

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie

Einfluss des FgHyd5 Proteins  
auf Morphologie, Wachstum und  
Virulenz von  
*Fusarium graminearum* (Schwabe)

Ekaterina Minenko

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum  
Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Schwab

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. F. Vogel  
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hüchelhoven

Die Dissertation wurde am 26.02.2014 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für  
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 03.06.2014 angenommen.

## Danksagung

Bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Rudi F. Vogel möchte ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, diese Doktorarbeit und die mit ihr verbundenen Forschungen am Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie durchzuführen, sowie für seine fachkundige Betreuung. Danke für Ihr Vertrauen, den großen Freiraum bei der Gestaltung des Themas und für Ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Ludwig Niessen danke ich für die gute Zusammenarbeit in all den Jahren und für seine Bereitschaft, mich an seinem großen Wissensschatz zum Thema Pilze teilhaben zu lassen. Danke für viele interessante und lehrreiche wissenschaftliche Diskussionen sowie für die aufmunternden Worte in von Selbstzweifel getrübbten Momenten. Danke für die aufheiternden Freitagswitze im Labor (die guten wie die schlechten).

Bei meinen Kollegen bedanke ich mich für eine unvergessliche und spannende Zeit im Labor und für die wohltuenden Treffen und Unternehmungen außerhalb der Arbeitszeit.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Ina Tittel vom Fachgebiet Obstbauder TUM am Wissenschaftszentrum Weihenstephan für die allseitige Unterstützung während den Arbeiten mit dem Mikrotom. Herrn Dr. Harald Schempp vom Lehrstuhl für Phytopathologie der TUM möchte ich für die umfassende Hilfe während der Experimente zum Oxidativem Stress danken.

Einen besonderen Dank möchte ich der Korrektorin meiner Doktorarbeit, Dr. Carolin Graml für ihre akribische und unwahrscheinlich geduldige Arbeit aussprechen.

Mein Dank gilt ferner der Arbeitsgemeinschaft industrieller Forschungsvereinigungen „Otto v. Guericke“ e.V. (AiF) und der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft e.V. für die Finanzierung des Projekts.

Den Dank, den ich gegenüber meiner Familie empfinde, kann ich kaum in Worte fassen: Eure endlose Unterstützung, euer Vertrauen und eure Liebe haben mich durch dieses nicht immer leichte Projekt getragen.

## Abkürzungen

AF	Autofluoreszenz
AS	Acetosyringone
ATMT	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNS
CU	Cerato Ulmin
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreit
FcHyd5p	<i>F. culmorum</i> Hydrophobin 5 (Protein)
FgHyd5p	<i>F. graminearum</i> Hydrophobin 5 (Protein)
FHB	Ährenfusariose
GFP	Green fluorescent protein
kb	Kilo basenpaare
LAMP	Loop-mediated isothermal amplification
LB	Lysogeny broth
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MM	Minimal Medium
NS	Nahrungs Stoffe
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PEG	Polyethylene Glykol
PS	Petrischale
RNase	Ribonuklease
ROS	Reaktive Species
RT-LAMP	Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification
sGFP	Enhanced green fluorescent protein
spp.	Species (plural)
UV	Ultra violett
v	Volume
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

<b>Einführung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Fusarium</i> spp.</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 <i>F. graminearum</i> und FHB.</b> .....	<b>1</b>
<b>1.3 Genetik von <i>F. graminearum</i></b> .....	<b>6</b>
<b>1.4 Virulenzfaktoren des <i>F. graminearum</i></b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 Hydrophobine</b> .....	<b>8</b>
1.5.1 Bildung von „Rodlets“ .....	9
1.5.2 Membranbildung .....	9
1.5.3 Adhäsion an den Oberflächen.....	10
1.5.4 Funktionen der Hydrophobine in Pilzen.....	10
1.5.5 Einfluss von unterschiedlichen Nährstoffen auf die Hydrophobinproduktion .....	15
1.5.6 Hydrophobine in Flechten und Ektomykorrhizen.....	16
1.5.7 Bildung von stabilem Schaum – Gushing.....	17
<b>1.6 Polycistronische mRNA in Eukaryoten</b> .....	<b>18</b>
<b>1.7 sGFP – Modifiziertes „green fluorescent protein“</b> .....	<b>19</b>
<b>1.8 Transformation von Pilzen mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> .....	<b>20</b>
<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>24</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>24</b>
2.1.1 Mikroorganismen und Getreide.....	24
2.1.2 Chemikalien .....	25
2.1.3 Geräte.....	26
2.1.4 Oligonukleotide .....	27
2.1.5 Restriktiosenzyme.....	29
2.1.6 Puffer .....	29
2.1.7 Medien.....	30
2.1.8 Plasmide .....	31
<b>2.2 Mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.2.1 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen (Calciumchlorid-Methode).....	32
2.2.2 Herstellung von elektrokompenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Zellen .....	33
2.2.3 Transformation deschemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> .....	33
2.2.4 Transformation des elektrokompenten <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
2.2.5 Herstellung <i>F. graminearum</i> Sporen-Suspensionen.....	34
2.2.6 Herstellung eines Extraktes aus den Konidien von <i>F. graminearum</i> .....	34
2.2.7 Produktion von Perithezien ( <i>Gibberella zeae</i> ).....	34

2.2.8	Transformation von <i>F. graminearum</i> mittels ATMT .....	34
2.2.9	Single-Spore-Isolation .....	35
2.2.10	Antibiotika-Resistenz von <i>F. graminearum</i> Stämmen.....	35
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>36</b>
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	36
2.3.2	Agarose Gel-Elektrophorese .....	36
2.3.3	DNA-Isolation aus <i>F. graminearum</i> TMW 4.0157.....	36
2.3.4	Klonierung.....	37
2.3.5	Entwicklung des pPK2-PkosGT-Vektors.....	37
2.3.6	Entwicklung des pPK2-PHsGT Vektors .....	38
2.3.7	Entwicklung des pPK2-PHtaasGT-Vektors. ....	39
2.3.8	RNA-Isolation aus <i>F. graminearum</i> .....	41
2.3.9	RNA-Isolation aus infizierter Gerste und infiziertem Weizen.....	41
2.3.10	Reverse Transkription.....	41
2.3.11	LAMP.....	41
2.3.12	RT-LAMP .....	42
2.3.13	Prüfung der <i>F.graminearum</i> -Transformanten .....	43
<b>2.4</b>	<b>Mälzung und Gushing-Tests .....</b>	<b>43</b>
2.4.1	Malzherstellung.....	43
2.4.2	Modifizierter Carlsberg-Test.....	44
<b>2.5</b>	<b>Vergleich zwischen dem <i>F.graminearum</i> Wildtyp und seinen Transformanten 44</b>	
2.5.1	Kolonien-Morphologie.....	44
2.5.2	Breite der Hyphen .....	44
2.5.3	Bestimmung der Biomasse .....	45
2.5.4	Untersuchung der Hydrophobizität der Myzeloberfläche.....	45
2.5.5	Durchdringen der Wasser-Luft Grenzfläche .....	45
2.5.6	Anzahl, Länge und Auskeimungspotential der Konidien und Zellzahl je Konidie .....	45
2.5.7	Konidienfluoreszenz.....	46
2.5.8	Wachstum der Stämme auf unterschiedlichen Medien .....	46
2.5.9	Pathogenitätstests.....	48
<b>2.6</b>	<b>Oxidativer Stress bei Gerste und Weizen .....</b>	<b>51</b>
<b>2.7</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>51</b>
<b>2.8</b>	<b>GenBank accession numbers .....</b>	<b>51</b>
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>52</b>	
<b>3.1</b>	<b>Entwicklung und Prüfung von <i>F. graminearum</i> Transformanten mit knock out, translationaler Kopplung und Fusion des <i>hyd5</i> Gens mit einem Fluoreszenzmarker... 52</b>	

