Hülsenfrüchten. In den USA tritt *C. graminicola* eher in kontinental geprägten Klimata, wie dem Mittleren Westen, als Pathogen in Maisanbaugebieten auf. Aufgrund der Erschließung vielfältiger klimatischer Regionen durch das Pathogen und des breiten Wirtsspektrums sind Schaderreger der Gattung *Colletotrichum* weltweit von erheblicher ökonomischer Bedeutung.

Als Modellorganismus für Pathogene an Monokotyledonen eignet sich besonders *C. graminicola*. Dieser zeichnet sich durch eine kurze Generationsdauer, leichte Kultivierbarkeit auf Nährmedien und die Produktion großer Sporenmengen *in vitro* aus. Für epigenetische Untersuchungen, wie immunozytologische Färbungen, ist von Vorteil, dass *C. graminicola* im Gegensatz zu anderen Vertretern der Ascomycota wie *Neurospora crassa*, *Botrytis cinerea* oder *Saccharomyces cerevisiae* oder *Ustilago maydis* aus dem Phylum Basidiomycota bzw. *Rhizopus oryzae* aus dem Phylum Zygomycota und dem Oomyceten *Phytophthora infestans*, distinkte Chromozentren aufweist (Wiebke Kummer, persönliche Kommunikation). Durch immunozytologische Analysen der Interphasenkerne von *C. graminicola* konnten bislang 28 epigenetische Modifikationen (marks) auf deren Vorhandensein bzw. deren differentielle Verteilung im Eu- oder Heterochromatin untersucht werden (Wiebke Kummer, persönliche Kommunikation). Unter Verwendung eines H3K9me3-spezifischen Antikörpers gelang zudem eine Heterochromatinfärbung in pathogenen Hyphen (Andreas Fischer, persönliche Kommunikation). Diese Färbungen erlauben die epigenetische Indizierung von Euchromatin und Heterochromatin während der biotrophen und nekrotrophen Entwicklung von *C. graminicola* in der Wirtspflanze. Diese genannten Eigenschaften sowie die Zugänglichkeit für molekulargenetische Manipulationen machen *C. graminicola* zu einem Modellorganismus, an dem nicht nur Entwicklungs- und Infektionsprozesse während der Wirt-Parasit-Interaktion, Wirtsresistenz

und Signaltransduktion, sondern auch epigenetische Mechanismen studiert werden können.

Das *C. graminicola*-Genom wurde vollständig sequenziert und die Sequenzen in der Datenbank des NCBI hinterlegt. Diese annotierten Sequenzdaten erleichtern *in silico*-Analysen und molekulargenetische Arbeiten erheblich. 2012 wurde der Datensatz durch Transkriptom-Analysen erweitert (O'Connell *et al.*, 2012).

IV.2 Identifizierung von Histondeacetylase-Genen in *Colletotrichum graminicola*

Unter Verwendung der HDAC-Proteinsequenzen von *Neurospora crassa* (HDA-1, HDA-2, HDA-3 und HDA-4) konnten mittels Sequenzvergleiche im *C. graminicola*-Genom vier Histondeacetylase-Gene identifiziert werden. Die Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen zeigte, dass diese in zwei phylogenetisch unterschiedliche Klassen fallen (Klasse I und Klasse II). Klasse I-HDACs zeigen eine enge Verwandtschaft zum transkriptionellen Regulator RPD3, während Klasse II-HDACs hohe Sequenzähnlichkeiten zu HDA1 aus Hefe (*S. cerevisiae*) aufweisen. HDA1 und HDA2 wurden als Klasse I- bzw. HDA3 und HDA4 als Klasse II-Histondeacetylasen in *C. graminicola* identifiziert. Jeweils zwei Klasse I- und zwei Klasse II-HDACs wurden auch in den Genomen anderer Ascomyceten gefunden, darunter *C. carbonum*, *N. crassa*, *F. graminearum*, *F. fujikuroi* und *M. oryzae* (Izawa *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Studt *et al.*, 2013). Interessanterweise beherbergen Genome von Basidiomyceten wie *Melampsora laricis*, *Puccinia graminis* oder *Ustilago maydis* eine größere Anzahl von Klasse I-HDACs (Jeon *et al.*, 2014), was auf Genduplikationsereignisse hindeutet. Basidiomyceten stellen die höchstentwickelte Gruppe der Pilze dar. Ernährungsweise und Entwicklungszyklus bzw. der Übergang von der nichtpathogenen zur pathogenen Phase könnten durch eine Reorganisation des Chromatins begleitet werden, die die Aktivität mehrerer Histondeacetylasen erfordern könnte.

Die in den Proteinsequenzen der HDAC von *C. graminicola* vorhergesagten Kernlokalisations-signale weisen zunächst auf deren nukleäre Lokalisation. Die Kernlokalisierung von CgHDA1, CgHDA2 und CgHDA3 konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie in Sporen und vegetativen Myzel bestätigt werden kann; für CgHDA4 nur im vegetativen Myzel. Für die Histondeacetylasen CgHDA3 und CgHDA4 konnte zudem ein NES (nuclear export signal) in den Aminosäuresequenzen identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass

diese Proteine nicht nur im Zellkern, sondern auch im Zytoplasma Funktionen innehaben (nukleoplasmatisches Shutteling) (de Ruijter *et al.*, 2003). Die Fluoreszenzmikroskopischen Analysen lieferten für CgHDA3 kein eindeutiges Ergebnis, ob eine zytoplasmatische Lokalisation möglich ist. Der bioinformatische cutoff zur NES-Vorhersage könnte zu niedrig gewählt worden sein, weshalb es zu einer falsch-positiven Vorhersage kam, oder die Genexpression ist variabel (stadienspezifisch) und der Expressionszeitpunkt wurde während der Fluoreszenzmikroskopie nicht immer erfasst. Für CgHDA4 konnte jedoch die Fluoreszenzmikroskopie eine zytoplasmatische Lokalisation des Proteins in jungen Sporen nachweisen, die mit zunehmender Reifung verschwindet. In Folgeexperimenten könnte dieser Sachverhalt eingehender analysiert werden, indem die GFP-Fluoreszenz von Sporen der HDA3:eGFP- und HDA4:eGFP-Stämme in Abhängigkeit von der Zeit untersucht wird.

Die Entwicklung leistungsstarker „omics“-Techniken verbesserte nicht nur die Identifizierung von Molekülen sondern vertiefte die Erforschung zellulärer Prozesse. Neben den Erkenntnissen der Biochemie und molekularen Zellbiologie, die das Wissen um Proteine und die dynamische Regulation ihrer Funktion erweitern, tragen auch natürliche und synthetische Inhibitoren zur Identifizierung von Proteinen und deren Funktion bei. Die Interaktion eines Proteins mit einem Inhibitormolekül ist daher ein valider Startpunkt von experimentellen Ansätzen. Klasse I- und Klasse II-HDACs können durch Inhibitoren wie Natriumbutyrat, Trichostatin A (TSA) oder Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) gehemmt werden (Sawa *et al.*, 2001; Cohen *et al.*, 2002; Herold *et al.*, 2002). Natriumbutyrat war die erste Substanz, die als HDAC-Inhibitor beschrieben wurde (Candido *et al.*, 1978). Die effektive Dosis dieses Stoffes liegt im Millimolar-Bereich, sodass die Möglichkeit stark erhöht ist, die Wirkung anderer Enzyme zu verändern oder dass Beeinträchtigungen am Zytoskelett und an Membranen auftreten (Ito *et al.*, 2006). Daher sollte Natriumbutyrat mit Vorsicht eingesetzt werden. Der aus *Streptomyces hygroscopicus*-Kulturen isolierte Inhibitor Trichostatin A wirkt bereits in nanomolaren Konzentrationen und bietet sich eher für Untersuchungen an (Tsuji *et al.*, 1976; Yoshida *et al.*, 1990). Diese chemische Herangehensweise wurde neben dem molekulargenetischen Ansatz genutzt, um zu untersuchen, ob Histonacetylierung für das Wachstum und die Morphologie von vegetativen Hyphen für *C. graminicola* von Bedeutung ist.

Der Einfluss von Trichostatin A äußerte sich in *C. graminicola* nicht nur in konzentrationsabhängigen Wachstumsdefekten sondern induzierte die Differenzierung von Verzweigungen und führte zu Veränderungen der Zellmorphologie. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten deutlich, dass die zylindrischen Hyphenzellen eine runde Form annahmen. Unter den epigenetischen Modifikationen kommt der Histonacetylierung in diesen grundlegenden Entwicklungsprozessen eine offensichtlich größere Bedeutung zu als der DNA-Methylierung. Die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Azacytidin führte bei den getesteten Konzentrationen weder zu Wachstumsbeeinträchtigungen noch zu morphologischen Veränderungen der Hyphen oder Zellen. Diese Beobachtungen wurden bestätigt durch die mikroskopische Analyse von *DIM2-1*-Deletionsstämmen. Immunozytologische Färbungen und Massenspektrometrie-Analysen von $\Delta dim2-1$ -Stämmen konnten ferner keine DNA-Methylierung mehr nachweisen (Wiebke Kummer, persönliche Kommunikation). Die chemische Behandlung und die molekulargenetische Arbeiten bestätigen somit, dass die DNA-Methylierung für die Differenzierung vegetativer Hyphen unbedeutend ist.

IV.3 Deletionsmutagenese und RNA-Silencing

Zu den erfolgreichsten Strategien bei der Aufklärung von Genfunktionen gehört die gezielte Inaktivierung von Genen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden. Auf diese Weise gelang es, zahlreiche Gene zu identifizieren und funktionell zu analysieren, die für Interaktionen zwischen phytopathogenen Pilzen und ihren Wirtspflanzen von Bedeutung sind (Idnurm und Howlett, 2001; Tudzynski *et al.*, 2003).

Mit der Kenntnis der Sequenz des Zielgenes, erlaubt das von Yu und Mitarbeitern publizierte Verfahren der DJ-PCR die Konstruktion von Deletionskassetten, die eine gezielte Gendeletion gestatten (Yu *et al.*, 2004). Mittels dieser Technik wurden in *Colletotrichum graminicola* bereits erfolgreich Gene deletiert (Horbach *et al.*, 2009; Mickel, 2010; Lingner *et al.*, 2011; Albarouki und Deising, 2013; Albarouki *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 2014).

IV.3.1 Silencing von *CgHDA1*

Im Fall von *CgHDA1* konnten keine Deletionsmutanten erzeugt werden. Alle getesteten Transformanten trugen eine ektopische Integration des Deletionskonstruktes, was andeutete, dass die Deletion zu einem letalen Phänotyp führt. Zwischenzeitlich publizierte

Arbeiten konnten für andere filamentöse Ascomyceten wie *Cochliobolus carbonum*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* und *Fusarium fujikuroi* bestätigen, dass es sich bei *HDA1* bzw. dessen Orthologe um ein essentielles Gen handelt (Smith *et al.*, 2010; Tribus *et al.*, 2010; Studt *et al.*, 2013). Daher wurde auf Basis eines RNAi-Expressionskonstrukts versucht, die Transkription des endogenen Gens herabzusetzen. Dies sollte das Studium der Genfunktion ermöglichen. Für *C. graminicola* wurde diese Methode schon erfolgreich zur Herabsetzung von *GLS1*- und *KRE5*- bzw. *KRE6*-Transkripten angewendet (Oliveira-Garcia und Deising, 2013; Oliveira-Garcia und Deising, 2016).

Ein wichtiger Aspekt, der berücksichtigt werden muss, ist, dass siRNAs aufgrund von Homologien in der Zielsequenz, neben dem gewünschten Abbau der komplementären Ziel-RNA, außerdem einen unerwünschten Abbau weiterer, komplementärer RNA-Moleküle vermitteln können (off-targets). Um dies auszuschließen, wurde die Zielsequenz einer BLAST-Suche unterzogen, wobei jedoch keine off-targets identifiziert werden konnten.

IV.3.1.1 Die Bedeutung von *CgHDA1* für vegetatives Wachstum, Hyphenmorphologie und Sporulationsvermögen

Nach der Transformation mit dem pRNAi-HDA1-Plasmid konnten *HDA1* RNAi-Stämme gewonnen werden, welche eine signifikant verringerte *HDA1*-Transkriptrate aufwiesen. Alle generierten RNAi-Stämme zeigten im Vergleich zum Wildtyp ein reduziertes Wachstum, insbesondere die Isolate 114 und 73. Alle verbliebenen Isolate zeigten ein etwas verbessertes Wachstum, weshalb aus diesen Stämmen Isolat 11 ausgewählt worden ist. Die molekulare Charakterisierung der RNAi-Isolate durch Southern Blot-Analysen konnte, mit Ausnahme von Isolat 238, jeweils nur ein Integrationsereignis des RNAi-Expressionskonstrukts, jedoch jeweils an anderer Stelle, nachweisen. Eine Korrelation von Transkriptmenge und Integrationshäufigkeit des RNAi-Expressionskonstrukts konnte nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in diesem Fall eher der Integrationsstelle als der Kopienanzahl der RNAi-Expressionskassette eine Bedeutung zukommt.

Die *HDA1* RNAi-Isolate unterschieden sich jedoch nicht nur im Wachstum vom Wildtyp, es traten zudem signifikante Veränderungen der Hyphenmorphologie auf. Die vegetativen Hyphen von RNAi-Isolaten waren im Vergleich zu WT-Hyphen wesentlich stärker bzw. dicker und dadurch visuell einzeln wahrnehmbar. Detaillierte mikroskopische Untersuchungen konnten zeigen, dass es sich bei den von *HDA1* RNAi-Isolaten gebildeten

Hyphen um einzelne Hyphen handelt, die sehr früh und in der Folge wesentlich verzweigter wuchsen. Dieses Ergebnis ist übereinstimmend zu Untersuchungen in *A. nidulans*. Das *HDA1*-Orthologe, *RpdA*, wurde unter Kontrolle von reprimierbaren Promotoren gestellt, um die Transkriptrate zu vermindern. Diese Knock down-Stämme waren durch einen Verlust des radialen Wachstums sowie durch stark verzweigte vegetative Hyphen charakterisiert. Unter induktiven Bedingungen konnte hingegen der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden (Tribus *et al.*, 2010).

Verstärkte Verzweigungen können durch eine möglicherweise gestörte α -1,3-Glucanbiosynthese hervorgerufen worden sein. *AGS3*-Deletionsmutanten von *C. graminicola* weisen im Vergleich zum Wildtyp mehr Verzweigungen bzw. einen um ca. 33 % geringeren Abstand zwischen abzweigenden Hyphen auf (Gase, 2013). Ein verminderter α -1,3-Glucangehalt in der pilzlichen Zellwand kann Auflockerungen der Zellwand zur Folge haben. Die turgorgetriebene Dehnung der Plasmamembran und die Aktivierung neuer Wachstumszentren können somit die vermehrte Bildung von Hyphen bedingen (Wessels, 1993).

Pilzliche Hyphen breiten sich durch apikales bzw. polarisiertes Wachstum aus (Riquelme, 2013). Kontinuierliches polarisiertes Wachstum führt zur unidirektionalen Extension der Leithyphe in das Medium. In der Folge werden von subapikalen Hyphenbereichen durch Verzweigung neue Hyphenspitzen gebildet, die der Erschließung des Lebensraums dienen. Hyphenwachstum erfordert nicht nur das Zustandekommen, sondern auch die Aufrechterhaltung sowie die Re-Etablierung von Polarität nach Verzweigungsprozessen. Sie bedarf der Übertragung der Positionsinformation und schließlich der kontinuierlichen Synthese und das selektive Targeting von Proteinen, Lipiden und Zellwandbausteinen zum Apex der pilzlichen Plasmamembran (Riquelme, 2013). Das frühe und irreguläre Verzweigen der *HDA1* RNAi-Isolate deutet daher auf ein vermindertes bzw. auf den Verlust des polarisierten Wachstums oder auf deregulierte Kontrollfaktoren hin. In der Etablierung von Polarität und deren Aufrechterhaltung sowie in Verzweigungsprozesse ist eine Vielzahl von Faktoren involviert. Darunter zählen Zytoskelettproteine (McGoldrick *et al.*, 1995; Weber *et al.*, 2003; Fuchs *et al.*, 2005), DNA damage response factors (Semighini und Harris, 2008), GTPasen (Nakano *et al.*, 2002; Guest *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2014), Armadillo repeat-containing proteins (Barelle *et al.*, 2006), Septine und Formine (Gladfelter, 2006), Polarisomkomponenten (Knechtle *et al.*, 2003), NDR (Nuclear Dbf2-Related)-Proteinkinasen (Johns *et al.*, 2006) oder NADPH-Oxidasen (NOX) (Takemoto *et al.*, 2007; Tudzynski *et al.*, 2012; Kayano *et al.*, 2013). GTPasen wie RacA, Cdc42 und

RhoA wurden zudem als Regulatoren von ROS produzierenden NADPH-Oxidase identifiziert (Scott und Eaton, 2008; Semighini und Harris, 2008). In einer Vielzahl von entwicklungsbiologischen Prozessen kommen auch Calcium-Ionen eine Bedeutung als Signaltransduktor zu. Durch die Beeinflussung des Ca^{2+} -Gradienten erkannte man deren regulatorisches Potential für das Wachstum von Hyphenspitzen und für die Induktion von Verzweigungen (Grinberg und Heath, 1997). Durch genetische Manipulation der genannten Faktoren konnte man deren Beteiligung an polarisiertem Wachstum und Verzweigungsprozessen zeigen.

Um einen ersten Überblick zu erhalten, welche der o.g. Kontrollfaktoren-Gruppen möglicherweise durch CgHDA1 kontrolliert werden, wurden einzelne Gene dieser Gruppen ausgewählt und in *C. graminicola* identifiziert. Dabei handelte es sich um *Rho3* (GTPase), *Cot-1* (NDR-Proteinkinase) und *Spa2* (Polarisationskomponente). RT-qPCR-Analysen sollten anschließend zeigen, ob diese Gene in den *HDA1* RNAi-Isolaten im Vergleich zum Wildtyp dereguliert vorliegen. Diese Untersuchungen zeigten zunächst, dass *Rho3* und *Cot-1* nicht signifikant dereguliert waren. Die Polarisationskomponente *Spa2* ist hingegen in allen RNAi-Stämmen signifikant hochreguliert, was darauf hindeutet, dass Polarisationskomponenten direkt oder indirekt durch *HDA1* reguliert werden könnten. Polarisationsfaktoren sind daher ideale Kandidatengene für weiterführende Untersuchungen. *Spa2* wurde an einigen filamentösen Pilzen untersucht, aber dessen Funktion wird kontrovers diskutiert. *Spa2*-Deletionsmutanten von *Ashbya gossypii*, *A. nidulans*, *A. niger*, *M. oryzae* und *N. crassa* sind zunächst übereinstimmend charakterisiert durch ein reduziertes vegetatives Wachstum und vermehrt differenzierte Verzweigungen (Knechtle *et al.*, 2003; Virag und Harris, 2006; Meyer *et al.*, 2008; Araujo-Palomares *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014). Zusätzlich zu den beobachteten Veränderungen bildeten *Spa2*-Deletionsstämme von *M. oryzae* kleinere Konidien und Zellen von vegetativen Hyphen waren signifikant kürzer als Zellen von Wildtyp-Hyphen (Li *et al.*, 2014). Für den dimorphen Basidiomyceten *Ustilago maydis* ist *Spa2* sowohl für die Morphologie der Hefe-Form als auch für die der filamentösen Hyphen von Bedeutung (Carbó und Pérez-Martín, 2008). Die Deletion von *Spa2* führte zu runderen Zellen der Hefe-Form und dickeren Filamenten; ein starkes Verzweigen wurde nicht berichtet. Die für Ascomyceten beschriebenen morphologischen Veränderungen zeigten auch *HDA1* RNAi-Stämme von *C. graminicola*. RT-qPCR-Analysen wiesen jedoch nach, dass diese Isolate über signifikant hochregulierte *Spa2*-Transkriptmengen verfügen. Die beobachteten Effekte resultieren somit nicht aus einer verringerten *Spa2*-Expression. Überraschenderweise zeigten vegetative

Hyphen von *A. niger* und *U. maydis* *Spa2*-Überexpressionsstämmen auch morphologische Veränderungen, z. T. ähnlich zu denen, wie sie nach der Deletion des Gens auftreten, darunter vergrößerte Hyphendurchmesser und Polaritätsdefekte (Carbó und Pérez-Martín, 2008; Meyer *et al.*, 2008). Dass *Spa2*-Überexpressionsstämme von *U. maydis* einen loss-of-function-Phänotyp herbeiführen können, erklären sich Carbó und Mitarbeiter aufgrund der Interaktion von *Spa2* mit anderen Polaritätsdeterminanten. Man vermutet zum einen, dass hohe *Spa2*-Gehalte einige der Interaktionspartner unterdrücken und somit Veränderungen der Zellmorphologie herbeiführen könnten (Carbó und Pérez-Martín, 2008) und zum anderen, dass die Polaritätsachse destabilisiert wird, sobald das *Spa2*-Proteinlevel das zelluläre Optimum übersteigt (Meyer *et al.*, 2008). Offenbar untersteht die Menge an *Spa2* einer distinkten Kontrolle.