<b>3.2 Vergleich der Morphologie der Transformanten mit der <i>F. graminearum</i> Wild</b>	
<b>Typs</b> .....	<b>57</b>
3.2.1 Morphologie der Kolonien und der Hyphen.....	57
3.2.2 Vergleich des Hyphendurchmessers des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs und der Transformanten .....	58
3.2.3 Biomasseproduktion des <i>F. graminearum</i> Wild Typs und der Transformanten .....	59
3.2.4 Untersuchung der Hydrophobizität der Kolonieoberfläche .....	60
3.2.5 Überwindung der Wasseroberflächenspannung.....	61
<b>3.3 Vergleich der Konidien des <i>F. graminearum</i> Wild Typs und der Transformanten</b>	
.....	<b>62</b>
3.3.1 Konidienbildung.....	62
3.3.2 Länge der Konidien.....	63
3.3.3 Zahl der Zellen pro Konidie .....	64
3.3.4 Auskeimungspotenzial der Konidien .....	65
3.3.5 Aktivierung der <i>hyd5</i> Gen-Promoters in den Konidien.....	66
3.3.6 Bildung der Perithezien .....	67
<b>3.4 Wachstum des <i>F. graminearum</i>-Wild Typs und der Transformanten auf</b>	
<b>unterschiedlichen Medien .....</b>	<b>68</b>
3.4.1 Wachstum der Stämme auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen .....	68
3.4.2 Wachstum der Stämme auf unterschiedlichen Stickstoffquellen.....	69
3.4.3 Aktivierung der <i>hyd5</i> Gen-Promoters durch komplexe und definierte Medien, so wie auf unterschiedlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen .....	70
3.4.4 Aktivierung des <i>hyd5</i> Gen-Promoters durch Gerste- und Weizen-Zellextrakt .....	71
<b>3.5 Aktivierung des <i>hyd5</i> Gen-Promoters während des Wachstums des</b>	
<b><i>F. graminearum</i>-Wild Typs und der drei Transformanten auf wasserabweisender</b>	
<b>Oberfläche.....</b>	<b>72</b>
<b>3.6 Infektion von Gerste und Weizen mit dem <i>F. graminearum</i>-Wild Typ und den</b>	
<b>drei Transformanten .....</b>	<b>73</b>
3.6.1 Infektion der Keimlinge von Gerste und Weizen.....	73
3.6.2 Blattinfektion von Gerste und Weizen.....	75
3.6.3 Aktivierung des <i>hyd5</i> Gen-Promoters an Tag 10 der Infektion von Gersten-und Weizenblättern.....	77
<b>3.7 Oxydativer Stress bei Weizen und Gerste .....</b>	<b>78</b>
3.7.1 Bildung der ROS nach dem Kontakt von Weizen-bzw. Gerstebblättern mit Konidienextrakten von FgWT und Fg $\Delta$ hyd5.....	79

3.7.2	Bildung der ROS nach dem Kontakt der Weizen-bzw. Gerstebblätter mit lyophilisiertem FcHyd5p.....	80
<b>3.8</b>	<b>Gushing.....</b>	<b>81</b>
3.8.1	Gushing bei Weizen-Malz.....	81
3.8.2	Gushing bei Gerstenmalz.....	83
<b>3.9</b>	<b>Tabellarischer Überblick über die Unterschiede zwischen <i>F.graminearum</i> Transformanten-Stämmen und dem Wildtyp.....</b>	<b>84</b>
<b>3.10</b>	<b>Entwicklung und Anwendung eines neuen Verfahrens zum schnellen Nachweis der spezifischen Genexpression in <i>F. graminearum</i> .....</b>	<b>88</b>
3.10.1	Primer-Entwicklung.....	88
3.10.2	Überprüfung der Primer auf Kreuzreaktionen und Erkennung von gDNA, cDNA und mRNA.....	90
3.10.3	Überprüfung der Sensibilität der RT-LAMP im Vergleich zur konventionellen RT-PCR.....	93
3.10.4	Untersuchung von infiziertem Pflanzenmaterial mit Hilfe der RT-LAMP .....	94
3.10.5	Anwendung der neu entwickelten RT-LAMP für den Nachweis der <i>hyd5</i> Gen-Expression.....	98
<b>Diskussion.....</b>		<b>104</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklung von Transformanten für die Untersuchung der Rolle des <i>hyd5</i> Gens in <i>F. graminearum</i>.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2</b>	<b>Vergleich der Morphologie von Transformanten und <i>F. graminearum</i> Wild Typ .....</b>	<b>109</b>
<b>4.3</b>	<b>Vergleich der Sporen des <i>F. graminearum</i> Wild Typs und der Transformanten .....</b>	<b>111</b>
<b>4.4</b>	<b>Wachstum und Aktivierung des <i>hyd5</i> Gen-Promoters der <i>F. graminearum</i>-Stämme auf unterschiedlichen Medien.....</b>	<b>112</b>
<b>4.5</b>	<b>Aktivierung des <i>hyd5</i>-Gen Promoters auf wasserabweisenden Oberflächen....</b>	<b>113</b>
<b>4.6</b>	<b>Vergleich der Virulenz der Transformanten und des <i>F. graminearum</i> Wild Typs .....</b>	<b>114</b>
<b>4.7</b>	<b>Hydrophobin als Auslöser von oxidativem Stress .....</b>	<b>117</b>
<b>4.8</b>	<b>Gushing .....</b>	<b>118</b>
<b>4.9</b>	<b>Vergleich der Transformanten mit dem <i>F. graminearum</i> Wild Typ sowie die Frage nach der Funktionalität der FgTK Transformante .....</b>	<b>119</b>
<b>4.10</b>	<b>Entwicklung einer reverse transcription loop-mediated isothermal amplification Methode für die Untersuchung der Genexpression in Pilzen .....</b>	<b>121</b>

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>124</b>
<b>5.1 English Summary .....</b>	<b>124</b>
<b>5.2 Deutsche Zusammenfassung .....</b>	<b>126</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>129</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>146</b>
<b>7.1 Plasmid Karten .....</b>	<b>146</b>
7.1.1 pHyd5-Int.....	146
7.1.2 pGFP .....	146
7.1.3 pHGFP.....	147
7.1.4 pPHGFP .....	147
7.1.5 pPK2 .....	148
7.1.6 pPK2-Thyd5.....	148
7.1.7 pPK2-PHT.....	149
7.1.8 pPK2-PHtaaT .....	149
7.1.9 pPK2-PkoT.....	150
7.1.10 pPK2-PkosGT .....	150
7.1.11 pPK2.PHtaasGT .....	151
7.1.12 pPK2-PHsGT .....	151
7.1.13 pSK-379-sGFP .....	151
<b>7.2 Sequenzen.....</b>	<b>152</b>
7.2.1 <i>FgHyd5</i> – genomische Sequenz ( <i>FG01831.1</i> ).....	152
7.2.2 <i>FgHyd5</i> – Sequenz ohne Intronen .....	152
7.2.3 <i>FgHyd5</i> vorhergesagter Promoter-Bereich.....	152
7.2.4 <i>FgHyd5</i> vorhergesagter Terminatorbereich.....	153
7.2.5 sGFP-Sequenz.....	153
7.2.6 Verwendete Teilsequenz des Chromosom 1 von <i>F. graminearum</i> PH1.....	153
<b>7.3 Fusarium Transformanten Sequenzierungen .....</b>	<b>154</b>
7.3.1 FgTK .....	154
7.3.2 FgFP.....	158
7.3.3 Fg $\Delta$ hyd5.....	161



## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: <i>Fusarium graminearum</i> Konidiophor (A), Konidien (B), auskeimende Chlamydospore (B).....	3
Abb.2: Weißährigkeit der Ähren von Weizen (Goswami et al. 2004).....	4
Abb.3: Schematische Darstellung des genetischen Vorgangs in der <i>A. tumefaciens</i> -Zelle während der <i>Fusarium</i> -Transformation.....	22
Abb.4: Schematische Darstellung des kompletten Kloniervorgangs.....	40
Abb.5: Schematische Darstellung der Chromosom-1-Sequenz der drei Transformanten FgFP (A), FgTK (B) und Fg $\Delta$ hyd5 (C) nach der Transformation mit den Vektoren pPK2-PHtaasGT (A), pPK2-PHsGT (B) und pPK2-PkosGT (C).....	54
Abb.6: Hygromycin B Resistenz der acht <i>F. graminearum</i> -Stämme auf SFA-Platten mit unterschiedlichen HygromycinB Konzentrationen.....	55
Abb.7: PCR Screening der <i>F. graminearum</i> -Transformanten.....	56
Abb.8: Morphologie der Hyphen (1) und Kolonien (2) des <i>F. graminearum</i> Wild Typs (A) sowie der Transformanten FgTK (B), FgFP (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D) auf MM-Agar. ....	58
Abb.9: Durchmesser der Hyphen des <i>F. graminearium</i> Wild Typs FgWT sowie der drei Transformanten FgTK, FgFP und Fg $\Delta$ hyd5. ....	59
Abb.10: Produktion der Biomasse des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs (FgWT) sowie der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 innerhalb von drei Tagen bei RT in Malzextrakt-Medium.....	60
Abb.11: Kontaktwinkel der Wassertropfen auf dem Myzel von Kulturen des <i>F. graminearum</i> Wild Typs FgWT (A) und der Transformanten FgFP (B), FgTK(C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D).....	61
Abb.12: Penetration der Wasseroberfläche und Bildung von Luftmyzel durch den <i>F. graminearum</i> Wild Typ, der drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5, sowie der Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 in ME-Medium nach Zugabe von reinem Hydrophobin FcHyd5p.....	62
Abb.13: Zahl der Konidien pro ml.....	63
Abb.14: Konidienlänge des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs FgWT und der drei Mutanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 auf dem MB-Medium nach 7 d Wachstum bei RT.....	64

Abb.15: Zahl der Zellen pro Konidie beim <i>F. graminearum</i> -Wild Typ sowie bei den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 auf dem MB-Medium nach 7 d Wachstum bei RT.....	65
Abb.16: Auskeimungspotenzial der Konidien des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs (FgWT) so wieder drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5. ....	66
Abb.17: Fluoreszenz der Konidien des <i>F. graminearum</i> -Wild Typ-Stammes (A) und der drei Transformanten FgFP (B), FgTK (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D). ....	67
Abb.18: Perithezienzahl pro Petrischale. ....	68
Abb.19: Durchmesser der Kolonien des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs (FgWT) und der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 auf MM-Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. ....	69
Abb.20: Durchmesser der Kolonien des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs (FgWT) und der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 auf MM-Medien mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.....	70
Abb.21: Fluoreszenz des <i>F. graminearum</i> Wild Typs (A) sowie der Transformanten FgFP (B), FgTK (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D) auf der wasserabweisenden Oberfläche einer Petrischale. ....	73
Abb.22: Länge von Weizen- und Gerstenkeimlingen nach der Keimlingsinfektion mit einer Konidien suspension des <i>F. graminearum</i> Wild Typs bzw. der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 nach 10 tägigem Wachstum.....	74
Abb.23: Typische Läsionen an den Blättern von Gerste (A) und Weizen (B) nach Infektion mit <i>F. graminearum</i> Wild Typ. ....	75
Abb.24: Grad der Gesundheit der mit dem <i>F. graminearum</i> Wild Typ bzw. den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Gerstenpflanzen am 7. Tag nach der Infektion. ....	76
Abb.25: Grad der Gesundheit der mit dem <i>F. graminearum</i> Wild Typ bzw. den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Weizenpflanzen am 7. Tag nach der Infektion. ....	77
Abb.26: Fluoreszenz der Hyphen im Gewebe von Gerste, die mit der <i>F. graminearum</i> Transformante Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurde.....	78
Abb.27: Produktion der Reactive Oxygen Species (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), induziert durch einen Konidienextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen (10 <sup>2</sup> , 5x10 <sup>2</sup> , 10 <sup>3</sup> , 5x10 <sup>3</sup> ,	

10 <sup>4</sup> Konidien/ml) des <i>F. graminearum</i> Wild Typs (A) und der Deletionsmutante FgΔhyd5 (B).....	80
Abb.28: Produktion der Reactive Oxygen Species (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), induziert durch lyophilisiertes Hydrophobin FcHyd5p und lyophilisierten Zellkulturüberstand von <i>P.pastoris</i> X33. ....	81
Abb.29: Mit dem <i>F. graminearum</i> -Wild Typ (A), dem FgFP(B), dem FgTK (C) und dem FgΔhyd5 (D) infiziertes bzw. nicht infiziertes (E) Weizen-Malz nach 4 Keimtagen bei 16°C und 48% Wassergehalt.....	82
Abb.30: Beeinflussung des Gushings durch Weizen-Malz, welches mit unterschiedlichen Transformanten bzw. mit dem <i>F.graminearum</i> Wild Typ infiziert wurde.....	83
Abb.31: Beeinflussung des Gushing durch mit unterschiedlichen <i>F.graminearum</i> -Transformanten bzw. mit dem <i>F. graminearum</i> Wild Typ infiziertes Gerstenmalz..	84
Abb.32: Anordnung der Oligonukleotide.....	89
Abb.33: Anordnung der Oligonukleotide des βTub-ID175 Primer Sets im der Sequenz des Ef1α-Gens von <i>F. graminearum</i> Chromosom 4-(NCBI reference sequence: CM000577.1 nt 52023-52204) (obere Reihe) und Nukleotid-Sequenz des <i>Ef1α</i> -Gens von <i>F. graminearum</i> ohne Introns (untere Reihe).....	90
Abb.34: 1. Konventionelle LAMP-Reaktion bei ansteigender Inkubationstemperatur (°C) mit Calcein, dem βTub-ID175Primer-Set und der gDNA (10ng/μl) des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs als Template. 2. Konventionelle LAMP-Reaktion bei ansteigender Inkubationstemperatur (°C) mit Calcein, dem EF1-ID22 Primer-Set und der cDNA (1ng/μl) des <i>F. graminearum</i> -Wild Typs als Template. ....	91
Abb.35: Vergleich der Sensitivität von RT-LAMP und RT-PCR.....	94
Abb.36: 1% Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Amplifikaten, die unter Verwendung von cDNA aus <i>F. graminearum</i> TMW 4.0157 bzw. aus mit <i>F. graminearum</i> infizierten Gersten- und Weizenpflanzen erhalten wurden.. ....	95
Abb.37: Anordnung der Oligonukleotide des Hyd5-ID1-Primer-Sets. ....	99
Abb.38: Konventionelle LAMP-Reaktion mit Calcein, dem Hyd5-ID1 Primer-Set und gDNA aus dem <i>F. graminearum</i> Wild Typ Stamm TMW 4.0157 (FgWT), den Transformanten FgΔhyd5 und FgFP sowie mit dem Vektor pHyd5 (10ng/μl) als Template .....	100

Abb.39: 1% Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Amplifikaten, die unter Verwendung von cDNA aus <i>F. graminearum</i> TMW 4.0157 bzw. aus mit <i>F. graminearum</i> infizierten Gersten- und Weizenpflanzen erhalten wurden. ....	102
Abb.40: Vergleich der Sensitivität von RT-LAMP und RT-PCR während der Nutzung des Hyd5-ID1 Primersets.....	103
Abb.41: Vorhergesagter Promoterbereich für das hyd5 Gen in <i>F. graminearum</i> .....	106
Abb.42: Pilz-Transformationsmethoden.....	107
Abb.43: Theoretische 3D-Modelle des Fusionsproteins FgHyd5-sGFP.....	110