Diese Ergebnisse könnten den *HDA1* RNAi-Phänotyp in *C. graminicola* erklären, welcher mit erhöhten *Spa2*-Transkriptmengen einhergeht. Weiterführende Untersuchungen könnten auch zeigen, ob *Spa2*-Deletionsmutanten und -Überexpressionsstämme von *C. graminicola* die gleichen phänotypischen Veränderungen zeigen.

Für die RNAi-Isolate konnte weiterhin eine signifikante Veränderung der Zellmorphologie von vegetativen Hyphen festgestellt. Während Wildtyp-Hyphenzellen von länglicher, zylindrischer Form waren, differenzierten *HDA1* RNAi-Isolate rundliche Hyphenzellen. Diese Erscheinung könnte auf Zellwanddefekte durch eine verminderte β -1,3-Glucanbiosynthese in den RNAi-Isolaten hindeuten. Vegetative Hyphen der *GLS1* (β -1,3-Glucan synthase 1)-RNAi-Stämme wiesen ausgeprägte Hyphendeformationen (Schwellungen) auf, welche zudem verstärkt pigmentiert waren (Oliveira-Garcia und Deising, 2013). Für *HDA1* RNAi-Stämme konnte durch RT-qPCR-Analysen jedoch keine verminderten *GLS1*-Transkripte nachgewiesen werden.

Als eines der Hauptzellwandpolymere kommt auch Chitin in filamentösen Pilzen eine große Bedeutung für die Hyphenmorphologie zu. *ChsA*- und *ChsV*- Disruptionsmutanten von *C. graminicola* sind durch große ballonartige Schwellungen der vegetativen Hyphen charakterisiert (Amnuaykanjanasin und Epstein, 2003; Werner *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse konnten für *Fusarium graminearum* bestätigt werden. Mittels Atomic Force Microscopy wurde nachgewiesen, dass *GzCHS5*- und *GzCHS7*-Deletionsstämme schwächere Hyphenzellwände aufwiesen (Kim *et al.*, 2009). Zellwanddefekte können in Pilzen somit auch durch einen verminderten Chitingehalt bedingt sein. Als potentielle Verursacher der morphologischen Veränderungen von *HDA1* RNAi-Stämmen können jedoch

keine verminderten *ChsV*-Transkriptgehalte zugrunde gelegt werden, da sich die ermittelten *ChsV*-Transkriptabundanzen in RNAi-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant unterscheiden.

Die Analysen legen bislang nahe, dass die untersuchten Zellwandbiogenesegene nicht durch *CgHDA1* reguliert werden. Möglicherweise kommen auch hier *Spa2* und dessen Interaktionspartner als obergeordnete Kontrollfaktoren oder aber auch osmotische Effekte in Betracht. Um weitere Gene bzw. andere Faktoren zu finden, die diesen Phänotyp hervorbrachten, sollten sich RNA-Seq- sowie RT-qPCR-Analysen zur Verifizierung anschließen.

Das verstärkte Einlagern von Pigmenten im Fall von *GLS1* RNAi-Stämmen konnte auch bei *HDA1* RNAi-Stämmen beobachtet werden. Die mikroskopischen Untersuchungen ließen vermuten, dass es sich bei diesem braunen Pigment um Melanin handeln könnte, welches hier als Schutzmaßnahme des Pilzes dient, um ein Reißen schwacher Zellwände zu vermeiden oder um Zellwanddefekte zu kompensieren. Ludwig und Kollegen konnten bestätigen, dass Melanin für die Zellwandstabilität von *C. graminicola* von Bedeutung ist (Ludwig *et al.*, 2014). In der Melaninbiosynthese kommt *CgPKS1* eine essentielle Rolle zu, weshalb in den *HDA1* RNAi-Stämmen überprüft wurde, ob dieses Gen überexprimiert wird. RT-qPCR-Analysen zeigten jedoch, dass die Transkriptabundanz nur in einem der drei untersuchten RNAi-Isolate erhöht war. Da jedoch alle drei Stämme über stark pigmentierte Zellwände verfügen wird nicht davon ausgegangen, dass es sich hierbei um Melanin handelt. Alternativ könnten auch Melaninbiosynthesehemmer wie Carpropamid oder Tricyclazol zum Einsatz kommen, um die Melaninbiosynthese in den RNAi-Isolaten näher zu untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *CgHDA1* an der Differenzierung vegetativer Hyphen erheblich von Bedeutung ist. RT-qPCR-Analysen zeigten zunächst, dass die *CgHDA1*-Transkriptmenge in den RNAi-Stämmen nicht mit der Integrationshäufigkeit oder z. B. mit dem Wachstum der Isolate korreliert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass in diesem Fall eher der Integrationsstelle als der Kopienanzahl der RNAi-Expressions-kassette eine Bedeutung zukommt. Weiterhin zeigen alle 11 RNAi-Stämme einen stark verzweigten Phänotyp und eine veränderte Zellmorphologie. Die drei näher charakterisierten RNAi-Isolate weisen unterschiedliche Integrationsstellen auf und wurden zudem in voneinander unabhängigen Transformationen gewonnen. Darüber

hinaus konnte durch Trichostatin A der *HDA1* RNAi-Phänotyp erzeugt werden. Dieser Befund legt nahe, dass Histondeacetylase 1 die Hauptaktivität unter den vier Histondeacetylasen innehaben könnte; ferner handelt es sich bei *CgHDA1* um ein essentielles Gen. Derzeit liegen jedoch noch keine vergleichenden Daten zu Aktivitätsmessungen der Histondeacetylasen in *C. graminicola* vor.

IV.3.2 Die Bedeutung von Histondeacetylasen für die Infektion von Mais

HDA1 RNAi-Isolate bildeten kleinere Konidien und sowohl *in vitro*- als auch *on planta*-Versuche zeigten, dass Konidien der RNAi-Stämme im Vergleich zum WT mehrfach auskeimten und signifikant längere Keimschläuche bildeten. Diese Daten deuten darauf hin, dass kein ausreichender Kontakt mit der darunterliegenden Oberfläche bestanden haben könnte, denn die Initiation der Appressoriendifferenzierung erfordert die Erkennung des Wirtes sowie die Induktion von Signalkaskaden (Deising *et al.*, 2000). Nachdem zwischen Keimschlauch und Kontaktoberfläche ausreichend Kontakt hergestellt wurde, wird die Appressorienbildung induziert. Apoga und Mitarbeiter konnten in Keimungsexperimenten zeigen, dass ca. 4,5 μm als ausreichend induktive Kontaktstrecke wirkten (Apoga *et al.*, 2004). Für die Differenzierung von Appressorien spielt zudem die Beschaffenheit der Kontaktoberfläche eine wichtige Rolle (Jelitto *et al.*, 1994). Für *C. graminicola* haben sich hierbei harte, hydrophobe Flächen als besonders effektiv erwiesen (Deising *et al.*, 2000; Chaky *et al.*, 2001). Neben den RNAi-Isolaten differenzierten auch $\Delta hda2$ -Stämme im Vergleich zum Wildtyp kleinere Konidien, was in Übereinstimmung mit Ergebnissen zu *HDC1*-Deletionsmutanten von *Cochliobolus carbonum* ist (Baidyaroy *et al.*, 2001). Während sich die Anzahl der differenzierten Appressorien der *HDA1* RNAi-Stämme und HDA-Deletionsmutanten ($\Delta hda2$, $\Delta hda3$, $\Delta hda4$, $\Delta hda3/\Delta hda4$) nicht von denen des Wildtyps unterschieden, konnten bei den ermittelten Penetrationsraten signifikante Defizite festgestellt werden. Nur 20-30 % der von den *HDA1* RNAi-Isolaten 11 und 114 differenzierten Appressorien waren in der Lage, intakte Maisblätter zu penetrieren, während für Isolat 73 kein Penetrationsereignis nachgewiesen werden konnte. Die überwiegende Mehrheit der $\Delta hda2$ -Appressorien ist ebenfalls nicht funktionell. Ca. 5 % dieser Appressorien konnten intakte Wirtsoberflächen penetrieren (Mickel, 2010). *CgHDA1* und *CgHDA2* scheinen eine Schlüsselrolle in der Ausbildung funktioneller Appressorien innezuhaben. Für phytopathogene Pilze, welche die Infektion mittels Appressorien realisieren, ist deren Funktionalität essentiell, um sich im Wirt zu etablieren. Nichtfunktionelle

Appressorien führen abhängig von der Schwere des Defektes zu einer verminderten Virulenz oder zu Apathogenität, was bereits für eine Reihe phytopathogener Pilze beschrieben wurde. Im Vordergrund dieser Studien standen Untersuchungen zu Cutinasen, Autophagie-Prozessen, Melaninbiosynthese, Komponenten der Signaltransduktion (GTP-Bindeproteine, cAMP-abhängige Proteinkinase A, Phospholipase C), Tetraspamine, Transkriptionsfaktoren oder auch NADPH-Oxidasen (Xu *et al.*, 1997; Gourgues *et al.*, 2004; Veneault-Fourrey *et al.*, 2005b; Veneault-Fourrey *et al.*, 2006; Skamnioti und Gurr, 2007; Choi *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2011; Siegmund *et al.*, 2013; Ludwig *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015). Die Gene, die in diese Prozesse involviert sind, wurden bereits in *C. graminicola* identifiziert und können in weiterführenden RT-qPCR-Analysen in *HDA1* RNAi- und $\Delta hda2$ -Stämmen im Vergleich zum Wildtyp eingehend untersucht werden.

Penetrationsdefekte können auch durch ein vermindertes Vermögen appressorialen Turgor zu generieren, verursacht werden (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005a). Zytorrhizie-Experimente sollten daher klären, ob das in den *HDA1* RNAi-Isolaten bzw. $\Delta hda2$ -Stämmen gebildete osmotische Potential in den Appressorien im Vergleich zum Wildtyp vermindert ist. Sowohl für die *HDA1* RNAi-Stämme als auch für den Wildtyp und $\Delta hda2$ -Stämme konnte ein osmotisches Potential von 2,6 MPa bestimmt werden. Dieses Ergebnis liegt zwischen den für *C. graminicola* publizierten Werten von 2,4 und 2,8 MPa (Loehrer *et al.*, 2014; Ludwig *et al.*, 2014). Die beobachteten Penetrationsdefekte sind somit nicht auf einen reduzierten Turgor in den Appressorien der *HDA1* RNAi- oder $\Delta hda2$ -Stämme zurückzuführen. Da die von diesen Stämmen gebildeten Appressorien weder morphologische Unterschiede zu Wildtyp-Appressorien noch verminderte appressoriale Drücke aufwiesen, kommen für die Apathogenität fehlende Penetrationssporen in Betracht. H191-Insertionsmutanten von *Colletotrichum lindemuthianum* sind apathogen und u.a. nicht in der Lage, Penetrationssporen zu bilden (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005a). Das betroffene Gen, *CLAPI*, kodiert eine putative Kupfer-ATPase (Parisot *et al.*, 2002). Die eingehende mikroskopische Analyse von *HDA1* RNAi- bzw. $\Delta hda2$ -Stämmen zeigte jedoch, dass diese Isolate keinen Defekt in der Differenzierung von Penetrationssporen aufweisen. In der Folge wurden Papillen quantifiziert, die von der Pflanze gebildet werden, um die Penetration phytopathogener Pilze zu erschweren oder zu verhindern. Die Papillenbildungsraten lagen bei allen getesteten Isolaten bei ca. 2 %, sodass dem Penetrationsdefizit keine vermehrte Papillenbildung zugrunde gelegt werden kann.

Dem Penetrationsdefizit der *HDA1* RNAi- und $\Delta hda2$ -Stämme könnten daher deregulierte Kontrollfaktoren für polares Wachstum, wie NADPH-Oxidasen (NOX) oder Transkriptionsfaktoren, zugrunde liegen. Die Differenzierung der Penetrationshyphne an der Basis des Appressoriums erfolgt durch die Re-Etablierung des polaren Wachstums. Egan und Mitarbeiter konnten zeigen, dass $\Delta nox1$ - und $\Delta nox2$ -Deletionsstämme von *M. oryzae* nicht in der Lage waren, die Kutikula zu penetrieren (Egan *et al.*, 2007). *M. grisea*-Deletionsstämme des Transkriptionsfaktors *MST12* differenzierten Appressorien, deren Turgor im Vergleich zum Wildtyp nicht vermindert war und bildeten Penetrationssporen aus, waren jedoch nicht in der Lage, Penetrationshyphen zu differenzieren (Park *et al.*, 2004). Die Autoren nahmen an, dass die Reorganisation des Zytoskeletts während der Appressoriendifferenzierung von Bedeutung ist. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der fungizide Wirkstoff Benomyl eingesetzt. Dieser geht eine Komplexbindung mit den am Spindelapparat beteiligten Mikrotubuli ein und hemmt die gleichmäßige Verteilung der DNA auf die Tochterzellen. Mittels eines β -Tubulin-GFP-Fusionskonstrukts konnte man zeigen, dass 24 h alte $\Delta mst12$ -Appressorien unter Benomylbehandlung im Vergleich zum Wildtyp erhebliche Störungen in der Mikrotubulidynamik aufweisen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Deletion von *MST12* die Mikrotubulidynamik in reifen Appressorien beeinträchtigt. Darüber hinaus könnte dies auch zu Defekten in der Reorganisation des Zytoskeletts führen, die für die Differenzierung der Penetrationshyphne von Bedeutung ist (Park *et al.*, 2004).

Ein bedeutender Unterschied zwischen *HDA1* RNAi-Isolaten und $\Delta hda2$ -Stämmen ist, dass letztere durch einen Biotrophie-Arrest charakterisiert sind. Die Bedeutung von *CgHDA2* für die Penetration und die Etablierung der biotrophen Phase im Wirt konnte bereits in einer eigenen früheren Arbeit gezeigt und Histondeacetylase 2 als Pathogenitätsfaktor in *C. graminicola* identifiziert werden (Mickel, 2010). Ein Grund für die Arretierung in der biotrophen Phase könnte in einem verminderten Vermögen liegen, bestimmte Aminosäuren zu bilden. Die Deletion des α -Aminoacidipat-Reduktase-Gens *CgAAR*, das für ein essentielles Enzym der Lysinbiosynthese kodiert, führte zu *Cgaar*-Deletionsmutanten, welche in der biotrophen Phase arretieren (Horbach *et al.*, 2009). Weiterführende Untersuchungen dieses Gens mittels RT-qPCR könnten zeigen, ob dieses in $\Delta hda2$ -Stämmen dereguliert vorliegt. RNA-Seq-Analysen vegetativer Hyphen zeigten bereits, dass der Großteil der funktionellen Gruppen in diesen Stämmen herunterreguliert ist, darunter Transkriptionsfaktoren, Transporter und sogenannte Carbohydrate Active

Enzymes (CAZ). Dass Gene dieser funktionellen Gruppen zur Virulenz beitragen, konnte bereits in verschiedenen phytopathogenen Pilzen wie *Fusarium oxysporum*, *Ustilago maydis* oder *Botrytis cinerea* gezeigt werden (Brito *et al.*, 2006; Michielse *et al.*, 2009; Wahl *et al.*, 2010). Obwohl es in diesen Fällen gelang, einige CAZ-Gene als Virulenzfaktoren zu identifizieren, waren diese Untersuchungen häufig von Misserfolgen geprägt, da Genome phytopathogener Pilze eine Vielzahl von Genen beherbergen, die für zellwandabbauende Enzyme kodieren und sich die enzymatischen Aktivitäten überlappen (Redundanz).

Damit Phänotypen auf ein Deletionsereignis zurückzuführen sind, sind Komplementationsanalysen eine wichtige experimentelle Komponente im Rahmen der Charakterisierung von Deletionsmutanten. Die sich anschließende Komplementation des $\Delta hda2$ -Stammes mit dem *CgHDA2*-Gen führte zum vollständigen Wiedererlangen des Penetrationsvermögens und der Pathogenität sowie zur Aufhebung des Wachstums- und Sporulationsdefektes. $\Delta hda2/HDA2$ -Stämme weisen auch bezüglich der Sporenlänge keine Unterschiede zum Wildtyp auf. Histondeacetylase 2 konnte somit als Regulator von Wachstumsprozessen, Sporulation und für die Infektion von Mais durch *C. graminicola* identifiziert werden.

Nach dem Eindringen in den Wirt bildet sich ein bulböses Infektionsvesikel, von dem primäre Hyphen ausgehen. In dieser Phase ernährt sich der Erreger biotroph und vom Wirt. Die Zellmembranen werden nicht durchbrochen. Die dünnen sekundären Hyphen hingegen bewirken ein Durchbrechen von Zellmembranen und -wänden und die vermehrte Ausscheidung von zellwandabbauenden Enzymen führt zum Absterben von Zellen, was die nekrotrophe Phase einleitet (Bergstrom und Nicholson, 1999). Die Untersuchung von Maisblättern, welche mit den *HDA1* RNAi-Isolaten 11 und 114 inokuliert wurden, zeigte neben einem verminderten Befall des Wirtsgewebes, dass sich weder die *in planta* differenzierten biotrophen noch die nekrotrophen Hyphen morphologisch von denen des Wildtyps unterscheiden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Differenzierung von vegetativen und pathogenen Hyphen unterschiedlichen Kontroll- bzw. Regulationsmechanismen unterliegt. Weiterhin wurden für die *HDA1* RNAi-Isolate 11 und 114 Defizite in der Bildung von Acervuli festgestellt, was zudem *in vitro* durch Sporulationsversuche sowie die Untersuchung der Acervuli auf Haferflockenagar bestätigt wurde. Während der Wildtyp auf Maispflanzen nach vier Tagen den asexuellen Entwicklungszyklus mit der Bildung neuer Sporen in Acervuli abschloss, war es den

HDA1 RNAi-Isolaten 11 und 114 nicht möglich, reife Acervuli zu differenzieren. Das Verwenden verwundeter Maisblätter hob dieses Defizit nicht vollständig auf. Hingegen konnten auch verwundete Maisblätter nicht durch das *HDA1* RNAi-Isolat 73 besiedelt werden. Die mikroskopische Untersuchung der Inokulationsstelle zeigte, dass die umgebenden Zellen frei von Hyphen waren. In weiterführenden Analysen könnten in diesem RNAi-Stamm die Kupfer-ATPase *CLAP1* oder der Transkriptionsfaktor *STE12* untersucht werden. *Colletotrichum lindemuthianum* *CLAP1*-Insertionsmutanten sind nicht in der Lage, auf verwundeten Bohnenblättern Anthraknosesympptome hervorzurufen (Parisot *et al.*, 2002). Park und Mitarbeiter zeigten, dass *M. grisea*-Deletionsstämme von *MST12* (*STE12*-Ortholog) auf verwundeten Reisblättern keine Symptome verursachten und *MST12* somit für invasives Wachstum von großer Bedeutung ist (Park *et al.*, 2002). Die oben genannten Kandidatengene, die für die Appressorien-vermittelte Penetration von Bedeutung sind, konnten bereits in *C. graminicola* identifiziert werden. Diese Gene könnten in weiterführenden Analysen mittels RT-qPCR überprüft werden, um die Penetrationsdefekte von *HDA1* RNAi- und $\Delta hda2$ -Isolaten zu erklären zu können. So könnte gezeigt werden, dass diese Gene durch *CgHDA1* und *CgHDA2* reguliert werden. Erfolgversprechend wäre auch eine RNA-Seq-Analyse, um weitere Kandidatengene aufzufinden.

Während den Genen *CgHDA1* und *CgHDA2* für die Infektion von Mais durch *C. graminicola* eine essentielle Bedeutung zukommt, lieferten mikroskopische Analysen des Infektionsverlaufs von $\Delta hda3$ -, $\Delta hda4$ -Mutanten bzw. des Doppeldeletionsstammes $\Delta hda3/\Delta hda4$ keine Hinweise darauf, dass *CgHDA3* oder *CgHDA4* für die Differenzierung von Infektionsstrukturen oder für die Pathogenität von Bedeutung sind.

Die von *CgHDA4*:eGFP-Stämmen auf Maisblättern differenzierten Acervuli enthielten junge Sporen, die eine deutliche zytoplasmatische eGFP-Fluoreszenz aufwiesen, während bei acht Tage alten Sporen keine eGFP-Signale zu detektieren waren. Darüber hinaus zeigten RNA-Seq-Analysen, dass in 14 Tage alten Sporen keine Transkripte vorlagen. *CgHDA4* könnte somit eine Funktion während der frühen Phase der Sporenreifung innehaben. Funktionen, die *CgHDA4* während der Sporenreifung ausübt, scheinen nicht von essentieller Bedeutung zu sein, denn $\Delta hda4$ -Stämme bilden im Vergleich zum Wildtyp äquivalente Sporenmengen. Untersuchungen zur Sporenmorphologie zeigten, dass diese im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist. Ebenso entwickeln sich aus den von $\Delta hda4$ -Stämmen differenzierten Sporen während des Infektionsverlaufs alle typischen Infektionsstrukturen. Auch konnte in Infektionsversuchen gezeigt und mittels qPCR-Analysen

bestätigt werden, dass diese Stämme voll virulent sind. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von *F. graminearum* (Li *et al.*, 2011).

Für die Symptomentwicklung scheinen die Gene *CgHDA3* und *CgHDA4* in phytopathogenen Pilzen jedoch unterschiedlich relevant zu sein. Während sich die von den *C. graminicola*-Deletionsmutanten bzw. dem Doppeldeletionsstamm verursachten Anthraknose-Symptome nicht von denen des Wildtyps unterschieden, konnte für *M. oryzae* gezeigt werden, dass die Deletion der orthologen Gene zu einer verzögerten Symptomentwicklung bzw. zu einer verringerten Virulenz führte (Ding *et al.*, 2010).

Der durch das Reispathogen *Fusarium fujikuroi* verursachten Bakanae-Krankheit liegen Störungen der Gibberellin-Produktion zugrunde (Yabuta, 1935). Gibberelline sind Pflanzenhormone, die das pflanzliche Wachstum steuern. *F. fujikuroi* besitzt das Vermögen, Gibberellinsäure zu produzieren und zu sekretieren (Wiemann *et al.*, 2013). Der Pathogen-induzierte Gibberellin-Überfluss führte bei den Reispflanzen zu einer Verlängerung der Internodien. Die Deletion des *HDA3*-Orthologen (*FfHda1*) verursachte im Vergleich zum Wildtyp eine reduzierte Internodienverlängerung, was verdeutlicht, dass dieses Gen für die Gibberellin-induzierte Bakanae-Krankheit von Bedeutung ist (Studt *et al.*, 2013).

IV.3.2.1 Die Bedeutung von Histonacetyltransferasen für die Infektion von Mais

Die erhobenen Daten zeigten bisher, dass Histondeacetylasen in Virulenz und/oder Pathogenität involviert sind. Daher war es auch von Interesse, den Beitrag von Histonacetyltransferasen (HATs) an der Symptomausprägung zu untersuchen.

Da im Genom von *C. graminicola* eine Vielzahl von HATs identifiziert werden konnte, wurde sich auf ausgewählte HATs konzentriert, für die, zumeist in *Candida albicans*, eine Beteiligung in der Virulenz nachgewiesen wurde (Lopes da Rosa *et al.*, 2010; Tscherner *et al.*, 2012). Die anschließende Charakterisierung zeigte, dass die Deletion keines dieser Gene einen Einfluss auf die Infektion von Mais hat, da alle Histonacetyltransferase-Deletionsstämme die typischen Anthraknose-Läsionen verursachten. Somit kann davon ausgegangen werden, dass den Genen *CgHAT1*, *CgKAT11* und *CgELP3* keine Bedeutung für die Infektion von Mais durch *C. graminicola* zukommt.

Kürzlich konnte der *F. graminearum*-Histonacetyltransferase ELP3 eine Beteiligung an der Virulenz nachgewiesen werden (Lee *et al.*, 2014). $\Delta elp3$ -Stämme verursachten im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Symptome an Weizenähren. Darüber hinaus waren die Transkriptgehalte der Trichothecen-Biosynthesegene *Tri5* und *Tri6* signifikant herabgesetzt, was sich darin äußerte, dass weder Deoxynivalenol noch 15-Acetyldeoxynivalenol

in detektierbaren Mengen produziert wurden. Die verminderte Toxinproduktion kann als ein Grund der verringerten Virulenz gesehen werden, denn Studien an *F. graminearum* zeigten, dass Trichothecene Virulenzfaktoren darstellen (Proctor *et al.*, 1995a; Desjardins *et al.*, 1996; Maier *et al.*, 2006).

IV.3.3 Histondeacetylase-Inhibitoren als fungizide Wirkstoffe

Die erhaltenen Daten zeigen deutlich, dass die Klasse I-Histondeacetylasen CgHDA1 und CgHDA2 für *C. graminicola* einen wichtigen Beitrag zur Infektion von Mais liefern. Die Eigenschaft der Hemmbarkeit macht sie daher zu idealen Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Pflanzenschutzstrategien.

Krankheitsverläufe von Pflanzen und Menschen unterliegen vielfältigen mikrobiellen und Wirtsfaktoren. Von Seiten des Pathogens schließt dies häufig die Eigenschaft morphogenetischer Veränderungen (Phänotypwechsel) und Adhäsionsvermögen an Geweben ein, während für die Adaptation im Wirt dessen Physiologie, Immunantwort oder eine kompetitive Mikroflora bedeutend ist (Odds, 1997; Srikantha *et al.*, 2001). Für die humanpathogene dimorphe Hefe *Candida albicans* konnte gezeigt werden, dass die Neuorganisation von Chromatin und transkriptionelle Regulierungen an der Adaptation an Umweltbedingungen beteiligt sind (Srikantha *et al.*, 2001). Den Histondeacetylasen CaHDA1 und CaRPD3 kommen hierbei individuelle Bedeutungen beim Phänotypwechsel zu.

Da deregulierte HATs und HDACs mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht werden, macht sie die Eigenschaft der Hemmung für die Humanmedizin zu einem attraktiven Target. Immunsupprimierte Menschen sind z. B. bei der invasiven Aspergillose mit der zunehmenden Resistenz von *Aspergillus fumigatus* gegenüber Azolungiziden oder der Toxizität und eingeschränkten Wirksamkeit der Folgebehandlungen konfrontiert (Lamoth *et al.*, 2015). Aus dem Grunde ist die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze von immenser Wichtigkeit. Einer dieser Ansätze kann die Verwendung von HDACi (Histondeacetylase-Inhibitoren) einschließen. Untersuchungen von Virulenzfaktoren in der humanpathogenen Hefe *Cryptococcus neoformans* zeigten bereits, dass HDACi zu einer Reduktion des Kapselbildungsvermögens des Erregers führten, aber auch zu vermindertem Wachstum, Defekte in Phospholipase-Aktivität, Melaninbiosynthese und Mating (Brandão *et al.*, 2015). Weiterführende Studien an *C. albicans* brachten hervor, dass das reduzierte, aber persistente Wachstum des Erregers bei hohen Fungizidkonzentrationen (trailing) durch TSA deutlich vermindert werden konnte (Smith und Edlind, 2002; Li *et al.*, 2015). Bei einer Vielzahl opportunistischer pilzlicher Pathogene

konnten derartige synergistische Effekte zwischen Azolfungiziden und MGCD290, einem Hos2-Histondeacetylasehemmer, beobachtet werden (Pfaller *et al.*, 2009). Für Humanpathogene konnte somit mehrfach gezeigt werden, dass Histondeacetylase-Inhibitoren Sensitivität gegenüber Azolen vermitteln. Diese Ansätze könnten auch im Pflanzenschutz zu neuen Konzepten und Bekämpfungsmöglichkeiten führen. In ersten Versuchen konnten synergistische Effekte des Histondeacetylase-Inhibitors MGCD290 und Azolfungiziden gegenüber einer Vielzahl pflanzenpathogener Pilze beobachtet werden (Conn *et al.*, 2009). Die Fungizidwirkung konnte gegenüber *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Monilinia fructicola*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum* spp. und *Alternaria* spp. um das 2-16fache erhöht werden. Pflanzenversuche stehen derzeit noch aus.

Azole sind die präferenziell eingesetzte Wirkstoffgruppe bei der Bekämpfung pflanzenpathogener Pilze, sodass die extensive und übermäßige Nutzung dieser Substanzen auf Agrarflächen zu einer reduzierten Sensitivität führte (Price *et al.*, 2015). Das Beifügen von HDACi könnte dazu führen, dass geringere Mengen dieser Azolfungizide eingesetzt werden müssten.

IV.3.4 HDACs sind an der Regulation von Sekundärmetaboliten in *C. graminicola* beteiligt

Um den Beitrag der untersuchten Histondeacetylasen an der Sekundärmetabolit-Biosynthese zu ermitteln, wurden die korrespondierenden Deletionsstämme bzw. *HDA1* RNAi-Stämme auf deren Fähigkeit hin untersucht, die in *C. graminicola* bereits identifizierten Sekundärmetabolite zu bilden. Dafür wurden die Isolate in Flüssigmedium kultiviert, die Metabolite durch Extraktion der Kulturüberstände gewonnen und mittels HPLC analysiert. Unter den experimentellen Bedingungen konnten im HPLC-Elutionsprofil des Wildtypisolats die Metabolite Colletoanthon A, Himanimid C, Colletopyron C und Colletochinon B identifiziert werden (Horbach *et al.*, 2009).

Himanimide wurden erstmalig aus Kulturfiltraten des Basidiomyceten *Serpula himantoides* isoliert (Aqueveque *et al.*, 2002). Mittels spektroskopischer Methoden wurden diese als Maleimid-Derivate charakterisiert, von denen Himanimid C in Konzentrationen von 25 mg/ml eine deutliche fungizide Wirkung gegenüber *Alternaria porri*, *Aspergillus ochraceus* und *Pythium irregulare* zeigte (Aqueveque *et al.*, 2002). Colletopyron C, Colletoanthon A und Colletochinon B wurden erstmalig in Kulturüberständen von *C. graminicola* identifiziert und beschrieben (Horbach *et al.*, 2009). Darüber hinaus zeigten

Untersuchungen mit diesen Substanzen, dass toxische Effekte weder auf intakten noch auf verwundeten Maisblättern beobachtet werden konnten.

Während sich das Elutionsprofil von $\Delta hda4$ von dem des Wildtyps nicht wesentlich unterschied, konnten für *HDA1* RNAi-11 und $\Delta hda3$ zusätzliche, bisher noch nicht identifizierte Metabolite detektiert werden. Das Auftreten weiterer Metabolite könnte auf die Anreicherung von Intermediaten hinweisen oder auf die Aktivierung stillgelegter Sekundärmetabolit-Cluster bzw. auf die Aktivierung von Regulatorgenen hinweisen. Untersuchungen in *Aspergillus niger* zeigten, dass >70 % der PKS-, NRPS- oder Hybrid-PKS-NRPS kodierenden Gencluster unter Standardlaborbedingungen transkriptionell supprimiert vorliegen (Fisch *et al.*, 2009). Daher untersucht man sehr intensiv, wie stillgelegte Sekundärmetabolit-Cluster aktiviert werden können. Als besonders vielversprechend erwies sich hierbei der Einsatz von epigenetischen Inhibitoren wie dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-Azacytidin oder den Histondeacetylase-Inhibitoren Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA) und Trichostatin A (TSA). Versuche mit diesen Hemmstoffen konnten in filamentösen Pilzen zeigen, dass sich nicht nur die Menge an konstitutiv gebildeten Sekundärmetaboliten vergrößerte, sondern sogar neue Naturstoffe entstanden, die nur aufgrund der Inhibitorexposition hin gebildet wurden (Williams *et al.*, 2008; Fisch *et al.*, 2009). Der Einsatz von Inhibitoren kann jedoch zu unspezifischen Effekten führen. Die Untersuchung entsprechender Deletionsmutanten bietet daher den Vorteil, dass Veränderungen im Sekundärmetabolismus ohne den Einsatz epigenetischer Inhibitoren studiert werden können. Reviews von Strauss bzw. Gacek fassen zusammen, wie stillgelegte Metabolit-Cluster durch epigenetische Modifikationen reguliert sind bzw. aktiviert werden können (Strauss und Reyes-Dominguez, 2011; Gacek und Strauss, 2012).

Die Deletion von *HDA2* in *C. graminicola* führte zum Wegfall von Colletoanthron A, Colletopyron C und Colletochinon B, während Himanimid C noch in geringen Mengen nachzuweisen war. Für *C. graminicola* ist bislang noch nicht bekannt, welcher Metabolit über welchen Sekundärmetabolit-Cluster synthetisiert wird. Jedoch bestätigten RNA-Seq-Analysen, dass im Vergleich zum Wildtyp zwar mehr PKS-Gene herunterreguliert sind, diese stellen aber nur einen Bruchteil der potentiellen PKS-Gene dar. RNA-Seq kann als etablierte und profunde Analyse zur Genexpression angesehen werden, denn in früheren Studien konnten wiederholt enge Korrelationen zwischen RT-qPCR- und RNA-Seq-Daten gezeigt werden (Asmann *et al.*, 2009; Griffith *et al.*, 2010; Shi und He, 2014;

Wu *et al.*, 2014). In weitergehenden Analysen konnten Gene identifiziert werden, die nur in $\Delta hda2$ -Isolaten herunterreguliert waren wie Enzyme, die an der Modifikation von Metaboliten beteiligt sind, aber auch Transkriptionsfaktoren oder Transporter. Die fehlenden Metabolite könnten somit durch fehlende Aktivierung des Clusters oder durch fehlende Transporter erklärt werden, die den Metabolit aus dem Pilz in das Kulturmedium sezernieren. Das legt die Vermutung nahe, dass CgHDA2 direkt oder indirekt an der Aktivierung der korrespondierenden Gene oder Gencluster beteiligt ist und somit als Aktivator im pilzlichen Sekundärmetabolismus fungiert. $\Delta hda2$ -Stämme arretieren nach der Bildung von kurzen Primärhyphen in der biotrophen Phase. Eine Erklärung dafür könnte das Fehlen bestimmter Sekundärmetabolite sein, die die Progression der Infektion unterstützen könnten, aber auch am Fehlen von Faktoren, die an der Mobilisierung bzw. Nährstoffakquise oder an der Aminosäure-Biosynthese während der Infektion eine Rolle spielen könnten (Horbach *et al.*, 2009). Den Beitrag von HDA2 zur Aktivierung des pilzlichen Sekundärmetabolismus konnten Arbeiten an orthologen Genen in *Fusarium* sp. bestätigen. Die Deletion von *HDF1* in *F. graminearum* resultierte in einer signifikanten Reduktion der Deoxynivalenol- und Aurofusarin-Level, während $\Delta fhda2$ -Stämme von *Fusarium fujikuroi* signifikant reduzierte Gibberellin-, Bikaverin-, Fusarinsäure- und Fusarin-Mengen produzierten (Li *et al.*, 2011; Studt *et al.*, 2013). Für *Fusarium* sp. konnte nachgewiesen werden, dass das Vermögen, Mykotoxine zu bilden, mit der Aggressivität des Pathogens korreliert (Mesterházy, 2002; Cumagun *et al.*, 2004; Goswami und Kistler, 2005).

In $\Delta hda3$ - und $\Delta hda4$ -Stämmen konnten die oben genannten vier prominenten Sekundärmetabolite identifiziert werden. Die RNA-Seq-Analysen zeigten, dass in $\Delta hda3$ -Stämmen mehr Sekundärmetabolit-Cluster stillgelegt, in $\Delta hda4$ -Stämmen jedoch eine weit größere Anzahl an Sekundärmetabolit-Clustern aktiviert wurden. Da dies nahezu keine Auswirkungen auf das Elutionsprofil hatte, kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Stämmen, die für diese Metabolite verantwortlichen Gencluster im Vergleich zum Wildtyp nicht dereguliert vorliegen. Da der *C. graminicola* $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstamm keinen Virulenzdefekt zeigt und die Charakteristika des $\Delta hda3$ -Stammes hinsichtlich vegetativem Wachstum und Sporulation vereinigt, wurde auf eine Sekundärmetabolit-Analyse verzichtet.

Für *Aspergillus* sp. und *Fusarium* sp. konnte man durch intensive molekulargenetische Analysen aufklären, welche Gene bzw. Gencluster z.B. für Toxine kodieren. Die Sequenzierung des *C. graminicola*-Genoms und -Transkriptoms führte zur Identifizierung von

42 Sekundärmetabolit-Clustern (O'Connell *et al.*, 2012). Die gegenwärtige Datenlage ist jedoch unzureichend, um Aussagen darüber zu machen, welches Cluster an der Biosynthese welches Metaboliten beteiligt ist. Des Weiteren ist bislang nicht bekannt, über welchen Umfang an möglichen Toxinen *C. graminicola* verfügt. *Fusarium* sp., *Cochliobolus* sp., *Pyrenophora* sp. oder *Alternaria* sp. sind hingegen intensiv untersuchte Toxinbildner, wobei diese Toxine als Virulenzfaktoren identifiziert werden konnten (Proctor *et al.*, 1995a; Baker *et al.*, 2006; Ciuffetti *et al.*, 2010; Tsuge *et al.*, 2012; Takaoka *et al.*, 2014). An der Regulation von Sekundärmetabolit-Clustern sind ferner auch Transkriptionsfaktoren beteiligt. Für die phytopathogenen Ascomyceten *C. carbonum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Alternaria alternata* und *F. graminearum* konnte eine Beteiligung von Transkriptionsfaktoren an der Sekundärmetabolit-Biosynthese nachgewiesen werden (Proctor *et al.*, 1995b; Hohn *et al.*, 1999; Pedley und Walton, 2001; Liu *et al.*, 2013b). *Fusarium* sp. sind als Pflanzenpathogene von sehr großer Bedeutung, da infizierte Körner mit Mykotoxinen wie Deoxynivalenol und Zearalenon kontaminiert sein können, was zu ernsthaften Beeinträchtigungen der Gesundheit führt.

Die Abwesenheit von Metaboliten in $\Delta hda2$ -Stämmen könnte als Ursache auch ein Fehlen oder eine verminderte Expression bestimmter Kinasen haben. In *F. graminearum* führte die Deletion des MAP-Kinase-Gens *MGVI* zur einer reduzierten DON (Deoxynivalenol)-Akkumulation in infiziertem Weizen (Hou *et al.*, 2002). 2008 konnte man für *A. nidulans* zeigen, dass Sekundärmetabolite durch die MAP-Kinase *MpkB* reguliert werden. *mpkb*-Deletionsstämme waren durch eine drastische Abnahme der Sterigmatocystin-, Penicillin- und Terrequinon A-Produktion charakterisiert (Atoui *et al.*, 2008). Terrequinon A wurde aus Extrakten von *Aspergillus terreus* isoliert und besitzt antitumorale Wirkung (Yamamoto *et al.*, 1976; Balibar *et al.*, 2007). Die zytotoxische Aktivität erklärt man sich durch das Interkalieren in genomische DNA, wodurch Tumorzellen für Apoptose prädisponiert werden (Kaji *et al.*, 1997). Darüber hinaus fungieren G-Proteine als weitere mögliche Regulatoren des Sekundärmetabolismus (Tag *et al.*, 2000). Die genannten Studien berichten übereinstimmend von der Regulation ganzer Sekundärmetabolit- bzw. Toxinbiosynthese-Cluster durch Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder G-Proteine. Durch diese Arbeiten kann davon ausgegangen werden, dass auch diese Faktoren für das Fehlen der Metabolite in $\Delta hda2$ - und *HDA1* RNAi-Stämmen verantwortlich sein könnten.