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Hydrophobin-Funktionen während der Sporulation .....	12
Tabelle 2: Einfluss von unterschiedlichen Nährstoffen auf die Hydrophobinproduktion .....	15
Tabelle 3: In dieser Arbeit entstandene Stämme von <i>E. coli</i> , <i>A. tumefaciens</i> und.....	25
Tabelle 4: Geräte .....	26
Tabelle 5: Oligonukleotide für die Klonierungen.....	28
Tabelle 6: Oligonukleotide für die RT-LAMP .....	28
Table 7: Puffer .....	29
Tabelle 8: Nährboden.....	30
Tabelle 9: Vektoren.....	31
Tabelle 10: Hygromycin B-Resistenz der acht <i>F. graminearum</i> -Stämme .....	55
Tabelle 11: Größe der Amplifikate nach den PCR Screenings der Transformanten .....	56
Tabelle 12: Überblick über die Unterschiede zwischen <i>F. graminearum</i> Transformanten- Stämmen und dem Wildtyp .....	84
Tabelle 13: Einfluss der Probenbehandlung auf die Ergebnisse der reverse- transcription-LAMP Reaktion und der konventionellenLAMP-Reaktionen mit den Primer-Sets EF1-ID22, $\beta$ Tub-ID175 und Hyd5-ID1 .....	97
Tabelle 14: Ergebnisse der RT-LAMP Reaktionen mit mRNA aus mit dem <i>F. graminearum</i> Wild Typ FgWT bzw. Fg $\Delta$ hy5-Stamm infizierten sowie aus gesunden Gersten- (G) und Weizenpflanzen (W). .....	101

# Einführung

## 1.1 *Fusarium* spp.

*Fusarium* spp. ist ein Fadenpilz, der zu den echten Pilzen (Fungi) gehört. Die *Eumycetes* sind zum einen durch den Chitingehalt in ihren Zellwänden charakterisiert und zum anderen dadurch, dass ihre Myzel durch Septen unterteilt sind (Müller & Loeffler 1992). Die *Eumycetes* werden in drei Klassen eingeteilt: *Ascomycota*, *Basidiomycota* und *Deuteromycota*. *Fusarium*-Arten, deren teleomorphe Form bekannt ist, werden den *Ascomycota* zugeordnet. Die *Ascomycota* besitzen ein gemeinsames Organ: den Ascus, das Meiosporangium des Teleomorphs. Im Ascus finden die Karyogamie, die Meiose und die Askosporen Differenzierung statt (Müller & Loeffler 1992). Das Teleomorphenstadium von vielen Fusarien ist *Gibberella*, bei manchen Arten ist es *Nectria* (Gerlach et al. 1982).

*Fusarium* ist eine weltweit verbreitete Gattung. Die meisten Repräsentanten dieser Gattung sind harmlose Saprotrophen, allerdings sind manche Arten, wie z.B. *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. verticillioides*, wichtige Pflanzen-Pathogene (Bottalico 1998). *Fusarium* befällt Weizen (*Triticum*), Gerste (*Hordeum*), Reis (*Oryza*), Hafer (*Avena*) und Mais (*Zea*). Dieser Pilz kann auch andere Pflanzen befallen, ohne Symptome hervorzurufen (Goswami & Kistler 2004). Die Pilze dieser Gattung sind unter anderem auch die wichtigsten und bekanntesten Mykotoxinproduzenten. Die Repräsentanten der Gattung *Fusarium* sind in der Lage, unter bestimmten Umweltbedingungen folgende Toxine zu produzieren: Trichothecene, Fumonisine, Moniliformin, Butenolid, Beauvericin, Enniatin und Zearalenone (Gutleb et al. 2002, Sharman et al. 1991; Tookey et al. 1972). *Fusarium* kann auch direkt Menschen infizieren und verursacht dann lokalisierte nekrotische Krankheiten, besonders bei Menschen mit immunsuppressiven Vorerkrankungen (Dignani & Anaissie 2004; Chang et al. 2006)

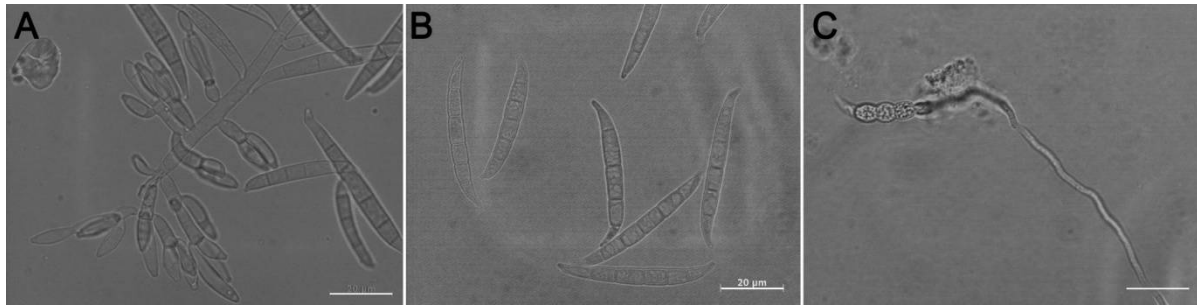
## 1.2 *F. graminearum* und FHB.

*F. graminearum* (Schwabe) wird folgendermaßen systematisiert: Superkingdom: Eucariota, Reich: Fungi, Abteilung: Ascomycota, Klasse: Sordariomycetes, Ordnung: Hypocreales, Familie: Nectriaceae, Gattung: *Fusarium*, Art: *Fusarium graminearum*

(Schwabe) (O'Donnell et al. 2013). Die systematische Einordnung des Pilzes erfolgte in Absprache mit einem der führenden Fusarium-Taxonomen (K. O'Donnell, 2014 *personal communication*).

Seit dem *F. graminearum* als eine Gruppe von verwandten Arten, die sich in der geographischen Verteilung, Mykotoxin-Produktion und Pathogenität unterscheiden, beschrieben wurde, handelt es sich bei *F. graminearum* um einen Spezies Komplex (FGSG) (Somma et al. 2014). Nach den neuesten Berichten besteht FGSC aus 15 verschiedenen Arten: *F. acaciaemearnsii*, *F. aethiopicum*, *F. asiaticum*, *F. austroamericanum*, *F. boothii*, *F. brasiliicum*, *F. cortaderiae*, *F. gerlachii*, *F. graminearum sensu stricto*, *F. louisianense*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. nepalense*, *F. ussurianum* und *F. vorosii* (Sarver et al. 2011). Die Art *F. graminearum sensu stricto* ist die häufigste und am weitesten verbreitete Art innerhalb des FGSC. Vor allem in Europa ist die Art weit verbreitet (Yli-Mattila 2010). Das Genom des Stammes *F. graminearum sensu stricto* PH1 wurde durch die „Broad Institute's Fungal Genome Initiative“ sequenziert, was die Voraussetzung für eine zielgerichtete genetische Modifikationen des Pilzes darstellt (Cuomo et al. 2007; Gale et al. 2005). *F. graminearum* vermehrt sich sexuell durch die Bildung von Ascosporen und vegetativ durch die Bildung von mehrzelligen, sichelförmigen Konidien. Das vegetative Myzel ist einkernig. Das haploide Genom hat eine Größe von 36.45 Mb mit einem haploidem Satz von vier Chromosomen, auf denen sich 11640 Gene und offene Leserahmen (ORF) befinden. Die Chromosomen sind relativ groß und haben untereinander eine vergleichbare Größe. Bestimmte Regionen der Chromosomen zeigen ein höheres Maß sowohl an Polymorphismus als auch an Rekombinationen zwischen Stämmen und Arten (Cuomo et al. 2007).

*F. graminearum* ist ein schnell wachsender Pilz, der Luftmyzel bildet. Der Pilz hat je nach Wachstumsbedingungen unterschiedliche Pigmentierungen, von gelb bis dunkelbraun. Sklerotien sind in frisch isolierten Kulturen vorhanden. Die Sklerotien sind klein, braun oder rötlich. Die Sporenbildung ist oft gering. Konidiophoren stammen aus einzelnen lateralen Phialiden von Hyphen und sind oft verzweigt. Es sind keine Mikrokonidien vorhanden. Die Makrokonidien sind deutlich septiert, schwach sichelförmig mit typischer Kopf- und Fußzelle sowie relativ dicken Wänden (Müller & Loeffler 1992; Nelson et al. 1983).