Wie auch unter I.3.1.1 bereits erwähnt, erfolgt eine Rekrutierung von HDACs durch DNA-bindende Repressorproteine (Kurdistani und Grunstein, 2003), sodass von weiteren Proteinen als putative Regulatoren ausgegangen werden muss.

Die Frage, inwieweit epigenetische Modifikationen bzw. Mechanismen direkt an der Regulation von Sekundärmetaboliten wie Mykotoxinen beteiligt sind, rückt daher nun in den Fokus. In *A. nidulans* und *F. graminearum* konnte nachgewiesen werden, dass Sekundärmetabolit-Cluster auch durch Histon H3K4- und H3K9-Methylierung reguliert werden (Bok *et al.*, 2009; Reyes-Dominguez *et al.*, 2010; Reyes-Dominguez *et al.*, 2012). Auch durch Inhibitorstudien mit TSA konnten Visentin und Mitarbeiter nachweisen, dass in *F. verticillioides* Schlüsselgene für die Fumonisin B-Biosynthese durch Histonacetylierung differentiell reguliert werden (Visentin *et al.*, 2012). Mittels Chromatin-Immunopräzipitation stellte man fest, dass nach TSA-Behandlung die Histone der Nukleosomen der *FUM1*- und *FUM21*-Promotorbereiche hyperacetyliert vorlagen, was zu einer verstärkten Expression dieser Gene führte. Diese Studien zeigten, dass epigenetische Modifikationen wie Histonacetylierung als wichtige Regulatorinstanzen fungieren. In einer anderen Studie konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass der Status epigenetischer Modifikationen durch Mykotoxine verändert werden kann. Mit Zearalenon behandelte murine Oozyten wiesen eine verstärkte DNA-Methylierung sowie verminderte H3K9me3-, H4K20me1-, H4K20me2- und H4K20me3-Level auf (Zhu *et al.*, 2014).

Zusammenfassung

Epigenetische Regulationsmechanismen spielen in höheren Organismen eine zentrale Rolle für die Steuerung entwicklungsbiologischer Prozesse sowie für die Regulierung von Genen in differenzierten Zellen. Von besonderem Interesse sind dabei Kontrollfaktoren, welche an der Entstehung und Aufrechterhaltung aktiver und inaktiver Chromatinzustände beteiligt sind. In Datenbankabgleichen konnten im Genom von *Colletotrichum graminicola* kodierende Sequenzen für vier Histondeacetylasen identifiziert werden.

Da die Deletion von *CgHDA1* zu einem letalen Phänotyp führte, wurde dieses Gen durch den Einsatz der RNAi-Technik funktionell charakterisiert. Aus drei voneinander unabhängigen Transformationen wurden *HDA1* RNAi-Isolate erhalten und mittels Southern Blot auf die Integrationshäufigkeit des RNAi-Plasmids hin analysiert. Drei Isolate wurden zur detaillierten Charakterisierung ausgewählt. Die *HDA1* RNAi-Isolate 11, 114 und 73 zeigten auf den Standardkulturmedien OMA und PDA im Vergleich zum Wildtyp einen unterschiedlich stark ausgeprägten Wachstumsdefekt. Vegetative Hyphen der RNAi-Stämme weisen eine verstärkte Melanisierung und einen immensen Verzweigungsgrad auf. Als einer der möglichen Kontrollfaktoren für apikale Dominanz und Verzweigung konnte die Polarisomkomponente Spa2 identifiziert werden.

Pathogene Hyphen zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Während die *HDA1* RNAi-Stämme 11 und 114 in Infektionsversuchen eine verminderte Virulenz sowohl auf intakten als auch auf verwundeten Maisblättern aufwiesen, rief Isolat 73 weder auf intakten noch auf verwundeten Maisblättern Anthraknosesymp-tome hervor. Die ermittelten Penetrationsraten der RNAi Isolate 11 und 114 waren im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert und den Appressorien des Isolats 73 war es nie möglich, die Wirtsoberfläche zu penetrieren. Ferner keimten die untersuchten RNAi-Isolate oftmals bipolar aus und differenzierten signifikant längere Keimschläuche.

Durch die Gegenüberstellung von vegetativen und pathogenen Hyphen der *HDA1* RNAi-Isolate konnte gezeigt werden, dass deren Morphogenese über unterschiedliche Kontroll- bzw. Regulationsmechanismen vermittelt wird. *CgHDA1* kommt bei der Morphologie von vegetativen Hyphen eine tragende Rolle zu, was durch Inhibitorversuche mit Trichostatin A bestätigt werden konnte.

CgHDA2 wurde bereits als pilzlicher Pathogenitätsfaktor von *C. graminicola* identifiziert (Mickel, 2010). Durch das Wiedereinbringen des WT-Gens konnte der Wildtyp-Phänotyp

wieder hergestellt und $\Delta hda2$ somit genetisch komplementiert werden. Für CgHDA3 bzw. CgHDA4 konnte keine Beteiligung für die Infektion von Mais durch *C. graminicola* nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Wildtyp unterschieden sich weder Einzel- noch die Doppelmutante hinsichtlich ihres Infektionsvermögens. Darüber hinaus wurden Sekundärmetabolite mittels HPLC analysiert. Die ermittelten Daten weisen darauf hin, dass HDACs an der Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese in *C. graminicola* beteiligt sind. Die Erkenntnisse zu den Histondeacetylasen von *C. graminicola* sind in Abb. 34 zusammengefasst.

Die experimentell gewonnenen Daten zu Histondeacetylasen und deren Eigenschaft der Hemmbarkeit macht sie daher zu idealen Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Pflanzenschutzstrategien.

Ferner wurden im Genom von *C. graminicola* mehr als 10 Histonacetyltransferasen identifiziert. Für einige dieser Gene konnte in *Candida albicans* eine Beteiligung in der Virulenz nachgewiesen werden. Daher standen diese Gene im Fokus von Untersuchungen in *C. graminicola* hinsichtlich Pathogenität. Den Genen *CgHAT1*, *CgKAT11* und *CgELP3* konnte keine Bedeutung für die Infektion von Mais durch *C. graminicola* nachgewiesen werden, da die Deletionsmutanten die typischen Anthraknosesymptome verursachten.

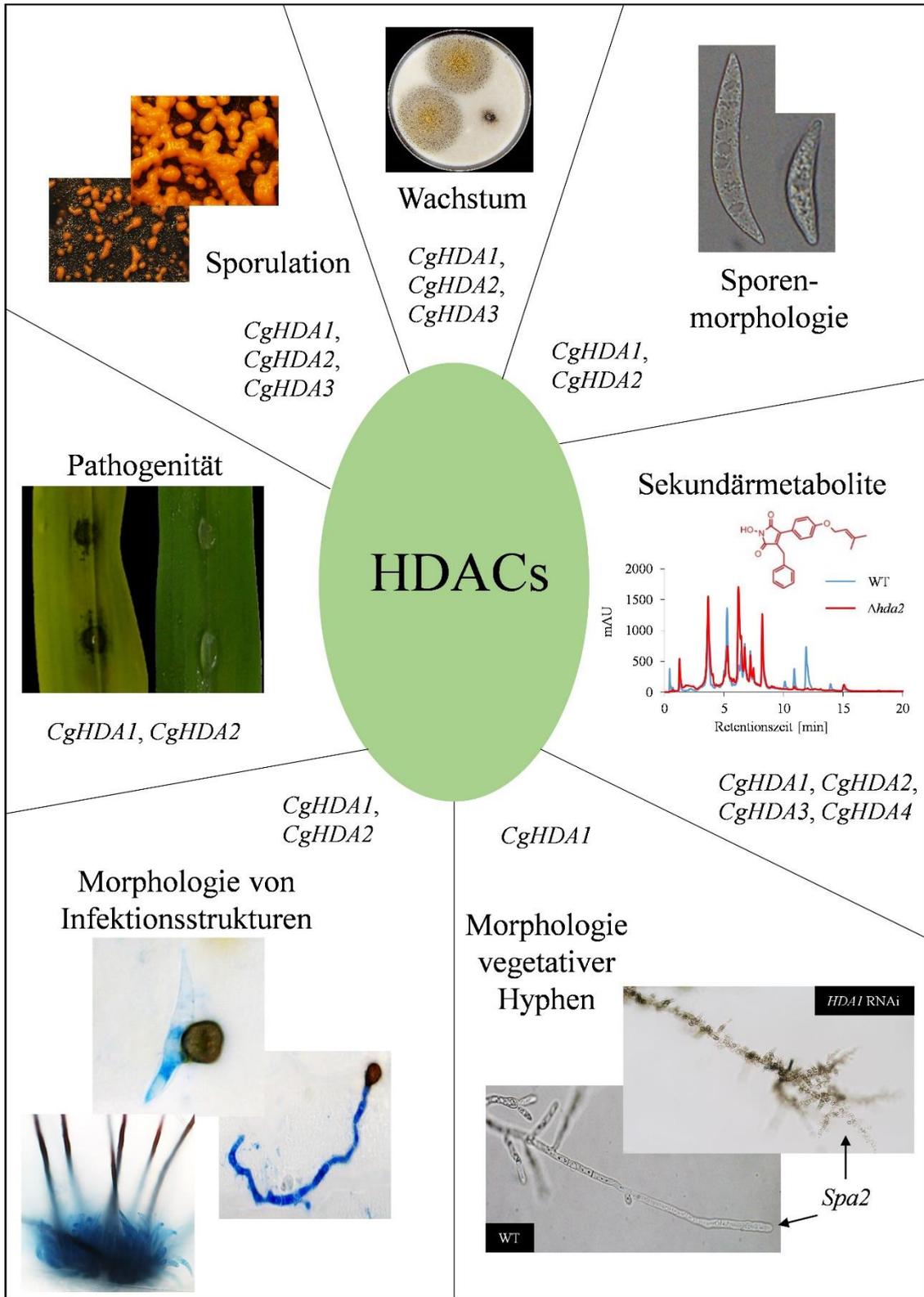


Abb. 34: Zusammenfassende Übersicht zu Erkenntnissen der Histondeacetylasen von *C. graminicola*.

Die chemische Formel im Sekundärmetabolite-Teil stellt Himanimid C dar und wurde Sellès (2005) entnommen.

Literaturverzeichnis

- Aboukhaddour, R., Kim, Y.M. und Strelkov, S.E.** (2012). RNA-mediated gene silencing of *ToxB* in *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant Pathology* **13**, 318-326.
- Albarouki, E. und Deising, H.B.** (2013). Infection structure-specific reductive iron assimilation is required for cell wall integrity and full virulence of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 695-708.
- 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.
- Allfrey, V.G. und Mirsky, A.E.** (1964). Structural modifications of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Science* **144**, 559-559.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D. und Caparros, M.L.** (2007). *Epigenetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 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.
- Amnuaykanjanasin, A. und Epstein, L.** (2003). A class V chitin synthase gene, *chsA* is essential for conidial and hyphal wall strength in the fungus *Colletotrichum graminicola* (*Glomerella graminicola*). *Fungal Genetics and Biology* **38**, 272-285.
- Anderson, D.W. und Nicholson, R.L.** (1996). Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia* **88**, 996-1002.
- Apoga, D., Barnard, J., Craighead, H.G. und Hoch, H.C.** (2004). Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appressoria. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 1-12.
- Aqueveque, P., Anke, T. und Sterner, O.** (2002). The himanimides, new bioactive compounds from *Serpula himantoides* (Fr.) Karst. *Zeitschrift Für Naturforschung* **57c**, 257-262.
- Araujo-Palomares, C.L., Riquelme, M. und Castro-Longoria, E.** (2009). The polarisome component SPA-2 localizes at the apex of *Neurospora crassa* and partially colocalizes with the Spitzenkörper. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 551-563.
- Asmann, Y.W., Klee, E.W., Thompson, E.A., Perez, E.A., Middha, S., Oberg, A.L., Therneau, T.M., Smith, D.I., Poland, G.A., Wieben, E.D. und Kocher, J.-P.A.** (2009). 3' tag digital gene expression profiling of human brain and universal reference RNA using Illumina Genome Analyzer. *BMC Genomics* **10**, 1-11.
- Åström, S.U., Cline, T.W. und Rine, J.** (2003). The *Drosophila melanogaster* *sir2+* gene is nonessential and has only minor effects on position-effect variegation. *Genetics* **163**, 931-937.
- Atoui, A., Bao, D., Kaur, N., Grayburn, W.S. und Calvo, A.M.** (2008). *Aspergillus nidulans* natural product biosynthesis is regulated by mpkB, a putative pheromone response mitogen-activated protein kinase. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 3596-3600.
- Baarends, W.M., Hoogerbrugge, J.W., Roest, H.P., Ooms, M., Vreeburg, J., Hoeijmakers, J.H.J. und Grootegoed, J.A.** (1999). Histone ubiquitination and chromatin remodeling in mouse spermatogenesis. *Developmental Biology* **207**, 322-333.

- 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.
- Baker, S.E., Kroken, S., Inderbitzin, P., Asvarak, T., Li, B.Y., Shi, L., Yoder, O.C. und Turgeon, B.G.** (2006). Two polyketide synthase-encoding genes are required for biosynthesis of the polyketide virulence factor, T-toxin, by *Cochliobolus heterostrophus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 139-149.
- Balibar, C.J., Howard-Jones, A.R. und Walsh, C.T.** (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nature Chemical Biology* **3**, 584-592.
- Barelle, C.J., Richard, M.L., Gaillardin, C., Gow, N.A.R. und Brown, A.J.P.** (2006). *Candida albicans* *VAC8* is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching. *Eukaryotic Cell* **5**, 359-367.
- 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.
- Bergstrom, G.C. und Nicholson, R.L.** (1999). The biology of corn anthracnose. Knowledge to exploit for improved management. *Plant Disease* **83**, 596-608.
- Bernstein, B.E., Tong, J.K. und Schreiber, S.L.** (2000). Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13708-13713.
- 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., et al.** (2009). Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nature Chemical Biology* **5**, 462-464.
- Bolton, M.D., van Esse, H.P., Vossen, J.H., Jonge, R.d., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J.E., van Den Berg, G.C.M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., Koster, C.G.d., et al.** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Molecular Microbiology* **69**, 119-136.
- Brandão, F.A.S., Derengowski, L.S., Albuquerque, P., Nicola, A.M., Silva-Pereira, I. und Poças-Fonseca, M.J.** (2015). Histone deacetylases inhibitors effects on *Cryptococcus neoformans* major virulence phenotypes. *Virulence* **6**, 618-630.
- Brito, N., Espino, J.J. und González, C.** (2006). The endo- β -1,4-xylanase *xyn11A* is required for virulence in *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**, 25-32.
- Buckingham, S.D., Esmaili, B., Wood, M. und Sattelle, D.B.** (2004). RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Human Molecular Genetics* **13**, R275-R288.
- Buker, S.M., Iida, T., Buhler, M., Villen, J., Gygi, S.P., Nakayama, J.-I. und Moazed, D.** (2007). Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 200-207.
- Candido, E.P.M., Reeves, R. und Davie, J.R.** (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell* **14**, 105-113.
- Carbó, N. und Pérez-Martín, J.** (2008). Spa2 is required for morphogenesis but it is dispensable for pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 1315-1327.

- Chaky, J., Anderson, K., Moss, M. und Vaillancourt, L.** (2001). Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* **91**, 558-564.
- Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S.S., Huang, S.-M., Schurter, B.T., Aswad, D.W. und Stallcup, M.R.** (1999). Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* **284**, 2174-2177.
- Chen, Y., Zhai, S., Sun, Y., Li, M., Dong, Y., Wang, X., Zhang, H., Zheng, X., Wang, P. und Zhang, Z.** (2015). MoTup1 is required for growth, conidiogenesis and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant Pathology* **16**, 799-810.
- Choi, J., Kim, K., Rho, H. und Lee, Y.** (2011). Differential roles of the phospholipase C genes in fungal development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 445-455.
- Choi, J., Kim, Y., Kim, S., Park, J. und Lee, Y.-H.** (2009). *MoCRZI*, a gene encoding a calcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 243-254.
- Chumley, F.G. und Valent, B.** (1990). Genetic analysis of melanin-deficient, non-pathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **3**, 135-143.
- 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.
- Cichewicz, R.H.** (2009). Epigenome manipulation as a pathway to new natural product scaffolds and their congeners. *Natural Product Reports* **27**, 11-22.
- Ciuffetti, L.M., Manning, V.A., Pandelova, I., Betts, M.F. und Martinez, J.P.** (2010). Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *New Phytologist* **187**, 911-919.
- Cogoni, C. und Macino, G.** (1997). Isolation of quelling-defective (*qde*) mutants impaired in posttranscriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10233-10238.
- Cohen, L.A., Marks, P.A., Rifkind, R.A., Amin, S., Desai, D., Pittman, B. und Richon, V.M.** (2002). Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a histone deacetylase inhibitor, suppresses the growth of carcinogen-induced mammary tumors. *Anticancer Research* **22**, 1497-1504.
- Conn, K.L., Traquair, J.A., MacGregor, T., Nguyen, D.T., Martell, L., Petropoulos, L. und Bestermann, J.M.** (2009). A new compound class synergizes with fungicides to inhibit plant pathogenic fungi. In APS 2009 Annual Meeting (Portland, Oregon).
- Cota, L.V., da Costa, R.V., Silva, D.D., Casela, C.R. und Parreira, D.F.** (2012). Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. *Journal of Phytopathology* **160**, 680-684.
- Creusot, F., Acs, G. und Christman, J.K.** (1982). Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 2041-2048.
- Csordas, A.** (1990). On the biological role of histone acetylation. *Biochemical Journal* **265**, 23-38.
- Cumagun, C.J.R., Bowden, R.L., Jurgenson, J.E., Leslie, J.F. und Miedaner, T.** (2004). Genetic mapping of pathogenicity and aggressiveness of *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*) toward wheat. *Phytopathology* **94**, 520-526.

- Cuperlovic-Culf, M. und Culf, A.S.** (2014). Role of histone deacetylases in fungal phytopathogenesis: a review. *International Journal of Modern Botany* **4**, 48-60.
- da Costa, R.V., Cota, L.V., da Silva, D.D., Parreira, D.F., Casela, C.R., Landau, E.C. und Figueiredo, J.E.F.** (2014). Races of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to maize in Brazil. *Crop Protection* **56**, 44-49.
- De Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnoff, N. und Talbot, N.J.** (1997). Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389**, 244-245.
- de Ruijter, A.J.M., Gennip, A.H.v., Caron, H.N., Kemp, S. und van Kuilenburg, A.B.P.** (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Journal* **370**, 737-749.
- 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.
- Deising, H.B., Werner, S. und Wernitz, M.** (2000). The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and Infection* **2**, 1631-1641.
- Desjardins, A.E., Proctor, R.H., Bai, G., McCormick, S.P., Shaner, G., Buechley, G. und Hohn, T.M.** (1996). Reduced virulence of trichothecene-nonproducing mutants of *Gibberella zeae* in wheat field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 775-781.
- Ding, S.-L., Liu, W., Iliuk, A., Ribot, C., Vallet, J., Tao, A., Wang, Y., Lebrun, M.-H. und Xu, J.-R.** (2010). The Tgl1 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, culture cells, plants and bacteria. *Biotechniques* **22**, 88-90.
- Edmondson, D.G., Smith, M.M. und Roth, S.Y.** (1996). Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes & Development* **10**, 1247-1259.
- Egan, M.J., Wang, Z.-Y., Jones, M.A., Smirnoff, N. und Talbot, N.J.** (2007). Generation of reactive oxygen species by fungal NADPH oxidases is required for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 11772-11777.
- Epstein, L., Lusnak, K. und Kaur, S.** (1998). Transformation-mediated developmental mutants of *Glomerella graminicola*. *Fungal Genetics and Biology* **23**, 189-203.
- Eslami, H., Khorramizadeh, M.R., Pourmand, M.R., Moazeni, M. und Rezaie, S.** (2014). Down-regulation of *sidB* gene by use of RNA interference in *Aspergillus nidulans*. *Iranian Biomedical Journal* **18**, 55-59.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R. und Pavletich, N.P.** (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* **401**, 188-193.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. und Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Fisch, K.M., Gillaspay, A.F., Gipson, M., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Jackson, L., Najjar, F.Z., Waegle, H. und Cichewicz, R.H.** (2009). Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **36**, 1199-1213.

- 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.
- Frey, T.J., Weldekidan, T., Colbert, T., Wolters, P.J.C.C. und Hawk, J.A.** (2011). Fitness evaluation of *Rcg1*, a locus that confers resistance to *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. using near-isogenic maize hybrids. *Crop Science* **51**, 1551-1563.
- Fuchs, U., Manns, I. und Steinberg, G.** (2005). Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 2746-2758.
- Gacek, A. und Strauss, J.** (2012). The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**, 1389-1404.
- Gase, I.** (2013). Die Bedeutung der drei α -Glucan-Synthase-Gene *AGS1*, *AGS2* und *AGS3* von *Colletotrichum graminicola* für vegetative und pathogene Entwicklung. Masterarbeit. In Naturwissenschaftlichen Fakultät III, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz (Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), pp. 107.
- Gladfelter, A.S.** (2006). Control of filamentous fungal cell shape by septins and formins. *Nature Reviews Microbiology* **4**, 223-229.
- Goswami, R.S. und Kistler, H.C.** (2005). Pathogenicity and in planta mycotoxin accumulation among members of the *Fusarium graminearum* species complex on wheat and tice. *Phytopathology* **95**, 1397-1404.
- Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M.H. und Levis, C.** (2004). The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves. *Molecular Microbiology* **51**, 619-629.
- Gregoretti, I., Lee, Y.-M. und Goodson, H.V.** (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Biology* **338**, 17-31.
- Griffith, M., Griffith, O.L., Mwenifumbo, J., Goya, R., Morrissy, A.S., Morin, R.D., Corbett, R., Tang, M.J., Hou, Y.-C., Pugh, T.J., et al.** (2010). Alternative expression analysis by RNA sequencing. *Nature Methods* **7**, 843-847.
- Grinberg, A. und Heath, I.B.** (1997). Direct evidence for Ca^{2+} regulation of hyphal branch induction. *Fungal Genetics and Biology* **22**, 127-139.
- Guest, G.M., Lin, X. und Momany, M.** (2004). *Aspergillus nidulans* RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. *Fungal Genetics and Biology* **41**, 13-22.
- Guo, S. und Kempthues, K.J.** (1995). *Par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. und Hannon, G.J.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**, 1146-1150.
- Hecht, A., Laroche, T., Strahl-Bolsinger, S., Gasser, S.M. und Grunstein, M.** (1995). Histone H3 and H4 N-termini interact with SIR3 and SIR4 proteins: A molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* **80**, 583-592.
- Herold, C., Ganslmayer, M., Ocker, M., Hermann, M., Geerts, A., Hahn, E.G. und Schuppan, D.** (2002). The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *Journal of Hepatology* **36**, 233-240.

- Hohn, T.M., Krishna, R. und Proctor, R.H.** (1999). Characterization of a transcriptional activator controlling trichothecene toxin biosynthesis. *Fungal Genetics and Biology* **26**, 224-235.
- Hollender, C. und Liu, Z.** (2008). Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *Journal of Integrative Plant Biology* **50**, 875-885.
- Holliday, R.** (1990). Mechanisms for the control of gene activity during development. *Biological Reviews* **65**, 431-471.
- 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.
- Hou, Z., Xue, C., Peng, Y., Katan, T., Kistler, H.C. und Xu, J.-R.** (2002). A mitogen-activated protein kinase gene (*MGVI*) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1119-1127.
- Hsu, J.-Y., Sun, Z.-W., Li, X., Reuben, M., Tatchell, K., Bishop, D.K., Grushcow, J.M., Brame, C.J., Caldwell, J.A., Hunt, D.F., et al.** (2000). Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**, 279-291.
- Hu, Y., Hao, X., Lou, J., Zhang, P., Pan, J. und Zhu, X.** (2012). A PKS gene, *pks-1*, is involved in chaetoglobosin biosynthesis, pigmentation and sporulation in *Chaetomium globosum*. *Science China Life Sciences* **55**, 1100-1108.
- Idnurm, A. und Howlett, B.J.** (2001). Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology* **2**, 241-255.
- Ito, A., Nishino, N. und Yoshida, M.** (2006). Histone deacetylase inhibitors. In *Histone deacetylases: transcriptional regulation and other cellular functions*, E. Verdin, ed (Totowa, New Jersey: Humana Press), pp. 271-297.
- 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.
- Izumi, Y., Kamei, E., Miyamoto, Y., Ohtani, K., Masunaka, A., Fukumoto, T., Gomi, K., Tada, Y., Ichimura, K., Peever, T.L. und Akimitsu, K.** (2012). Role of the pathotype-specific *ACRTS1* gene encoding a hydroxylase involved in the biosynthesis of host-selective ACR-toxin in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Phytopathology* **102**, 741-748.
- Jacobson, M.K. und Jacobson, E.L.** (1999). Discovering new ADP-ribose polymer cycles: protecting the genome and more. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 415-417.
- Janus, D., Hoff, B., Hofmann, E. und Kück, U.** (2007). An efficient fungal RNA-silencing system using the *DsRed* reporter gene. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 962-970.
- Jelitto, T.C., Page, H.A. und Read, N.D.** (1994). Role of external signals in regulating the pre-penetration phase of infection by the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Planta* **194**, 471-477.
- Jenuwein, T.** (2006). The epigenetic magic of histone lysine methylation. *FEBS Journal* **273**, 3121-3135.
- Jeon, J., Kwon, S. und Lee, Y.-H.** (2014). Histone acetylation in fungal pathogens of plants. *The Plant Pathology Journal* **30**, 1-9.

- Jiang, S.-s., Yin, Y.-p., Song, Z.-y., Zhou, G.-l. und Wang, Z.-k.** (2014). RacA and Cdc42 regulate polarized growth and microsclerotium formation in the dimorphic fungus *Nomuraea rileyi*. *Research in microbiology* **165**, 233-242.
- Jirak-Peterson, J.C. und Esker, P.D.** (2011). Tillage, crop rotation, and hybrid effects on residue and corn anthracnose occurrence in Wisconsin. *Plant Disease* **95**, 601-610.
- Johns, S.A., Leeder, A.C., Safaie, M. und Turner, G.** (2006). Depletion of *Aspergillus nidulans cotA* causes a severe polarity defect which is not suppressed by the nuclear migration mutation *nudA2*. *Molecular Genetics and Genomics* **275**, 593-604.
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. und Mayama, S.** (2003). RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**, 769-776.
- Kaji, A., Saito, R., Nomura, M., Miyamoto, K. und Kiriyama, N.** (1997). Mechanism of the cytotoxicity of asterriquinone, a metabolite of *Aspergillus terreus*. *Anticancer Research* **17**, 3675-3679.
- Kayano, Y., Tanaka, A., Akano, F., Scott, B. und Takemoto, D.** (2013). Differential roles of NADPH oxidases and associated regulators in polarized growth, conidiation and hyphal fusion in the symbiotic fungus *Epichloë festucae*. *Fungal Genetics and Biology* **56**, 87-97.
- Ketting, R.F., Haverkamp, T.H.A., van Luenen, H.G.A.M. und Plasterk, R.H.A.** (1997). *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* **99**, 133-141.
- Khochbin, S. und Wolffe, A.P.** (1997). The origin and utility of histone deacetylases. *FEBS Letters* **419**, 157-160.
- Kim, H.-j., Chen, C., Kabbage, M. und Dickman, M.B.** (2011). Identification and characterization of *Sclerotinia sclerotiorum* NADPH oxidases. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 7721-7729.
- Kim, J.-E., Lee, H.-J., Lee, J., Kim, K.W., Yun, S.-H., Shim, W.-B. und Lee, Y.-W.** (2009). *Gibberella zeae* chitin synthase genes, *GzCHS5* and *GzCHS7*, are required for hyphal growth, perithecia formation, and pathogenicity. *Current Genetics* **55**, 449-459.
- Knechtle, P., Dietrich, F. und Philippsen, P.** (2003). Maximal polar growth potential depends on the polarisome component AgSpa2 in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 4140-4154.
- 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*. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers).
- Kouzarides, T.** (2000). Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *The EMBO Journal* **19**, 1176-1179.
- Krijger, J.-J., Horbach, R., Behr, M., Schweizer, P., Deising, H.B. und Wirsal, 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.
- Kubo, Y., Suzuki, K., Furusawa, I. und Yamamoto, M.** (1982). Effect of tricyclazole on appressorial pigmentation and penetration from appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology* **72**, 1198-1200.
- Kurdistani, S.K. und Grunstein, M.** (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 276-284.

- la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K. und Brunak, S.** (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection* **17**, 527-536.
- Lamoth, F., Juvvadi, P.R. und Steinbach, W.J.** (2015). Histone deacetylase inhibition as an alternative strategy against invasive aspergillosis. *Frontiers in Microbiology* **6**.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al.** (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948.
- Leach, J., Lang, B.R. und Yoder, O.C.** (1982). Methods for selection of mutants and *in vitro* culture of *Cochliobolus heterostrophus*. *Journal of General Microbiology* **128**, 1719-1729.
- Lee, Y., Min, K., Son, H., Park, A.R., Kim, J.-C., Choi, G.J. und Lee, Y.-W.** (2014). ELP3 is involved in sexual and asexual development, virulence, and the oxidative stress response in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**, 1344-1355.
- Leipe, D.D. und Landsman, D.** (1997). Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolyamine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily. *Nucleic Acids Research* **25**, 3693-3697.
- Leng, Y., Wu, C., Liu, Z., Friesen, T.L., Rasmussen, J.B. und Zhong, S.** (2011). RNA-mediated gene silencing in the cereal fungal pathogen *Cochliobolus sativus*. *Molecular Plant Pathology* **12**, 289-298.
- Li, C., Yang, J., Zhou, W., Chen, X.-L., Huang, J.-G., Cheng, Z.-H., Zhao, W.-S., Zhang, Y. und Peng, Y.-L.** (2014). A spindle pole antigen gene *MoSPA2* is important for polar cell growth of vegetative hyphae and conidia, but is dispensable for pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Current Genetics* **60**, 255-263.
- Li, P., Gu, S., Shen, S., Jingao, D., Wu, M., Wang, M., Yang, Y., Zhang, C., Fan, Y. und Han, J.** (2012). *STK1*, a MAP kinase gene from *Setosphaeria turcica*, confers preferable tolerance to sodium salt stress. *African Journal of Microbiology Research*, 6830-6837.
- Li, X., Cai, Q., Mei, H., Zhou, X., Shen, Y., Li, D. und Liu, W.** (2015). The Rpd3/Hda1 family of histone deacetylases regulates azole resistance in *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**, 1993-2003.
- 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.
- Lin, J.-r. und Hu, J.** (2013). SeqNLS: nuclear localization signal prediction based on frequent pattern mining and linear motif scoring. *PLoS ONE* **8**, e76864.
- Lingner, U., Münch, S., Sode, B., Deising, H.B. und Sauer, N.** (2011). Functional characterization of a eukaryotic melibiose transporter. *Plant Physiology* **156**, 1565-1576.
- Liu, H., Wang, P., Gong, G., Wang, L., Zhao, G. und Zheng, Z.** (2013a). Morphology engineering of *Penicillium chrysogenum* by RNA silencing of chitin synthase gene. *Biotechnology Letters* **35**, 423-429.
- Liu, N., Fan, F., Qiu, D. und Jiang, L.** (2013b). The transcription cofactor FgSwi6 plays a role in growth and development, carbendazim sensitivity, cellulose utilization, lithium tolerance, deoxynivalenol production and virulence in the filamentous fungus *Fusarium graminearum*. *Fungal Genetics and Biology* **58-59**, 42-52.

- 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.
- Loehrer, M., Botterweck, J., Jahnke, J., Mahlmann, D.M., Gaetgens, J., Oldiges, M., Horbach, R., Deising, H. und Schaffrath, U.C.** (2014). In vivo assessment by Mach-Zehnder double-beam interferometry of the invasive force exerted by the Asian soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi*). *New Phytologist* **203**, 620-631.
- Lopes da Rosa, J., Boyartchuk, V.L., Zhu, L.J. und Kaufman, P.D.** (2010). Histone acetyltransferase Rtt109 is required for *Candida albicans* pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 1594-1599.
- Ludwig, N.** (2012). Penetrationskompetenz pflanzenpathogener Pilze. Dissertation. In Naturwissenschaftlichen Fakultät III, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz (Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), pp. 142.
- 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.
- Maier, F.J., Miedaner, T., Haderl, B., Felk, A., Salomon, S., Lemmens, M., Kassner, H. und Schäfer, W.** (2006). Involvement of trichothecenes in fusarioses of wheat, barley and maize evaluated by gene disruption of the trichodiene synthase (*Tri5*) gene in three field isolates of different chemotype and virulence. *Molecular Plant Pathology* **7**, 449-461.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25075-25084.
- Matiello, R.R., Lopes, M.T.G., Brunelli, K.R. und Camargo, L.E.A.** (2013). Comparison of yield damage of tropical maize hybrids caused by anthracnose stalk rot. *Tropical Plant Pathology* **38**, 128-132.
- McCarthy, D.J., Chen, Y. und Smyth, G.K.** (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research* **40**, 4288-4297.
- McGoldrick, C.A., Gruver, C. und May, G.S.** (1995). *myoA* of *Aspergillus nidulans* encodes an essential myosin I required for secretion and polarized growth. *The Journal of Cell Biology* **128**, 577-587.
- Mercure, E.W., Leite, B. und Nicholson, R.L.** (1994a). Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**, 421-440.
- Mercure, E.W., Kunoh, H. und Nicholson, R.L.** (1994b). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**, 407-420.
- Mesterházy, Á.** (2002). Role of deoxynivalenol in aggressiveness of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* and in resistance to *Fusarium* head blight. *European Journal of Plant Pathology* **108**, 675-684.

- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. und Matzke, A.J.M.** (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal* **19**, 5194-5201.
- Meyer, V., Arentshorst, M., van den Hondel, C.A.M.J.J. und Ram, A.F.J.** (2008). The polarisome component SpaA localises to hyphal tips of *Aspergillus niger* and is important for polar growth. *Fungal Genetics and Biology* **45**, 152-164.
- Michielse, C.B., van Wijk, R., Reijnen, L., Manders, E.M.M., Boas, S., Olivain, C., Alabouvette, C. und Rep, M.** (2009). The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathog* **5**, e1000637.
- Mickel, A.** (2010). Die Bedeutung epigenetischer Faktoren für die Differenzierung von Infektionsstrukturen und Pathogenität des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*. Diplomarbeit. In Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Institut für Biologie (Halle (Saale): Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg), pp. 107.
- 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.
- 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.
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh, E. A., Matsui, Y. und Issei Mabuchi, I.** (2002). The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *Journal of Cell Science* **115**, 4629-4639.
- 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.
- Napoli, C., Lemieux, C. und Jorgensen, R.** (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *The Plant Cell* **2**, 279-289.
- Nei, M. und Kumar, S.** (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. (Oxford University Press).
- Ng, H.-H. und Bird, A.** (1999). DNA methylation and chromatin modification. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**, 158-163.
- Nguyen, Q.B., Itoh, K., van Vu, B., Tosa, Y. und Nakayashiki, H.** (2011). Simultaneous silencing of endo- β -1,4 xylanase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Microbiology* **81**, 1008-1019.
- Nishino, T.G., Miyazaki, M., Hoshino, H., Miwa, Y., Horinouchi, S. und Yoshida, M.** (2008). 14-3-3 regulates the nuclear import of class IIa histone deacetylases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **377**, 852-856.
- Nützmann, H.-W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schumann, 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., et al.** (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature Genetics* **44**, 1060-1065.
- Odds, F.C.** (1997). Switch of phenotype as an escape mechanism of the intruder. *Mycoses* **40**, 9-12.
- Oliveira-Garcia, E. und Deising, H.B.** (2013). Infection structure specific expression of β -1,3-glucan synthase is essential for pathogenicity of *Colletotrichum graminicola* and evasion of β -glucane triggered immunity in maize. *The Plant Cell* **25**, 2356-2378.
- Oliveira-Garcia, E. und Deising, H.B.** (2016). Attenuation of PAMP-triggered immunity in maize requires down-regulation of the key β -1,6-glucan synthesis genes *KRE5* and *KRE6* in biotrophic hyphae of *Colletotrichum graminicola*. *The Plant Journal* **87**, 355-375.
- 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.
- Parisot, D., Dufresne, M., Veneault, C., Laugé, R. und Langin, T.** (2002). *clap1*, a gene encoding a copper-transporting ATPase involved in the process of infection by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Molecular Genetics and Genomics* **268**, 139-151.
- Park, G., Xue, C., Zheng, L., Lam, S. und Xu, J.-R.** (2002). *MST12* regulates infectious growth but not appressorium formation in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 183-192.
- Park, G., Bruno, K.S., Staiger, C.J., Talbot, N.J. und Xu, J.-R.** (2004). Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. *Molecular Microbiology* **53**, 1695-1707.
- Pascholati, S.F., Deising, H., Leite, B., Anderson, D. und Nicholson, R.L.** (1993). Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**, 37-51.
- Pedley, K.F. und Walton, J.D.** (2001). Regulation of cyclic peptide biosynthesis in a plant pathogenic fungus by a novel transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 14174-14179.
- Perfect, S.E. und Green, J.R.** (2001). Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. *Molecular Plant Pathology* **2**, 101-108.
- 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.
- Pfaller, M.A., Messer, S.A., Georgopapadakou, N., Martell, L.A., Besterman, J.M. und Diekema, D.J.** (2009). Activity of MGCD290, a Hos2 histone deacetylase inhibitor, in combination with azole antifungals against opportunistic fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* **47**, 3797-3804.
- Price, C.L., Parker, J.E., Warrilow, A.G.S., Kelly, D.E. und Kelly, S.L.** (2015). Azole fungicides – understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science* **71**, 1054-1058.
- Proctor, R.H., Hohn, T.M. und McCormick, S.P.** (1995a). Reduced virulence of *Gibberelle zae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 593-601.

- Proctor, R.H., Hohn, T.M., McCormick, S.P. und Desjardins, A.E.** (1995b). *Tri6* encodes an unusual zinc finger protein involved in the regulation of trichothecene biosynthesis in *Fusarium sporotrichoides*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1923-1930.
- Punt, P.J., Oliver, R.P., Dingemans, 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.
- Reichmann, M., Jannischek, 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., 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.
- 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.
- Rice, P., Longden, I. und Bleasby, A.** (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* **16**, 276-277.
- Riquelme, M.** (2013). Tip Growth in Filamentous Fungi: A Road Trip to the Apex. *Annual Review of Microbiology* **67**, 587-609.
- 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. und Smyth, G.K.** (2008). Small-sample estimation of negative binomial dispersion, with applications to SAGE data. *Biostatistics* **9**.
- 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.
- Russo, V.E.A., Martienssen, R.A. und Riggs, A.D.** (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Sawa, H., Murakami, H., Ohshima, Y., Sugino, T., Nakajyo, T., Kisanuki, T., Tamura, Y., Satone, A., Ide, W., Hashimoto, I. und Kamada, H.** (2001). Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathology* **18**, 109-114.
- Schliebner, I., Becher, R., Hempel, M., Deising, H.B. und Horbach, R.** (2014). New gene models and alternative splicing in the maize pathogen *Colletotrichum graminicola* revealed by RNA-Seq analysis. *BMC Genomics* **15**, 842.
- Scott, B. und Eaton, C.J.** (2008). Role of reactive oxygen species in fungal cellular differentiations. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 488-493.
- Sellès, P.** (2005). Synthesis and biological evaluation of himanimide C and unnatural analogues. *Organic Letters* **7**, 605-608.
- Semighini, C.P. und Harris, S.D.** (2008). Regulation of apical dominance in *Aspergillus nidulans* hyphae by reactive oxygen species. *Genetics* **179**, 1919-1932.