**Abb.1: *Fusarium graminearum* Konidiophor (A), Konidien (B), auskeimende Chlamydospore (C). Die Balken entsprechen jeweils 20  $\mu\text{m}$ .**

*F. graminearum* existiert in zwei getrennten Populationen: Gruppe 1 in Australien und Kalifornien und Gruppe 2 im Osten der USA und in Europa. Die Isolate von Gruppe 2 sind homothallisch, die Isolate von Gruppe 1 sind dagegen heterothallisch. Die Isolate der beiden Gruppen unterscheiden sich auch in dem Pflanzenteil, den sie bevorzugt befallen. So verursachen *Fusarium*-Isolate der Gruppe 1 Fäule an Stängeln und Blättern von Gerste und Weizen. Die Isolate von Gruppe 2 verursachen dagegen Fusariosen an den Ähren von Getreide (Nelson et al. 1983) *F. graminearum* Gruppe 1 wurde als *F. pseudograminearum* sp. nov beschrieben (Aoki & O'Donnell 1999).

*F. pseudograminearum* kann von *F. graminearum* basierend auf Unterschieden im Koloniewachstum, in Konidienbreite, in unterschiedlichen Reaktionen auf ultraviolettes Licht und das Fehlen von homothallischer Perithezienproduktion getrennt werden. (Aoki & O'Donnell 1999). Mittlerweile wurde nach der phylogenetischen Analyse der  $\beta$ -Tubulin Gen Sequenzen festgestellt, dass der gesamte *F. graminearum* Spezies Komplex näher mit *F. culmorum* und *F. cerealis* verwandt ist, als mit *F. pseudograminearum*. Im Jahr 1999 wurde eine neue Art von *Gibberella* – *Gibberella coronicola*, als Teleomorph von *F. pseudograminearum* beschrieben (Aoki & O'Donnell 1999b). Die Gruppe 1 und Gruppe 2, die zuvor innerhalb *F. graminearum* anerkannt waren, unterscheiden sich in ihren anamorphen und teleomorphen Morphologien, ökologischen Lebensräumen, Pathogenität, in der Art der sexuellen Fortpflanzung und ihren phylogenetischen Beziehungen zu anderen nah verwandten Arten.

*F. graminearum* verursacht FHB (Fusarium head blight = Ährenfusariosen, Weißährrigkeit). Eine erste Beschreibung von FHB wurde 1884 in England gemacht (Goswami & Kistler 2004). Seit dem ist FHB an Pflanzen in Asien, Kanada, Europa und Amerika beschrieben worden (Stack 2003). Der Befall von Weizen und Gerste führt zu



erheblichen ökonomischen Verlusten. Zwischen 1998 und 2000 wurden diese in Zentrale Teil der USA auf 2,7 Milliarden Dollar geschätzt (Nganje et al. 2002). Die Symptome von FHB an Weizen, die durch *F. graminearum* verursacht wurden, sind den Symptomen ähnlich, die bei einem *F. culmorum*-Befall entstehen: beim Weizen sind das dunkelrote bis schwarze nekrotische Läsionen auf der Blüten- oder Spelzen-Oberfläche. Beim Weizen verfärben sich bei Befall einzelner Ährchen diese zunächst braun oder dunkel rot und bleichen anschließend aus. Die in den befallenen Ährchen angelegten Samen entwickeln sich nicht weiter und verkümmern. Geht die Infektion von den befallenen Ährchen auf die Ährenspindel über, so wird der Teil der Ähre, der oberhalb der Infektionsstelle liegt nicht mehr mit Wasser versorgt und stirbt ebenfalls ab. Teile der Ähren reifen damit frühzeitig ab und sind im Gegensatz zum grünen Rest der Ähre weißlich verfärbt. Das Absterben von Teilen der Ähre geht mit starken Ertragsverlusten einher, da die Körner nicht mehr ausreichend gefüllt werden. Das beschriebene Krankheitsbild war namensgebend für die Krankheit, die in der Deutschen Sprache als „Weißährigkeit“ bezeichnet wird.



**Abb.2: Weißährigkeit der Ähren von Weizen (Goswami et al. 2004, Bildrechtsinhaber: John Wiley und Söhne, Lizenz zur Bildverwendung Nummer: 3551400226513, 17 Januar 2015). Das zweite Ährchen von unten zeigt typische Verfärbungen.**

Im Unterschied zum Weizen zeigt Gerste auf dem Feld keine Infektionssymptome. Infizierte Gerstenkörner weisen hell- bis dunkelbraune Verfärbungen auf (Guenther & Trail 2005; Scherm et al. 2013). Neben einem Verlust an Kornmasse und -qualität ist die Ernte auch mit vom Pilz produzierten Toxinen kontaminiert, z.B. 8-Ketotrichothecene, wie NIV und DON, Zealeron (Goswami et al. 2004; Lasztity & Wöller 1974)

Das ursprüngliche Inokulum der Infektion stammt aus pflanzlichen Resten, in denen der Pilz in Form von saprophytischem Myzelium überwintert. Im Frühling, während der Blütezeit der Feldfrüchte, werden von *F. graminearum* Makrokonidien und Askosporen produziert, welche dann die Pflanzen infizieren (Markell 2003).

Der erste Schritt bei der Infektion, die Adhäsion, geschieht über die Konidien oder über klebrige Askosporen, die durch Wind, Insekten oder Regen auf die Blattoberflächen der Pflanze übertragen werden (Parry et al. 1993). Die einzelnen Pflanzenteile sind unterschiedlich infizierbar. Bei der Blüte beispielsweise sind Staubbeutel und Stigma besonders leicht infizierbar. Pilz-Sporen an oder in der Ähre initiieren den Infektionsprozess. Die Auskeimung der Sporen hängt von Umweltfaktoren wie Temperatur, Sporendichte und Luftfeuchtigkeit ab (Colhoun, Taylor, & Tomlinson 1968; Sung & Cook 1981).

Das zweite Stadium der Infektion, die Penetration, kann auf zwei Weges geschehen: durch passive (über natürliche Öffnungen wie die Stomata) oder aktive Penetration (über direkte Penetration) (Walter et al. 2010). Die direkte Penetration geschieht durch kurze Infektions-Hyphen, welche die Kutikula und die epidermalen Zellwände durchdringen (Wanjiru et al. 2002). Zunächst dringt der Pilz nicht durch die Epidermis, sondern entwickelt seine Hyphen an der Blüten- oder Spelzenoberfläche (Goswami & Kistler 2004). Hyphen können auch im Raum zwischen der Kutikula und der Zellwand der Epidermiszellen wachsen (Pritsch et al. 2000). Dieses subkutikuläre Wachstum des Pilzes auf Spelzen, Lemma und Palea ermöglicht ihm eine schnellere Verbreitung und führt vermutlich zur direkten Penetration der epidermalen Zellen.