- Shi, Y. und He, M.** (2014). Differential gene expression identified by RNA-Seq and qPCR in two sizes of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Gene* **538**, 313-322.
- Siegmund, U., Heller, J., van Kann, J.A.L. und Tudzynski, P.** (2013). The NADPH oxidase complexes in *Botrytis cinerea*: evidence for a close association with the ER and the tetraspanin Pls1. *PLoS ONE* **8**, e55879.
- Simpson, R.T.** (1978). Structure of the chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* **17**, 5524-5531.
- Skamnioti, P. und Gurr, S.J.** (2007). *Magnaporthe grisea* cutinase2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence. *The Plant Cell* **19**, 2674-2689.
- Smith, K.M., Dobosy, J.R., Reifsnyder, J.E., Rountree, M.R., Anderson, D.C., Green, G.R. und Selker, E.U.** (2010). H2B- and H3-specific histone deacetylases are required for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Genetics* **186**, 1207-U1242.
- Smith, W.L. und Edlind, T.D.** (2002). Histone deacetylase inhibitors enhance *Candida albicans* sensitivity to azoles and related antifungals: correlation with reduction in *CDR* and *ERG* upregulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3532-3539.
- 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.
- Spencer, V.A. und Davie, J.R.** (1999). Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* **240**, 1-12.
- Srikantha, T., Tsai, L., Daniels, K., Klar, A.J.S. und Soll, D.R.** (2001). The histone deacetylase genes *HDA1* and *RPD3* play distinct roles in regulation of high-frequency phenotypic switching in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **183**, 4614-4625.
- Strauss, J. und Reyes-Dominguez, Y.** (2011). Regulation of secondary metabolism by chromatin structure and epigenetic codes. *Fungal Genetics and Biology* **48**, 62-69.
- 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.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. und Mello, C.C.** (1995). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-132.
- Tag, A., Hicks, J., Garifullina, G., Ake, C.J., Phillips, T.D., Beremand, M. und Keller, N.** (2000). G-protein signalling mediates differential production of toxic secondary metabolites. *Molecular Microbiology* **38**, 658-665.
- Takaoka, S., Kurata, M., Harimoto, Y., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K. und Tsuge, T.C.** (2014). Complex regulation of secondary metabolism controlling pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *New Phytologist* **202**, 1297-1309.
- Takemoto, D., Tanaka, A. und Scott, B.** (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology* **44**, 1065-1076.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. und Kumar, S.** (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**, 2725-2729.
- Thiagalingam, S.A.M., Cheng, K.-H., Lee, H.J., Mineva, N., Thiagalingam, A. und Ponte, J.F.** (2003). Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code. *Annals of the New York Academy of Sciences* **983**, 84-100.
- Thoma, F., Koller, T. und Klug, A.** (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *The Journal of Cell Biology* **83**, 403-427.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Timmermann, S., Lehrmann, H., Polesskaya, A. und Harel-Bellan, A.** (2001). Histone acetylation and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **58**, 728-736.
- Tissenbaum, H.A. und Guarente, L.** (2001). Increased dosage of a *sir-2* gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **410**, 227-230.
- Tribus, M., Bauer, I., Galehr, J., Rieser, G., Trojer, P., Brosch, G., Loidl, P., Haas, H. und Graessle, S.** (2010). A novel motif in fungal class 1 histone deacetylases is essential for growth and development of *Aspergillus*. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 345-353.
- Tscherner, M., Stappler, E., Hnisz, D. und Kuchler, K.** (2012). The histone acetyltransferase Hat1 facilitates DNA damage repair and morphogenesis in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology* **86**, 1197-1214.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., Egusa, M., Yamamoto, M. und Otani, H.** (2012). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews* **37**, 44-66.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y. und Koizumi, K.** (1976). New antifungal antibiotic, trichostatin. *Journal of Antibiotics* **29**, 1-6.
- Tudzynski, P., Heller, J. und Siegmund, U.** (2012). Reactive oxygen species generation in fungal development and pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **15**, 653-659.
- Tudzynski, P., Sharon, A., Dilip, K.A. und Khachatourians, G.G.** (2003). 9 - Fungal Pathogenicity Genes. In *Applied Mycology and Biotechnology* (Elsevier), pp. 187-212.
- 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 Vu, B., Itoh, K., Nguyen, Q.B., Tosa, Y. und Nakayashiki, H.** (2012). Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1135-1141.
- Veneault-Fourrey, C., Laugé, R. und Langin, T.** (2005a). Nonpathogenic strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4761-4770.
- Veneault-Fourrey, C., Baroah, M., Egan, M., Wakley, G. und Talbot, N.J.** (2006). Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus. *Science* **312**, 580-583.

- Veneault-Fourrey, C., Parisot, D., Gourgues, M., Lauge, R., Lebrun, M.H. und Langin, T. (2005b). The tetraspanin gene *CIPLS1* is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Genetics and Biology* **42**, 306-318.
- Verdin, E., Dequiedt, F. und Kasler, H.G. (2003). Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends in Genetics* **19**, 286-293.
- Virag, A. und Harris, S.D. (2006). Functional characterization of *Aspergillus nidulans* homologues of *Saccharomyces cerevisiae* Spa2 and Bud6. *Eukaryotic Cell* **5**, 881-895.
- Visentin, I., Montis, V., Doll, K., Alabouvette, C., Tamietti, G., Karlovsky, P. und Cardinale, F. (2012). Transcription of genes in the biosynthetic pathway for fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Eukaryotic Cell* **11**, 252-259.
- Waddington, C.H. (1942). L'épigénotype. *Endeavour* **1**, 18-20.
- Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J. und Sauer, N. (2010). A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. *PLoS Biol* **8**, e1000303.
- Warren, L.H., Nicholson, R.L., Ullstrup, A.J. und Sharvelle, E.G. (1973). Observations of *Colletotrichum graminicola* on sweet corn in Indiana. *Plant Disease Reporter* **57**, 143-144.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. und Sängler, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567-576.
- Weber, I., Gruber, C. und Steinberg, G. (2003). A class-V myosin required for mating, hyphal growth, and pathogenicity in the dimorphic plant pathogen *Ustilago maydis*. *The Plant Cell* **15**, 2826-2842.
- 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. (1993). Wall growth, protein excretion and morphogenesis in fungi. *The New Phytologist* **123**, 397-413.
- Wiemann, P., Sieber, C.M.K., von Barga, K.W., Studt, L., Niehaus, E.-M., Espino, J.J., Huss, K., Michielse, C.B., Albermann, S., Wagner, D., *et al.* (2013). Deciphering the cryptic Genome: genome-wide analyses of the rice pathogen *Fusarium fujikuroi* reveal complex regulation of secondary metabolism and novel metabolites. *PLoS Pathog* **9**, e1003475.
- Williams, R.B., Henrikson, J.C., Hoover, A.R., Lee, A.E. und Cichewicz, R.H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. *Organic & Biomolecular Chemistry* **6**, 1895-1897.
- Wolffe, A.P. und Hayes, J.J. (1999). Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Research* **27**, 711-720.
- Wolkow, P.M., Sisler, H.D. und Vigil, E.L. (1983). Effect of inhibitors of melanin biosynthesis on structure and function of appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology* **23**, 55-71.

- Wu, A.R., Neff, N.F., Kalisky, T., Dalerba, P., Treutlein, B., Rothenberg, M.E., Mburu, F.M., Mantalas, G.L., Sim, S., Clarke, M.F. und Quake, S.R.** (2014). Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nature Methods* **11**, 41-46.
- Xu, J.R., Urban, M., Sweigard, J.A. und Hamer, J.E.** (1997). The *CPKA* gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 187-194.
- Yabuta, T.** (1935). Biochemistry of the bakanae fungus of rice. *Agriculture and Horticulture* **10**, 17-22.
- Yamamoto, Y., Kiriya, S., Shimizu, S. und Koshimura, S.** (1976). Antitumor activity of asterrequinone, a metabolic product from *Aspergillus terreus*. *Gann* **67**, 623-624.
- Yang, X.-J. und Grégoire, S.** (2005). Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 2873-2884
- Yang, X.J. und Seto, E.** (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene* **26**, 5310-5318.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. und Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yoshida, M., Horinouchi, S. und Beppu, T.** (1995). Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays* **17**, 423-430.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. und Beppu, T.** (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 17174-17179.
- 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 & Biology* **41**, 973-981.
- Zhang, S.-R., Hao, Z.-M., Wang, L.-H., Shen, S., Cao, Z.-Y., Xin, Y.-Y., Hou, M.-L., Gu, S.-Q., Han, J.-M. und Dong, J.-G.** (2012). StRas2 regulates morphogenesis, conidiation and appressorium development in *Setosphaeria turcica*. *Microbiological Research* **167**, 478-486.
- Zheng, W., Zhao, Z., Chen, J., Liu, W., Ke, H., Zhou, J., Lu, G., Darvill, A.G., Albersheim, P., Wu, S. und Wang, Z.** (2009). A Cdc42 ortholog is required for penetration and virulence of *Magnaporthe grisea*. *Fungal Genetics and Biology* **46**, 450-460.
- Zhu, C.-C., Hou, Y.-J., Han, J., Cui, X.-S., Kim, N.-H. und Sun, S.-C.** (2014). Zearalenone exposure affects epigenetic modifications of mouse eggs. *Mutagenesis* **29**, 489-495.

Anhang

I. Multiples HDAC-Alignment

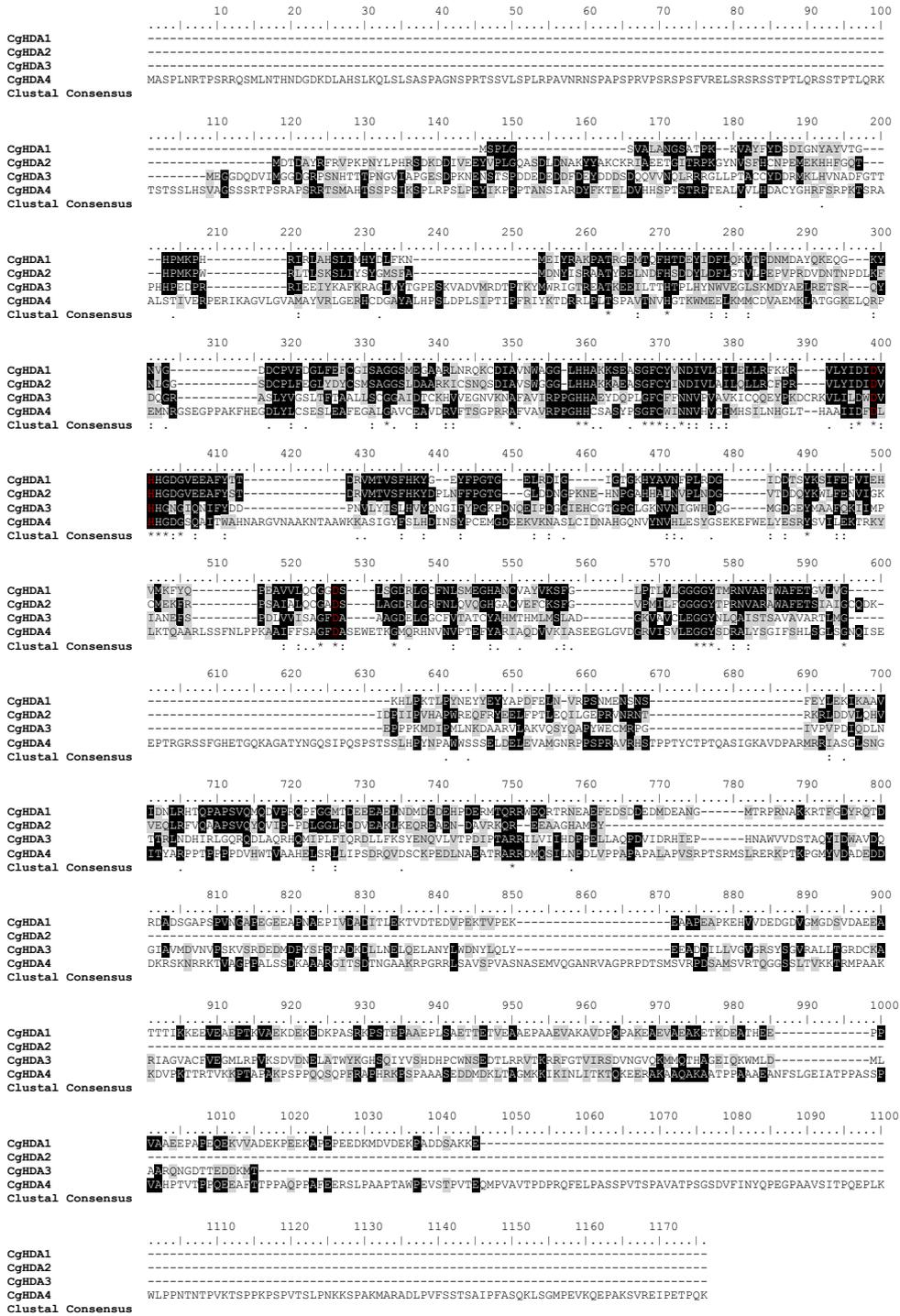


Abb. 35: Multiples Protein Sequence Alignment der vier zinkabhängigen Histondeacetylasen aus *C. graminicola*.

Das Alignment wurde mittels CLUSTALW erstellt. Rot markierte Aminosäuren kennzeichnen die Zinkbindestellen.

II. DMSO-Vorversuch

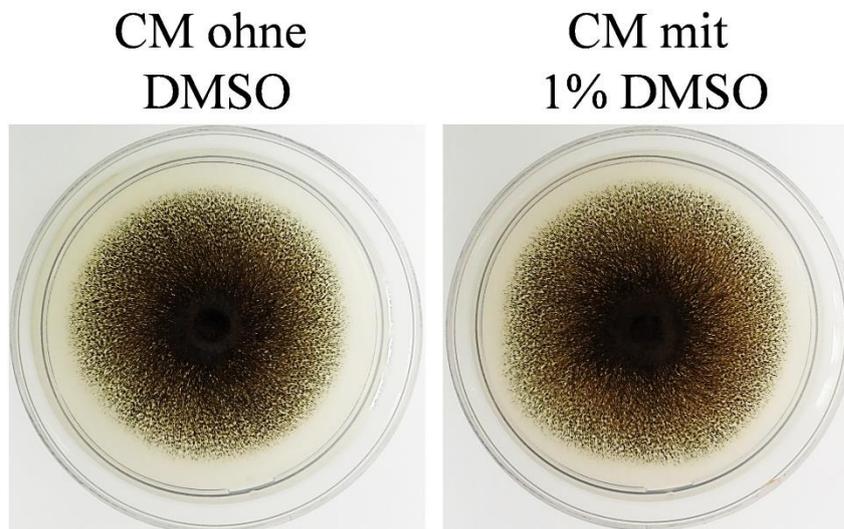


Abb. 36: Wachstumsversuch zur Überprüfung möglicher Effektes von DMSO.

Da Trichostatin A in DMSO gelöst war, musste überprüft werden, ob bereits das Lösungsmittel zu Wachstumsdefekten oder einer veränderten Koloniemorphologie führen kann. Hierfür wurden CM-Agarplatten ohne und mit 1 % DMSO mit Agarblöckchen des Wildtyps inokuliert. Die Kulturen wurden 6 Tage nach Inokulation fotografiert. Das Lösungsmittel DMSO führte zu keinen morphologisch sichtbaren Veränderungen von *C. graminicola*.

III. DNA-Methyltransferase-Inhibitor: 5-Azacytidin

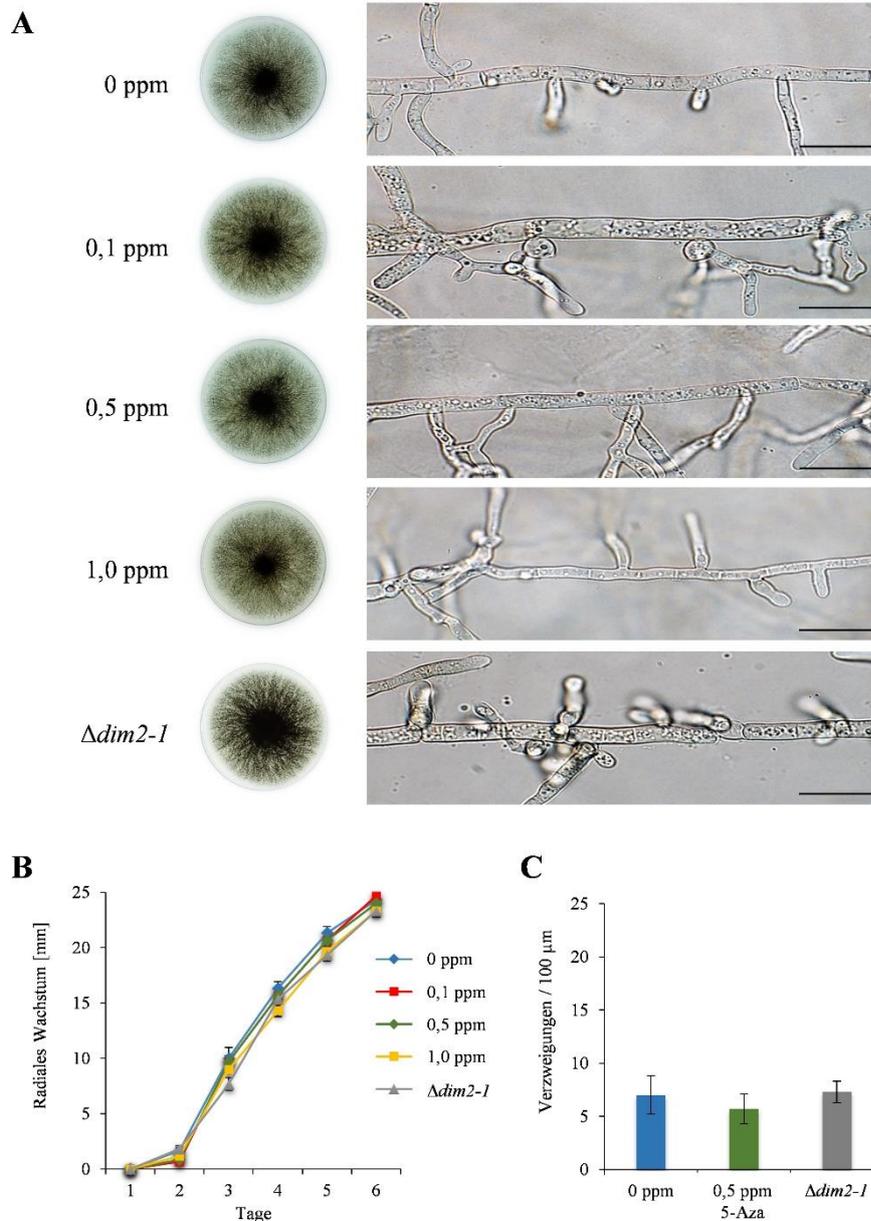


Abb. 37: Effekt von 5-Azacytidin (5-Aza) auf vegetatives Wachstum, Koloniemorphologie und Verzweigung.

- (A) Wachstumsversuch. CM-Agarplatten unterschiedlicher 5-Azacytidin-Konzentrationen wurden mit Agarblöckchen des Wildtyps bzw. mit dem $\Delta dim2-1$ inokuliert. Die Kulturen wurden 6 Tage nach Inokulation fotografiert. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurden Objektträger mit CM-Agarmedium beschichtet, inokuliert und 6 dpi mikroskopiert. Maßstab = 20 μm .
- (B) Radiales Wachstum des Wildtyps auf CM-Agarplatten unterschiedlicher 5-Azacytidin-Konzentrationen bzw. von $\Delta dim2-1$. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Es wurden keine signifikante Unterschiede ermittelt (n = 3, T-Test, p > 0,05).
- (C) Quantifizierung von Verzweigungen. Über eine Länge von 100 μm wurden Verzweigungsereignisse gezählt. Es wurden keine signifikante Unterschiede ermittelt (n = 3, T-Test, p > 0,05).

IV. PCR zum Nachweis der RNAi-Fragmente

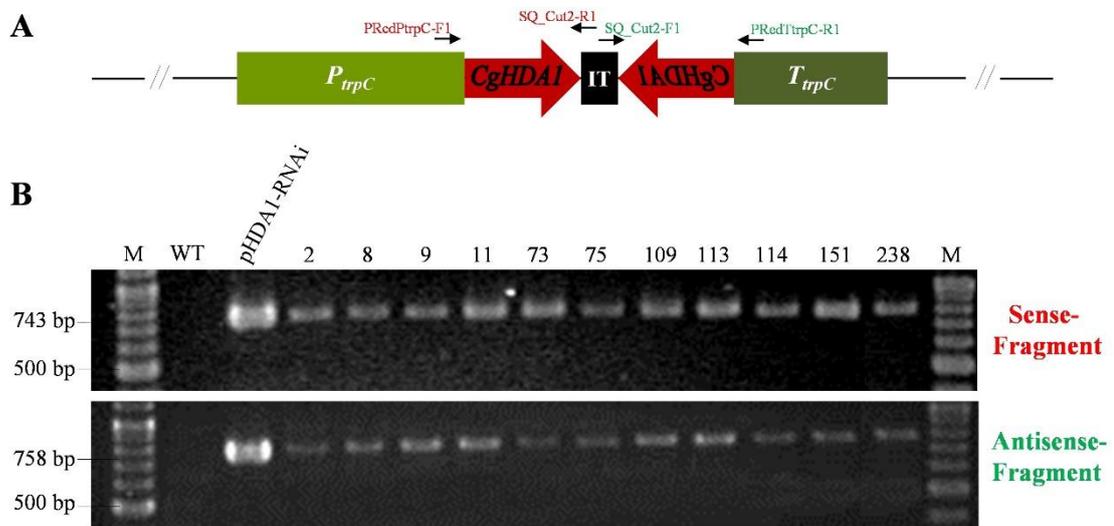


Abb. 38: Nachweis der RNAi-Fragmente.

(A) Nachweisstrategie. IT = Intron.

(B) Dieser PCR-Nachweis zeigt, dass von allen unabhängigen Isolaten sowohl ein 743 bp langer Bereich, welcher das Sense-Fragment enthält, als auch ein 758 bp langer Bereich, welcher das Antisense-Fragment enthält, amplifiziert werden konnte. Da der Wildtyp nicht über den pRNAi-HDA1-Vektor verfügt, konnten hier keine Produkte amplifiziert werden. Als Positivkontrolle wurde der finale pRNAi-HDA1-Vektor mitgeführt, welcher über beide RNAi-Fragmente verfügt. Die oben genannten Primer wurden auch für die Sequenzierung genutzt. Die Nummern bezeichnen unabhängige Isolate. M = Größenmarker.

V. PCR zum Nachweis des Wildtyp-Gens und des Selektionsmarkers

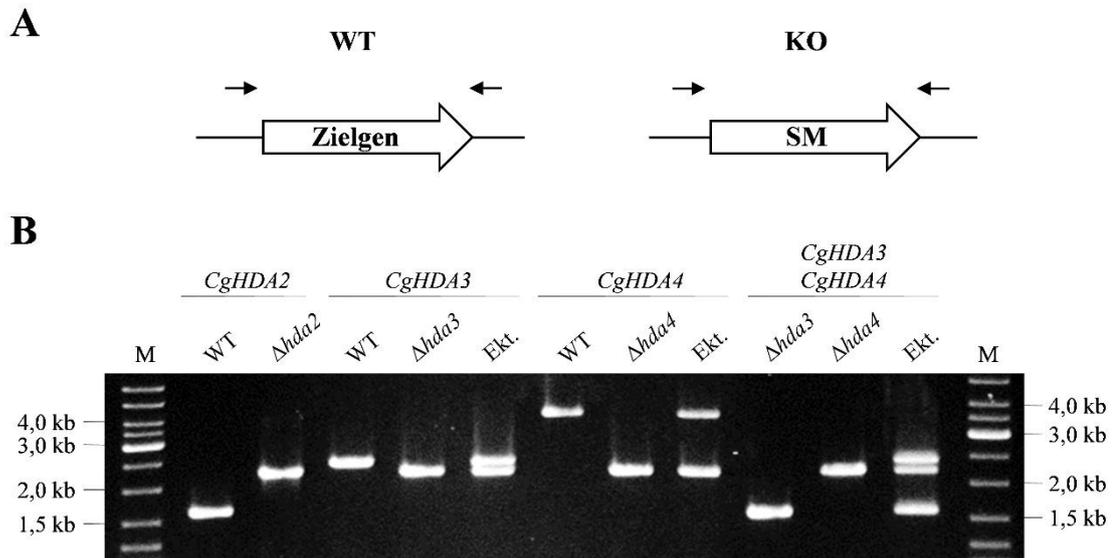


Abb. 39: Nachweis des Wildtyp-Gens und des Selektionsmarkers mittels PCR.

jeweils entweder das WT-Gen, den verwendeten Selektionsmarker bei Deletionsmutanten oder WT-Gen und Selektionsmarker bei Transformanten mit ektopischer Integration der Resistenzkassette. Diese Primer wurden auch genutzt, um vor dem Southern Blot eine Selektion von Transformanten durchzuführen. SM = Selektionsmarker.

(B) Ergebnis der PCR. Pro Kandidatengen wurde die Reaktion für das WT-Gen, eine Deletionsmutante (KO) sowie eine Transformante mit ektopischer Integration der Resistenzkassette (Ekt.) (insofern vorhanden) aufgetragen. M = Größenmarker.

CgHDA2: WT 1592 bp, KO 2197 bp (Selektionsmarker Hygromycin B)
CgHDA3: WT 2399 bp, KO 2195 bp (Selektionsmarker Hygromycin B)
CgHDA4: WT 3669 bp, KO 2186 bp (Selektionsmarker Hygromycin B)

Zur Generierung des $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstammes wurde *CgHDA3* im $\Delta hda4$ -Stamm deletiert. Das *CgHDA3*-Deletionskonstrukt trug Nourseothricin als Selektionsmarker. Das Vorhandensein dieser Kasette wurde durch ein 1573 bp langes Fragment nachgewiesen, während die Hygromycin B-Resistenzkassette durch ein 2186 bp Fragment bestätigt wurde. Die Transformante mit ektopischer Integration der Nourseothricin-Resistenzkassette zeigt neben diesen beiden Fragmenten auch das *CgHDA3* WT-Gen mit 2399 bp (um die Produkte in einer Spur darzustellen wurden die Reaktionen für den *CgHDA3*- und *CgHDA4*-Lokus gemischt und aufgetragen).

VI. Übersichtsaufnahmen I

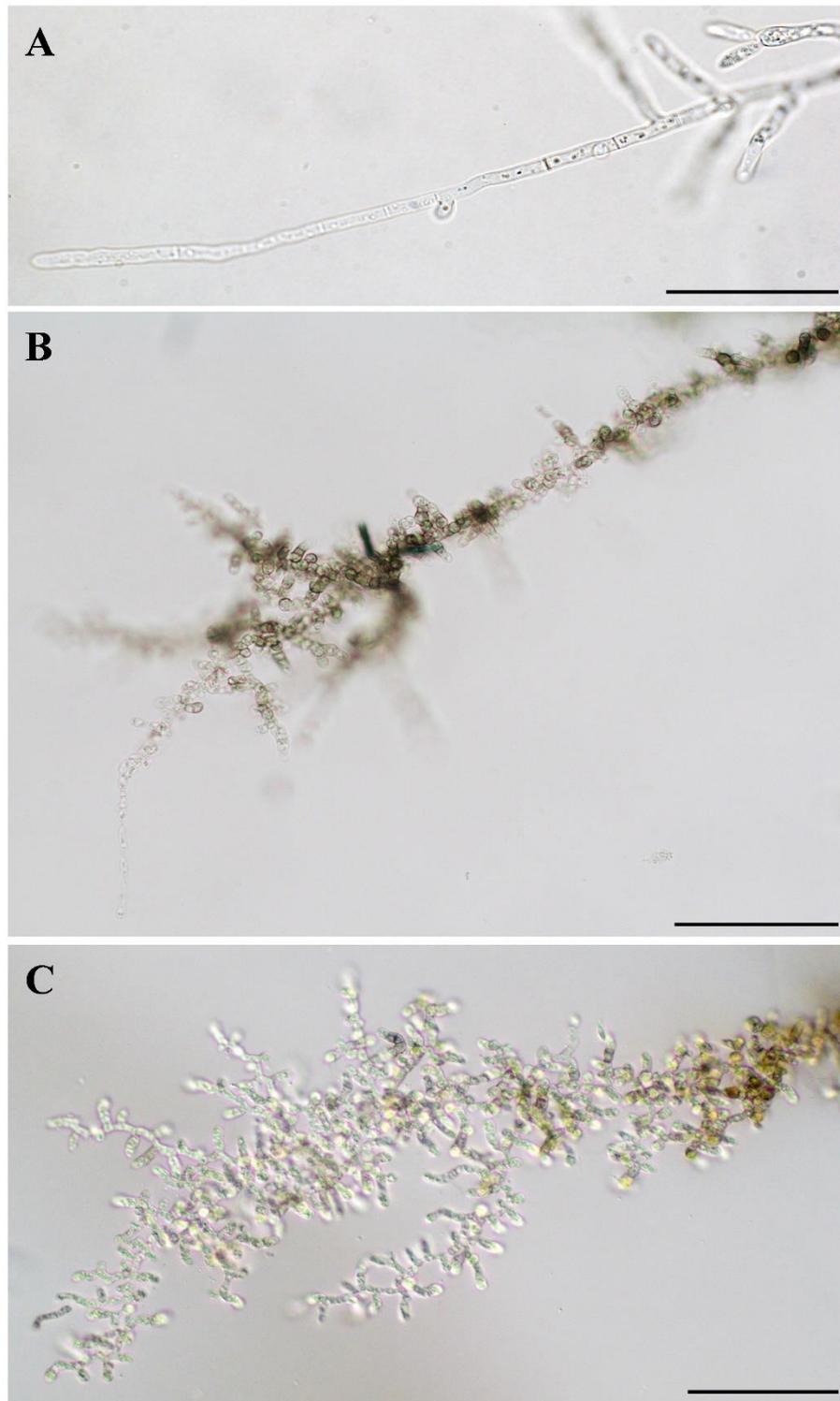


Abb. 40: Übersichtsaufnahmen von Hyphenspitzen auf soliden Medien.

Hyphenspitzen von Wildtyp (A) und den *HDA1* RNAi-Isolaten 11 (B) und 73 (C) auf Regenerationsmedium. Maßstab = 50 μ m.

Im Vergleich zum Wildtyp verzweigen *HDA1* RNAi-Isolate frühzeitig und sind durch eine vermehrte Pigmenteinlagerung charakterisiert. Isolat 73 weist einen ausgeprägteren Verzweigungsphänotyp auf, sodass die Führungshyphe durch den Polaritätsverlust nahezu nicht zu erkennen ist. Das *HDA1* RNAi-114-Isolat weist den gleichen Phänotyp auf wie Isolat 11 und wurde daher nicht gezeigt.

VII. Übersichtsaufnahmen II

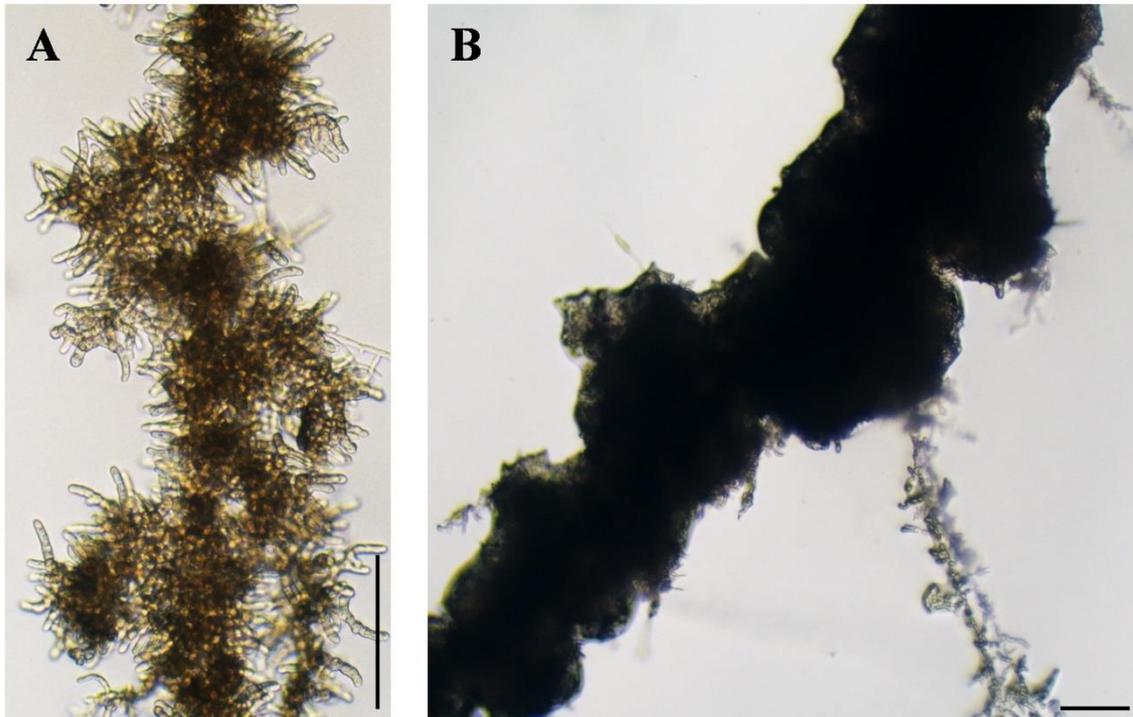


Abb. 41: Übersichtsaufnahmen von Hyphen.

(A) und (B) Übersichtsaufnahmen von Hyphen von *HDAl* RNAi-Isolaten auf solidem Medium (Komplettmedium). Maßstab = 100 μm .

VIII. Symptomausprägung auf Mikado und multiple Keimung

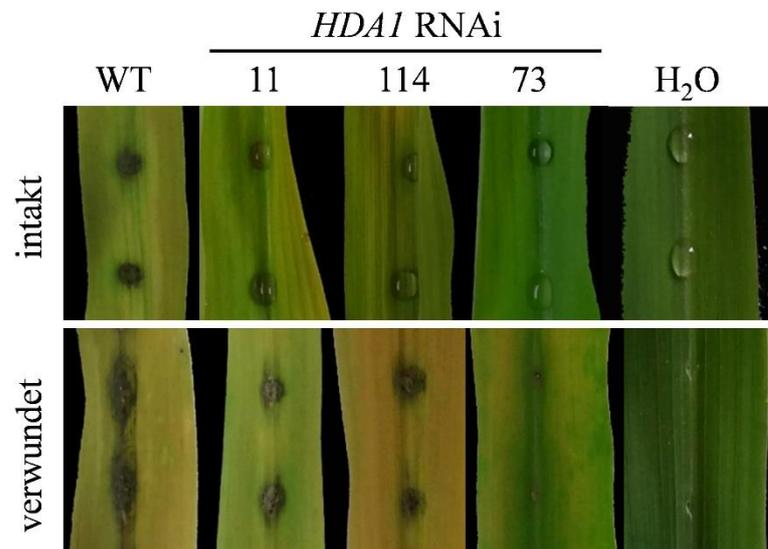


Abb. 42: Infektionsassay mit Wildtyp (WT) und *HDAI* RNAi-Stämmen auf der Maissorte Mikado.

Die Symptomaufnahme erfolgte 5 dpi. Auch auf der Sorte Mikado konnte die im Vergleich zum Wildtyp verminderte Symptomausprägung reproduziert werden.

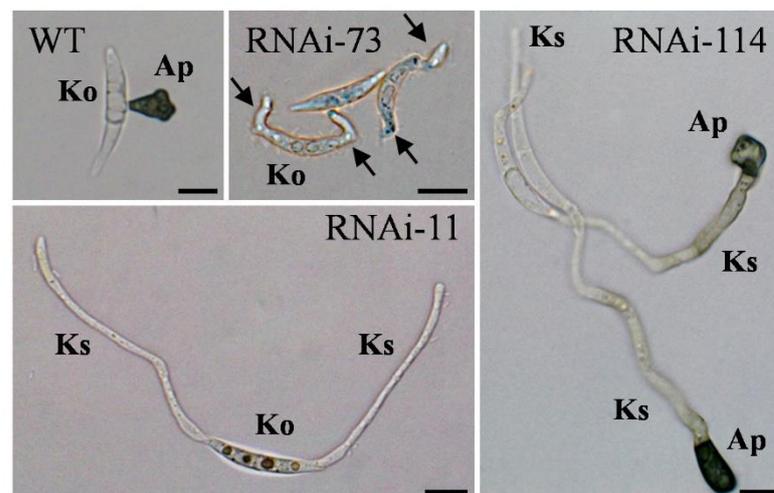


Abb. 43: Multiple Keimung der RNAi-Isolate *in vitro*.

Deckgläser wurden mit 10 µl-Tropfen einer 10⁵ Sporen/ml-Konidien-suspension von Wildtyp (WT) und RNAi-Isolaten inokuliert und nach 24 h mikroskopiert. Pfeile weisen auf hakenförmige Keimschläuche. Maßstab = 10 µm.

IX. Stängelinfektionstests

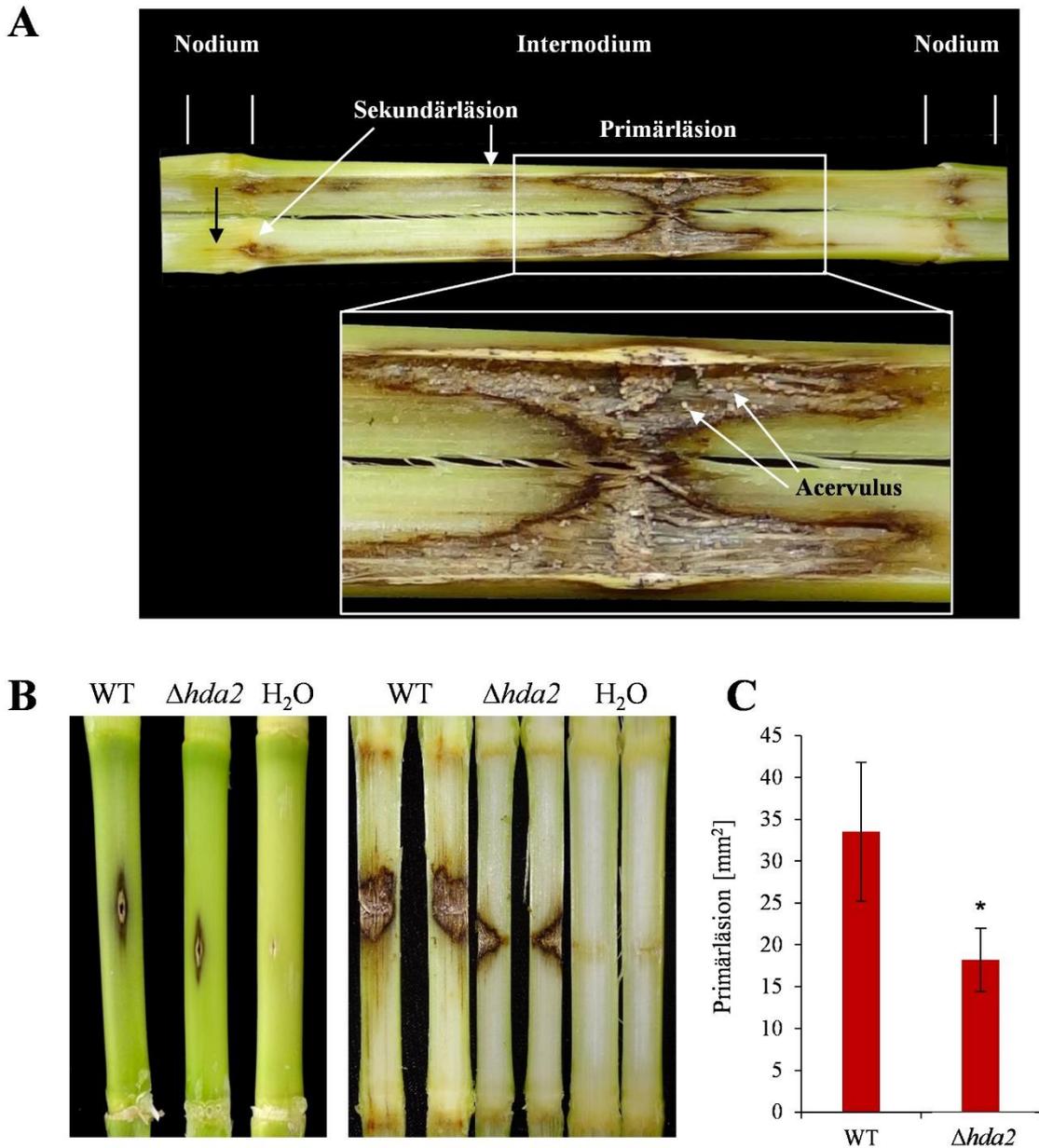


Abb. 44: Stängelinfektion.