Die passive Penetration der Infektion dagegen geschieht über die Stomata, Staubbeutel oder Narben und führt anschließend zur Infektion des Parenchyms. So verbreitet sich der Pilz auf einer Ähre von Blüte zu Blüte. Innerhalb einer Ähre wird der Pilz über vaskuläre Bündel in der Blattspindel und der Ährenachse übertragen (Parry et al. 1993; Ribichich et al. 2000)

Die ersten Symptome nach der Infektion treten nach 4 bis 5 Tagen auf (Guenther & Trail 2005). Sie verbreiten sich von der Ähre aus über den Stiel nach unten bis zur Wurzel (Strausbaugh & Maloy 1986). *F. graminearum* verbreitet sich nach und nach über die Xylem-Gefäße von der Rhachis zum Culmus. In der nächsten Stufe dieser vertikalen Kolonisation durchdringt der Pilz das Diaphragma, das die Ähre vom Stiel trennt, und erreicht so die Markhöhle des Stiels. In der vertikalen Achse verbreitet sich der Pilz über

die Gefäße. Nach zwei Wochen der vertikalen Verbreitung fängt der Pilz an, sich radialem Gewebe zu verbreiten. *F. graminearum* verbreitet sich über den interzellulären Raum zwischen dem Xylem und den Fasern des vaskulären Bündels, aber auch über das an die Markhöhle angrenzende Parenchym. Danach beginnt der Pilz, sich intrazellulär über die Tüpfel der Parenchymzellen zu verbreiten. Am Tag 18 nach der Infektion erreicht der Pilz das Chlorenchyma. Langsam erreichen die Hyphen die Hohlräume der Sub-Stomata und füllen diese mit Hyphen. Die Kolonisation der Blätter geschieht auf ähnliche Weise. Sobald der Pilz die Stomata vom Blattinneren her erreicht, bildet er in den natürlichen Stomata-Öffnungen des Halms und der Blätter Perithezien. Ein wichtiger Faktor für die Bildung von Perithezien ist Licht. Daher kann der Pilz in wirtsspezifischen Zellen wie den Stomata-Öffnungen und den lichtdurchlässigen Silikazellen Perithezien bilden (Tschanz et al. 1976; Guenther & Trail 2005). Nach dem Austreten der Askosporen aus den Perithezien ist die Infektion weiterer Pflanzen möglich. Bleiben Reste einer befallenen Pflanze im Feld liegen, kann der Pilz im nächsten Frühling neue Pflanzen infizieren.

### 1.3 Genetik von *F. graminearum*

Im Jahr 2007 wurde das Genom des Stammes *F. graminearum* PH1 (= NRRL 31084) von Cuomo und Kollegensequenziert und analysiert (Cuomo et al., 2007). Das Genom besteht aus vier Chromosomen, enthält 11640 Gene und ist 36.1 Mb groß. Die mit *F. graminearum* verwandten Arten *F. verticillioides*, *F. oxysporum* und *F. solani* enthalten 9 bis 17 Chromosomen. Das *F. graminearum*-Genom enthält eine Vielzahl von Genen für manche Proteinkategorien, so z.B. Transkriptionsfaktoren, hydrolytische Enzyme und transmembrane Transporter. Das *F. graminearum*-Genom hat mindestens um den Faktor 15 weniger „*highidentity duplicated sequences*“ als andere verwandte Pilze einschließlich *S. cerevisiae*. Das könnte daran liegen, dass *F. graminearum* im Gegensatz zu vielen anderen Mikromyzen ein homothallischer Pilz ist, bei dem Kreuzungen eher selten vorkommen (out-crosses). Dies limitiert die Möglichkeit der Aufnahme weiterer Kopien von Genom teilen und die Anhäufung von Repeats (Goswami & Kistler 2004). Bei den Askomyzen ist ein Abwehrsystem gegen „*duplicated sequences*“ bekannt – ein „*repeat induced point mutation*“ (RIP)-System. Dieses System identifiziert und dupliziert Sequenzen und führt während des sexuellen Zyklus zu „C:G zu T:A“-

Übergangsmutationen in beiden Kopien. Das RIP ist in *F. graminearum*-Transposonen beobachtet worden. Unterschiedliche Stämme des *F. graminearum* enthalten mehr als 10000 „single-nucleotid polymorphisms“, die neben den Telomeren lokalisiert sind. Viele „highly polymorphic regions“ enthalten Gene, die in eine Wirt-Pilz-Interaktion verwickelt sind und sich als ungewöhnlich divergent erwiesen sowie höhere Rekombinationsraten zeigten. Diese Regionen der Genom-Innovation könnten durch Selektion während der Interaktionen zwischen dem *F. graminearum* und der Pflanze entstanden sein (Cuomo et al. 2007).

### 1.4 Virulenzfaktoren des *F. graminearum*

Die Infektion der Pflanze geschieht über mehrere Schritte, wie Adhäsion, frühe Erkennung der Pflanze durch den Pilz, Penetration, Schutz vor dem Immunsystem der Pflanze und anschließend Verbreitung und Vermehrung des Pilzes in der Pflanze. Um diesen langen Weg der Infektion durchzustehen, besitzt der Pilz eine Reihe von Virulenzfaktoren. Während des physikalischen Kontaktes, der Adhäsion und der Auskeimung der Sporen, nutzt *F. graminearum* spezifische Rezeptor-Proteine wie z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, FgFTL1 (*F. graminearum* transducin beta-like protein) (Ding et al. 2009) und FgMGV1 (Hou et al. 2002), um die Umgebung wahrzunehmen und die Signale weiter an seine Zellen zu übertragen. Es ist bekannt, dass das *F. graminearum* Genom 84 verschiedene putative G-Protein-gekoppelte Rezeptoren enthält (Cuomo et al. 2007).

Während der aktiven Penetration der pflanzlichen Gewebe dringt *F. graminearum* mit Hilfe von Kutinasen (Cuomo et al. 2007) und Lipasen (FgFGL1) (Voigt et al. 2005), die zur enzymatischen Hydrolyse fähig sind, durch die Cutikula ein. Die Expression der hydrolytischen Enzyme wird durch FgRAS2 GTPase und Gpmk1 MAPK-Kaskaden reguliert (Jenczmionka et al. 2003; Walter, Nicholson, & Doohan 2010; Urban et al. 2003). Während der Infektion werden die Zellwände und Membranen des Pilzes verletzt, dieser ist aber in der Lage, sie durch Chitin-Synthasen (GzCHS5 und GzCHS7) und Sphingolipid-Glucosylceramid-Synthase (FgGCS1) zu reparieren (Walter et al. 2010).

Nach der Penetration verbreitet sich der Pilz subkutikular, substomatal und interzellulär, was im Pilz zu rasanten zytologischen Stoffwechselveränderungen führt.

Die Virulenzfaktoren von *F. graminearum* sind z.B. Trichothecene und andere Mykotoxine (Harris et al. 1981), unter anderem Deoxynivalenol (DON), einem Trichothecen-Mykotoxin, welches die eukaryotische Proteinbiosynthese inhibiert (Walter et al. 2010). Anschließend hydrolisiert der Pilz die pflanzlichen Zellwände durch Pektinasen, Hemicellulasen sowie Cellulasen, zerstört die pflanzlichen Zellmembranen durch Lipasen und dringt in die Zellen rein. Über die Freisetzung von Proteasen, Lipasen und Karbohydrat-abbauenden Enzymen gelangt der Pilzen die für sein Wachstum notwendigen Nährstoffe wie Aminosäuren (AS), Zucker und Fettsäuren (Divon & Fluhr 2007; Lysøe et al 2011).