- (A) Beschreibende Detailstudie einer Stängelinfektion durch den Wildtyp. Der schwarze Pfeil weist auf eine Progression der Infektion über das Nodium ins das Internodium.
- (B) Stängelinfektionstest von Wildtyp (WT) und $\Delta hda2$ -Deletionsmutante. Um die Progression der Infektion im Stängel zu bonitieren, wurden diese in Längsrichtung gespalten. Die Symptome wurden 14 dpi fotografiert. Während der Wildtyp in der Lage war, in das nächste Internodium vorzudringen, war es der $\Delta hda2$ -Deletionsmutante nicht möglich, Sekundärläsionen hervorzurufen (rechte Bildserie).
- (C) Quantifizierung der Primärläsion. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen WT-Isolat und $\Delta hda2$ -Stamm sind mit einem * gekennzeichnet (n = 6, T-Test, p < 0,05).

X. Quantifizierung von Infektionsstrukturen

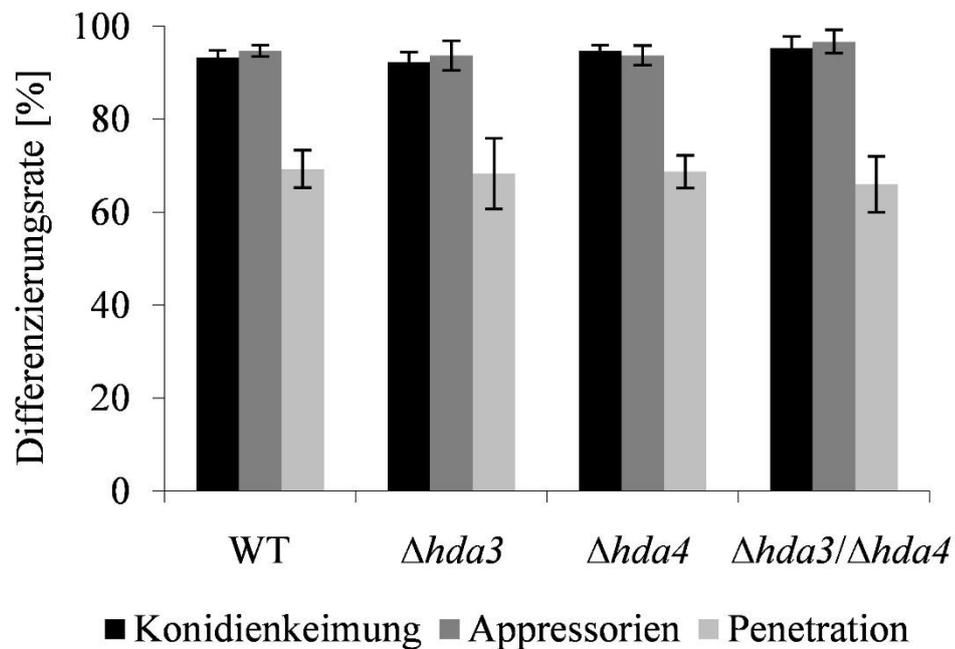


Abb. 45: Quantifizierung von Infektionsstrukturen von Wildtyp und den $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie dem $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstamm.

14 Tage alte Maisblätter der Sorte Golden Jubilee wurden mit den oben genannten Stämmen inokuliert und die Infektionsstrukturen nach zwei Tagen gezählt. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten mit Standardabweichungen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT-Isolat und den $\Delta hda3$ - bzw. $\Delta hda4$ -Deletionsstämmen sowie dem $\Delta hda3/\Delta hda4$ -Doppeldeletionsstamm ermittelt werden ($n = 300$, T-Test, $p > 0,05$).

XI. Erzeugung von *eGFP*-Reporterstämmen

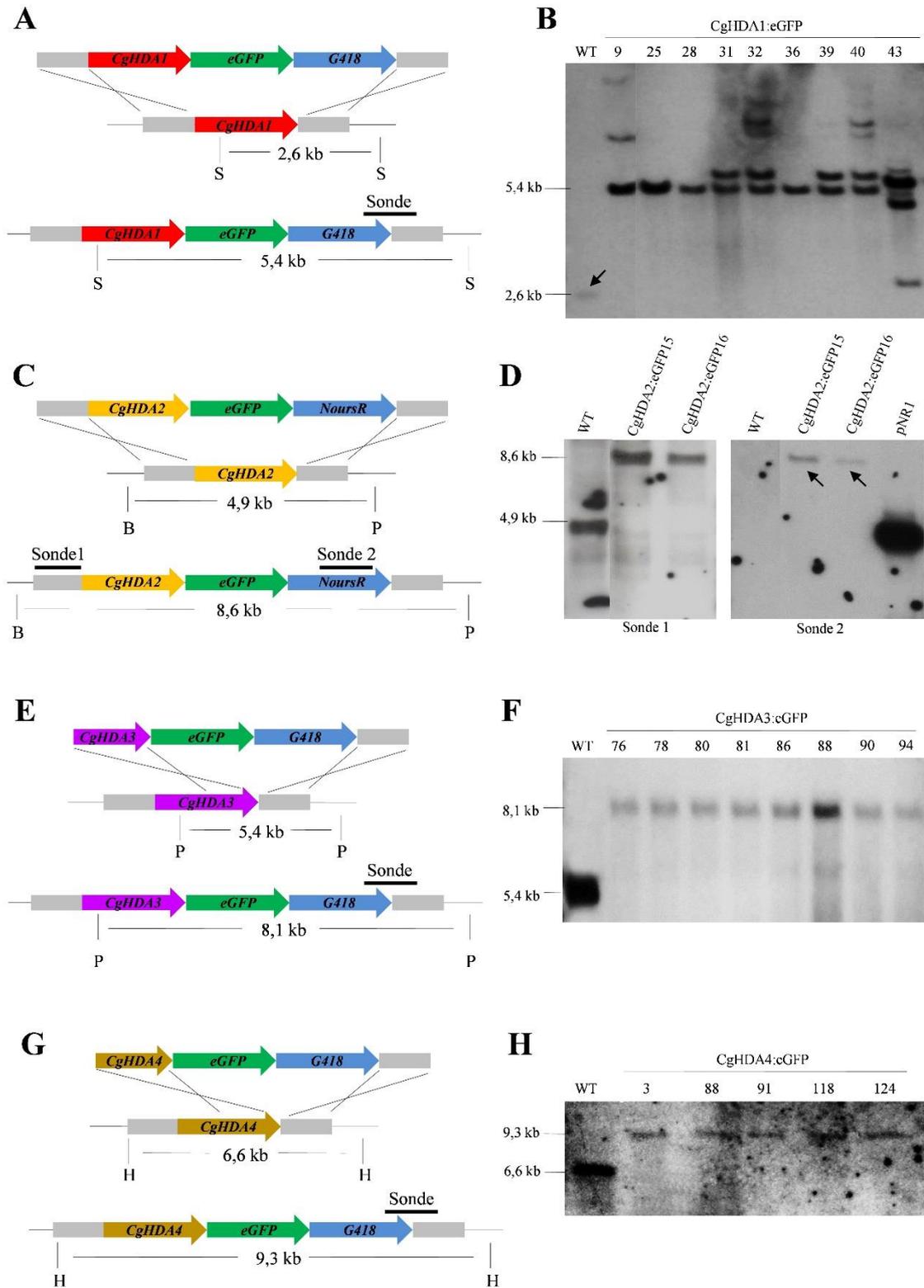


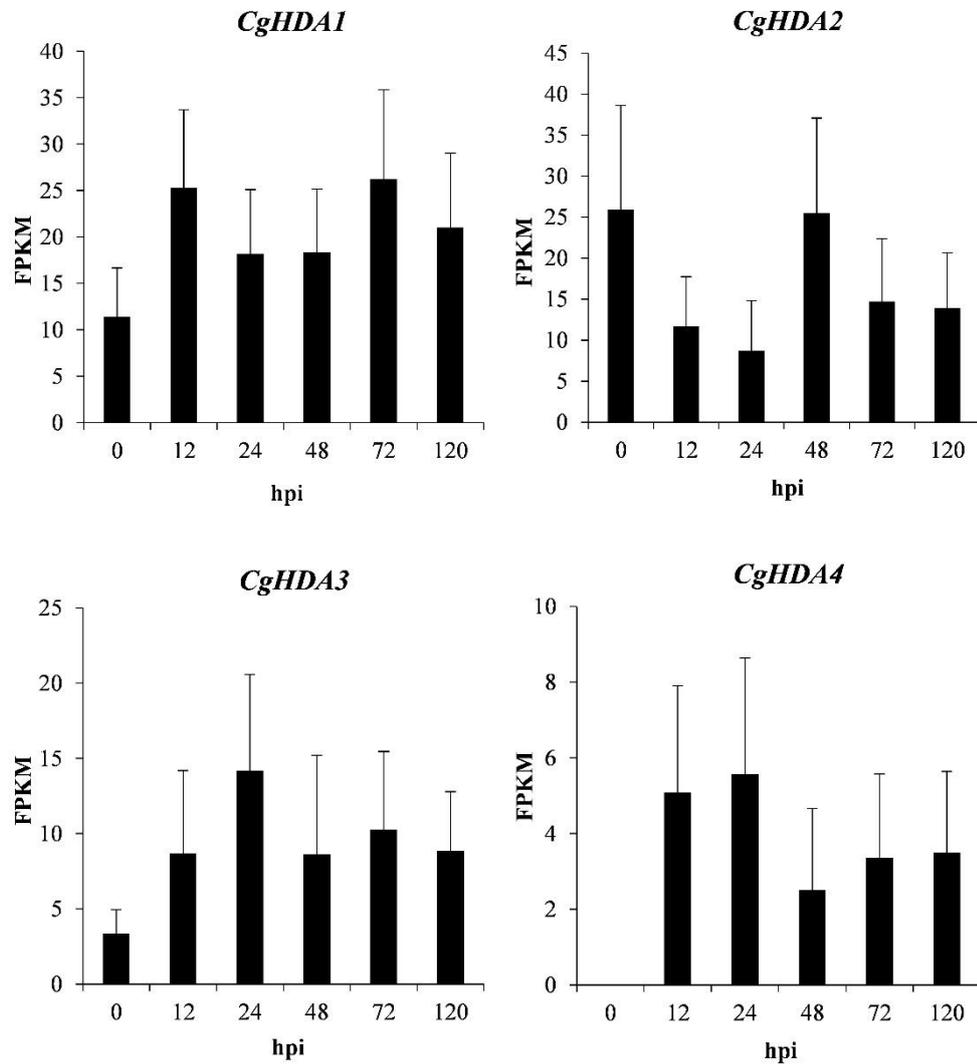
Abb. 46: Erzeugung von *eGFP*-Reporterstämmen.

- (A) *eGFP*-Strategie zur Erzeugung von HDA1:eGFP-Stämmen. S = *StuI*, *G418* = Geneticin-Resistenzkassette (*trpC*-Promotor und *nptII*).
- (B) Southern Blot zur Identifizierung von HDA1:eGFP-Stämmen. Die genomische DNA wurde mit *StuI* verdaut. Die homologe Integration des *eGFP*-Reporterkonstrukts wird angezeigt durch einen Bandenshift von 2,6 kb auf 5,4 kb, was für die Isolate 25, 28 und 36 der Fall war.
- (C) *eGFP*-Strategie zur Erzeugung von HDA2:eGFP-Stämmen. B = *Bsu36I*, P = *PsiI*, *NoursR* = Nourseothricin-Resistenzkassette (*oliC*-Promoter, *nat1*-Gen, *trpC*-Terminator).
- (D) Southern Blot zur Identifizierung von HDA2:eGFP-Stämmen. Die genomische DNA wurde mit *Bsu36I* und *PsiI* verdaut. Die homologe Integration des *eGFP*-Reporterkonstrukts wird angezeigt durch einen Bandenshift von 4,9 kb auf 8,6 kb, was für die Isolate 15 und 16 der Fall war.
- (E) *eGFP*-Strategie zur Erzeugung von HDA3:eGFP-Stämmen. P = *PsiI*, *G418* = Geneticin-Resistenzkassette (*trpC*-Promotor und *nptII*).
- (F) Southern Blot zur Identifizierung von HDA3:eGFP-Stämmen. Die genomische DNA wurde mit *PsiI* verdaut. Die homologe Integration des *eGFP*-Reporterkonstrukts wird angezeigt durch einen Bandenshift von 5,4 kb auf 8,1 kb, was für alle Isolate der Fall war.
- (G) *eGFP*-Strategie zur Erzeugung von HDA4:eGFP-Stämmen. H = *HindIII*, *G418* = Geneticin-Resistenzkassette (*trpC*-Promotor und *nptII*).
- (H) Southern Blot zur Identifizierung von HDA4:eGFP-Stämmen. Die genomische DNA wurde mit *HindIII* verdaut. Die homologe Integration des *eGFP*-Reporterkonstrukts wird angezeigt durch einen Bandenshift von 6,6 kb auf 9,3 kb, was für alle untersuchten Isolate der Fall war.

Alle Skizzen nicht maßstabsgerecht.

XII. Nachweis von HDA-Transkripten während der Infektion

A



B

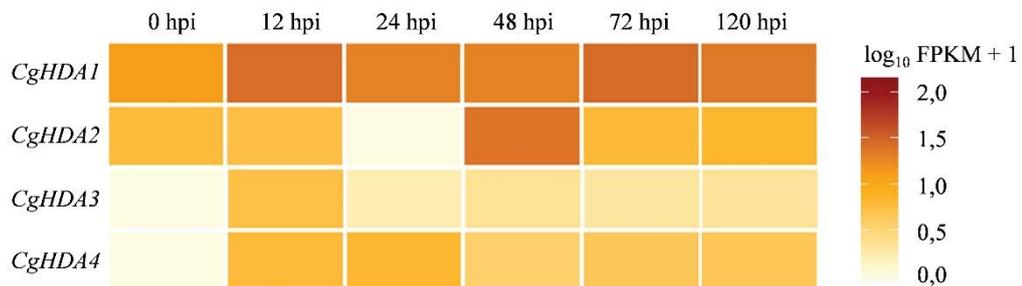


Abb. 47: Genexpression von *CgHDA1*, *CgHDA2*, *CgHDA3* und *CgHDA4* während der Infektion (0-120 hpi) von *Zea mays* cv. Golden Jubilee.

(A) Die erhaltenen Werte wurden als FPKM (Fragments Per Kilobase of transcript per Million) aufgetragen und spiegeln relative Transkriptmengen wider.

(B) Heatmap der Histondeacetylase-Gene über den Infektionsverlauf.

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle (Saale), den

Alexander Mickel

Danksagung

Herrn Professor Dr. H. B. Deising danke ich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die Möglichkeit, dieses zu bearbeiten. Ich danke ihm für seine zahlreichen Anregungen und seinem steten Interesse am Fortgang meiner Arbeiten sowie seiner großen Freude an meinen Texten.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor Dr. G. Reuter für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft sowie seiner gesamten Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. Uwe Conrath (RWTH Aachen) für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön geht an alle, die durch praktische Mitarbeit zum Gelingen des Projekts beigetragen haben. Dr. Ralf Horbach danke ich für die HPLC-Analysen und Iris Gase für die Hilfe bei Pflanzengroßansätzen sowie für die Erhebung der RT-qPCR-Daten. Danken möchte ich auch Dr. Rayko Becher, Dr. Jorrit-Jan Krijger, Dr. Ivo Schliebner und Dr. Anja Raschke für wertvolle Tipps und Anregungen.

Vielen Dank auch an Andrea Beutel für die technische Assistenz und an Elke Vollmer für die Anzucht der Maispflanzen. Der gesamten Arbeitsgruppe Phytopathologie und Pflanzenschutz gilt mein Dank für das gute Arbeitsklima.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben, insbesondere Angelika Schmieder, Bianka Janack und Reno Nickodemus. Ein ganz herzliches Dankeschön an Frau Dr. Bärbel Miethe. Danke für Ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

Nicht zuletzt gilt mein Dank der finanziellen Förderung des Projekts durch das Interdisziplinäre Zentrum für Nutzpflanzenforschung (IZN).

Lebenslauf

1. PERSÖNLICHE DATEN

Name: Alexander Sebastian Mickel
Geburtsdatum: 01.06.1981 Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

2. Schul- und Berufsausbildung

1987 - 1997 Grund- und Sekundarschule Wallwitz
1997 - 2000 Berufsbildende Schulen Saalkreis, Halle (Saale)
2001 - 2004 Schule des Zweiten Bildungsweges, Halle (Saale)

3. Wissenschaftlicher Werdegang

10/2004 - 12/2010 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Diplomarbeit an der Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz
Thema: Die Bedeutung epigenetischer Faktoren für die Differenzierung von Infektionsstrukturen und Pathogenität des Maispathogens *Colletotrichum graminicola*

02/2011 - 06/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Professur für Phytopathologie und Pflanzenschutz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Halle (Saale), den

Alexander Mickel

Wissenschaftliche Beiträge

Vorträge:

Mickel, A., Kummer, W., Fischer, A., Horbach, R., Reuter, G. und Deising, H. B. (12/2011). Epigenetic control of pathogenicity of the causal agent of maize anthracnose, *Colletotrichum graminicola*. Progress Meeting Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung, Halle (Saale).

Mickel, A., Kummer, W., Horbach, R., Fischer, A., Reuter, G. und Deising, H. B. (06/2012). Epigenetic control of pathogenicity of the causal agent of maize anthracnose, *Colletotrichum graminicola*. Progress Meeting Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung, Halle (Saale).

Mickel, A., Kummer, W., Zahn, S., Gase, I., Horbach, R., Fischer, A., Reuter, G. und Deising, H. B. (07/2013). Epigenetic control of pathogenicity of the causal agent of maize anthracnose, *Colletotrichum graminicola*. Progress Meeting Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung, Halle (Saale).

Mickel, A., Hönig, G., Reuter, G. und Deising, H. B. (01/2014). Epigenetic control of pathogenicity of the causal agent of maize anthracnose, *Colletotrichum graminicola*. Progress Meeting Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung, Halle (Saale).

Mickel, A., Hönig, G., Kummer, W., Abou Ammar, G., Horbach, R., Fischer, A., Reuter, G. und Deising, H. B. (07/2014). Epigenetic control of pathogenicity of the causal agent of maize anthracnose, *Colletotrichum graminicola*. Progress Meeting Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung, Halle (Saale).

Mickel, A., Hönig, G., Reuter, G. und Deising, H. B. (02/2015). Epigenetic control of pathogenicity of the causal agent of maize anthracnose, *Colletotrichum graminicola*. Progress Meeting Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung, Halle (Saale).

Mickel, A., Kummer, W., Hönig, G., Horbach, R., Fischer, A., Reuter, G. und Deising, H. B. (03/2015). Functional characterization of Histone deacetylase 1 in *Colletotrichum graminicola*. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Wirt-Parasit-Beziehungen, Halle (Saale).

Mickel, A., Gase, I., Kummer, W., Hönig, G., Horbach, R., Fischer, A., Reuter, G. und Deising, H. B. (03/2016). Functional analysis of the entire class I and II histone deacetylase repertoire in *Colletotrichum graminicola*. Jahrestagung des DPG-Arbeitskreises Wirt-Parasit-Beziehungen, Gießen.

Posterbeiträge:

Kummer, W., Mickel, A., Horbach, R., Fischer, A., Deising, H.B. und Reuter, G. (2012). Epigenetic control of heterochromatic gene silencing and pathogenesis of *Colletotrichum graminicola*. Grant Proposal, Evaluation, Sonderforschungsbereich 648, Halle (Saale).

Mickel, A., Kummer, W., Fischer, A., Horbach, R., Reuter, G. und Deising, H. B. (2012). Epigenetic control of pathogenicity in the causal agent of maize anthracnose *Colletotrichum graminicola*. Evaluierung, Interdisziplinäres Zentrum für Nutzpflanzenforschung (IZN), Halle (Saale).

Kummer, W., Gase, I., Mickel, A., Fischer, A., Deising, H.B. und Reuter, G. (2015). Epigenetic control of heterochromatic gene silencing and pathogenesis of *Colletotrichum graminicola*. International Meeting "Communication in Plants and their Responses to the Environment" des Sonderforschungsbereiches 648, Halle (Saale).

Mickel, A., Hönig, G., Kummer, W., Reuter, G. und Deising, H. B. (2015). Epigenetic control of pathogenicity in the causal agent of maize anthracnose *Colletotrichum graminicola*. Abschlussmeeting Interdisziplinäres Zentrums für Nutzpflanzenforschung (IZN), Halle (Saale).