Cuomo *et al.* (2007) suchten in Regionen mit erhöhter SNP-Dichte (*single-nucleotide polymorphism*) nach vorherrschenden Virulenzfaktor-Sequenzen in Genombereichen, in denen nach bioinformatischer Analyse sekretierte Proteine vorhergesagt worden waren. Sie fanden im Genom vier Gene, die homolog zu Virulenzfaktoren sind, die aus anderen Pilzarten bekannt sind, z.B. *Gas1* und *Gas2* in *Magnaporthe grisea*. Zweiundreißig weitere Gene wurden gefunden, die zu den bekannten Virulenzfaktoren homologe Strukturen aufweisen. Darunter solche, die für Zellwand-degradierende Enzyme kodieren, wie z.B. Endoglucanase und Cutinase. Nebenanderen, zu bekannten Virulenzfaktoren homologen Genen, fanden die Autoren auch eine Hydrophobin-Sequenz (FG01831)

### 1.5 Hydrophobine

Hydrophobine sind relativ kleine Proteine mit Molekülgrößen von ca. 10 kDa, die von nahezu allen filamentösen Pilzen produziert werden. Hydrophobin-Gensequenzen und -Proteine wurden in Ascomycota, Basidiomycota und Zygomycota gefunden (de Vries *et al.* 1993; Wessels 2000). Obwohl die AS-Sequenzen der Hydrophobine wenig Ähnlichkeit untereinander haben, zeigen diese Proteine ein charakteristisches Muster mit acht Cystein-Resten in konservierten Positionen, die miteinander vier Disulfid-Brücken bilden (Schuren & Wessels 1990). Entsprechend ihrem hydrophoben AS-Muster und ihrer Löslichkeit wurden die Hydrophobine in 2 Klassen unterteilt. Die Hydrophobine der Klasse I wurden in Asko- und Basidiomycota, die der Klasse II nur in Ascomycota entdeckt (Wessels 1994). Die AS-Sequenzen der Klasse II Hydrophobine weisen untereinander eine 29-95%-ige Ähnlichkeit auf, während die AS-Sequenzen der Klasse I Hydrophobine untereinander variabler sind (Linder et al. 2005). Die Protein-

Sequenz mancher Hydrophobine enthält auch eine Signal-Sequenz für die Sekretion des Proteins über den ER-Golgi Signalweg (Whiteford & Spanu 2002). Die Hydrophobine werden als Monomere an hydrophil-hydrophoben Grenzflächen sekretiert, wo sie nach der Selbstanordnung der Moleküle amphipathische Filme bilden (Wösten *et al.* 1993, 1994, 1995).

### 1.5.1 Bildung von „Rodlets“

Wie am Beispiel eines Hydrophobins des Gemeinen Spaltblättlings (*Schizophyllum commune* Sc3) gezeigt wurde, bilden die Hydrophobine der Klasse 1 an hydrophil-hydrophoben Grenzflächen sowie an Hyphen-Oberflächen sogenannte „Rodlets“ (Zylinder, Pellets) aus. Dabei handelt es sich um stäbchenförmige Strukturen mit einer Größe von 10x100–250nm, oder Amyloid-ähnliche Fibrillen, die man im Elektronen-Mikroskop erkennen kann (Kwan *et al.* 2006; Wosten *et al.* 1993). Die Hydrophobine der Klasse 2 bilden keine „Rodlets“, sondern zweidimensionale hexagonale Kristalle, die aus vier Molekülen Hydrophobin - stabile Supramoleküle bilden (Paananen *et al.* 2003; Torkkeli *et al.* 2002). Die Selbstaggregation der Hydrophobine geschieht durch Konformationsänderungen: Monomere der Hydrophobin-Klassen I und II enthalten viele  $\beta$ -Faltblatt Strukturen, wobei die Klasse I der Hydrophobine mehr von diesen Strukturen aufweist als die Klasse II. Diese  $\beta$ -Faltblätter lagern sich an der hydrophil-hydrophoben Grenzfläche zu  $\alpha$ -Helix Strukturen um (de Vocht *et al.* 1998).

### 1.5.2 Membranbildung

Während der Selbstaggregation bilden Hydrophobine der Klassen I und II monomolekulare Membranen, die auf einer Seite hydrophob und auf der anderen Seite hydrophil sind. Im Gegensatz zu den Membranen der Hydrophobine der Klasse II sind die Membranen von Hydrophobinen der Klasse I sehr stabil und lassen sich nicht durch Lösungsmittel oder Druck auflösen. Die Membranen der Klasse I-Hydrophobine Sc3P und Sc4p aus *S. commune* können beispielsweise nur bei 100 °C in 2% SDS gelöst werden (de Vries *et al.* 1993), während für die Auflösung von Membranen aus dem Klasse II Hydrophobin CU von *Ophiostoma ulmi* und aus dem Cryparin von *Cryphonectria parasitica* bereits 60% Ethanol und 2% SDS ausreichen (Carpenter *et al.* 1992).

### 1.5.3 Adhäsion an den Oberflächen

Über die Bildung von Membranen und Rodlets hinaus können die Hydrophobine stabilen Schaum in karbonisierten Getränken bilden und zeigen dort eine starke Oberflächenadhäsion (Linder 2009). Eine der ersten Beobachtungen im Zusammenhang mit den Hydrophobinen war deren Fähigkeit, an verschiedenen Oberflächen zu haften. Das Protein SC3 beispielsweise bindet sich an Teflon und bildet dort eine extrem unlösliche Schicht, die nur mit SDS gelöst werden kann (Vocht et al. 2002). Während die Hydrophobine der Klasse I sehr stark haften, zeigen die Mitglieder der Klasse II eine schwächere Adhäsion an Oberflächen und haben einen anderen Bindungscharakter. Interessanterweise können die Hydrophobine von Klasse I und II auch gemischte Membranen bilden (Askolin et al. 2006).

### 1.5.4 Funktionen der Hydrophobine in Pilzen

Pilze sind heterotrophe eukaryotische Organismen, die zwei Typen von Wachstum zeigen: einzellige Hefen und mehrzellige filamentöse Pilze. Hefen haben eine hydrophile Zelloberfläche und besitzen daher keine Hydrophobine. Die vegetativen Hyphen von filamentösen Pilzen, die in feuchten Substraten leben, sind ebenfalls hydrophil und weisen an der Oberfläche keine Hydrophobin-Rodlets auf. Dagegen sind die Hyphen des Luftmyzels sowie die Vermehrungsstrukturen (z.B. Konidien) dieser Pilze hydrophob und besitzen an den Oberflächen Hydrophobine (Bayry et al. 2012). Bei manchen Pilzen mit feuchten Sporen, z.B. bei *Conidiobolus obscurus*, ist die Hydrophobinschicht so lange mit einer schleimigen extrazellulären Polysaccharid-Matrix beschichtet, bis die Spore sich an den Wirt gebunden hat (Latge et al. 1986). Die Genome von filamentösen Pilzen enthalten meistens mehrere Hydrophobingene beider Klassen. Verschiedene Hydrophobine können manchmal, aber nicht immer, einander ergänzen, wenn sie zum richtigen Zeitpunkt exprimiert werden (Linder et al. 2005). *F. graminearum* und *F. verticillioides* enthalten beispielsweise in ihrem Genom fünf verschiedene Hydrophobin-Sequenzen (Fuchs et al. 2004; Sarlin et al. 2012). *S. commune* hat dagegen vier Hydrophobine in seinem Genom (Wösten 2001), während *Phanerochaete chrysosporium* acht Hydrophobin-Gene enthält (Linder et al. 2005).

#### 1.5.4.1 Senkung der Oberflächenspannung des Wassers

Hydrophobine gehören zu den Proteinen mit der höchsten Oberflächenaktivität (Vries et al. 1999; Lugones et al. 1998; Lugones et al. 1999). So kann eines der

oberflächenaktivsten Proteine, das SC3 Hydrophobin von *S. commune*, bei 50µg/ml die Wasseroberflächenspannung von 72 auf 24 mJ/m<sup>2</sup> senken (Wösten et al. 1999). Das Senken der Oberflächenspannung von Wasser ermöglicht dem Pilz seinen Übertritt aus dem wässrigen Milieu (Substratmyzel) in die Luft und somit die Bildung von Luftmyzel. Die Pilze produzieren Hydrophobine, die sich an der Wasser-Luft-Grenze anreichern. Dadurch bildet sich auf der Zelloberfläche eine Membran aus Hydrophobinen, durch welche die Oberflächenspannung des Wassers gesenkt wird. Die wachsenden und sich ausdehnenden Pilz-Hyphen üben einen Druck auf die Hydrophobin-Membranen aus und dehnen diese. Gleichzeitig werden neue Hydrophobine produziert, die sich wiederum an den Oberflächen sammeln. Die Hyphen bleiben so immer von Hydrophobinen bedeckt, sodass nie ein direkter Kontakt zwischen Hyphen und Luft besteht. Mit Hydrophobinen beschichtete Hyphen können die Hydrophobin-Schicht an der Wasser-Luft Phasengrenze durchdringen und so einen Kontakt zur Luft erreichen. In der Erde sind Hyphen fest verankert, sodass sie genügend Turgordruck aufbauen können, um an die Erdoberfläche zu gelangen. Im Wasser dagegen fehlt den Hyphen diese Verankerung, weshalb sie die Hydrophobine brauchen (Wösten 2001).

Es wurde beobachtet, dass Mutanten mit fehlenden Hydrophobin-Genen wie  $\Delta$ SC3 (*S. commune*) oder  $\Delta$ CU (*C. ulmi*) im Gegensatz zum entsprechenden Wildtyp-Stamm kein Luftmyzel mehr bilden konnten (Bowden et al. 1996; Brasier et al. 1995; Lugones et al. 1998). Auch bei der Bildung von größeren multizellulären Strukturen wie etwa Fruchtkörper bei Basidiomyceten, die in ihrem Inneren eine Belüftung benötigen, sind Hydrophobine wichtige Komponenten. In diesen Strukturen bedecken Hydrophobine die Innenseite von Gaskanälen und verhindern durch ihre Hydrophobizität das Eindringen von Wasser. Stämme mit knock-out Mutationen in den Hydrophobin-Genen SC4 in *S. commune* oder ABH1 in *Agaricus bisporus* bildeten Fruchtkörper, die leichter nass wurden als die der jeweiligen Wildtypen (Lugones et al. 1999; van Wetter et al. 2000).

### **1.5.4.2 Anheftung an Oberflächen**

Die Hydrophobine spielen eine Rolle bei der Anheftung der Hyphen an wasserabweisende Oberflächen wie Teflon oder silanisiertes Glas. Das SC3-Hydrophobin von *S. commune* befindet sich an der Zellwand-Teflon Grenzfläche, wo das Protein zur Anheftung an extrem hydrophobe Oberflächen dient (Wösten et al. 1994). HFBI und



HFBII, Hydrophobine der Klasse II von *T. reesei*, sind ebenfalls in der Lage, sich an silanisierendes Glas oder silanisierendes Teflon anzuheften (Linder et al. 2002). Für die gut erforschten Hydrophobine MPG1 (*M. grisea*) und DewA (*A. fumigatus*) sind dieselben Anheftungsfähigkeiten beschrieben worden, welche allerdings von der Ausrichtung der amphiphilen Moleküle abhängig sind (Schmoll et al. 2010; Talbot et al. 1996).

#### 1.5.4.3 Konidien-Verbreitung

Ihre Reproduktion und Verbreitung mit Hilfe von Sporen und Konidien sind zwei der Eigenschaften, die Pilze von anderen, mit ihnen verwandten Organismen unterscheiden. Durch diese Art der Verbreitung sichern sie ihr Überleben sowie den Fortbestand ihrer Art. Wind, Luftströmungen und Regentropfen sind die häufigsten Vektoren der Sporen und Konidien (Whiteford & Spanu 2002). Aufgrund der wasserabweisenden Oberflächeneigenschaft der Sporen werden diese durch die Luftfeuchtigkeit nicht beschwert und können sich so leichter und weiter verbreiten. Unterschiedliche Hydrophobine haben während der Sporulation unterschiedliche Auswirkungen auf die Konidien und Sporen. Beispiele hierfür sind in Tabelle 1 zu sehen.

**Tabelle 1: Hydrophobin-Funktionen während der Sporulation**

<i>Pilz</i>	<i>Hydrophobin</i>	<i>Wirkung auf Sporulation</i>	<i>Quelle</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>	RodAp	Erhöht Hydrophilie der Konidien-Oberfläche, positive Wirkung auf Verbreitung der Konidien	(Thau et al. 1994)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	RodBp	Kein Einfluss auf Bildung von Rodlets und somit auch nicht auf die Verbreitung	(Paris et al. 2003)
<i>Cladosporium fulvum</i>	HCf-1	Bildet Rodlet-Schicht und führt somit zu besserer Verteilung der Sporen	(Whiteford et al. 2004)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Hyd1	Kein Einfluss auf Sporulation	(Fuchs et al. 2004)
<i>Fusarium verticillioides</i>	Hyd2	Kein Einfluss auf Sporulation	(Fuchs et al. 2004)
<i>Magnaporthe grisea</i>	MHP1	$\Delta mhp1$ bewirkt Senkung der Sporulation	(Kim et al. 2005)
<i>Magnaporthe grisea</i>	MPGI	$\Delta mpg1$ -Stamm sporuliert weniger als Wild Typ-Stamm	(Talbot et al. 1996)

## Einführung

<i>Neurospora crassa</i>	EAS	Bildet Rodlet-Schicht und führt zu besserer Verteilung der Sporen	(Bell-Pedersen et al. 1992)
<i>Trichoderma harzianum</i>	SRHI	<i>srhI</i> wird während Sporulation starkexprimiert	(Muñoz et al. 1997)
<i>Trichoderma reesei</i>	HFBII	$\Delta hfb1$ -Stamm sporuliert weniger als Wild Typ-Stamm	(Askolin et al. 2005)
<i>Verticillium dahliae</i>	VDHI	Kein Einfluss auf Sporen	(Klimes & Dobinson 2006)
<i>Fusarium graminearum</i>	AfpA (oberflächenaktives Protein, nicht Hydrophobin)	Bewirkt Verkürzung der Sporen	(Stübner et al. 2010)

### 1.5.4.4 Hydrophobine während der Interaktion zwischen Pflanze und Pilz

Bereits im Jahr 1994 vermutete Wessels, dass Hydrophobine eine gewisse Rolle bei der Interaktion zwischen Pflanze und Pilz spielen könnten (Wessels 1994). Inzwischen ist bekannt, dass manche Hydrophobine wichtig für den Infektionsprozess sind, andere dagegen nicht. Das bislang am besten erforschte Hydrophobin – das Mpg1 von *M. grisea* – ist für eine erfolgreiche Infektion von Reispflanzen notwendig. Die Deletionsmutante  $\Delta mpg1$  hatte eine verringerte Infektionsrate sowie eine reduzierte Appresorienbildung gegenüber dem Wildtyp-Stamm gezeigt. Anhand der Ergebnisse wurde folgende Funktionsweise für das Protein vorgeschlagen: Das Mpg1 Protein wird von den auskeimenden Hyphen in einem infektiösen Töpfchen sekretiert. Anschließend bildet das Hydrophobin auf der hydrophoben Blattoberfläche eine amphipathische Membran. Diese Membran modifiziert die Hydrophobizität der Blattoberfläche und erlaubt dem Pilz, sich mithilfe von durch ihn freigesetzten klebrigen Schleim an die Blattoberfläche anzuheften. Zur einfacheren Anheftung des Pilzes befinden sich an den Oberflächen der Pilze bestimmte Signalmoleküle, die wichtig sind für die Appresorienbildung sind in Zusammenhang mit der Bildung von Hydrophobinen stehen (Talbot *et al.* 1993; Talbot *et al.* 1996). Eine ähnliche Wirkungsweise des Hydrophobins wurde in dem Insektenpathogenen Pilz *Metarhizium anisopliae* entdeckt. Während der Appresorienbildung wird das SsgA-Hydrophobin sekretiert und verhilft vermutlich dem Pilz dazu, sich auf der hydrophoben Kutikula des Wirtes anzuheften (Bidochka *et al.* 1995; Bidochka *et al.* 2001). *C. fulvum* besitzt sechs Hydrophobine. Das Hydrophobin HCf1 hat keine

Auswirkungen auf die Pathogenität des Pilzes, während das Hydrophobin HCF6 zur Adhäsion des Pilzes an seinen Wirt führt und einen Anteil an der Pathogenese hat (Spanu 1997; Whiteford & Spanu 2002; Whiteford *et al.* 2004). Der Mykoparasit *T. asperellum* zeigte die Expression des TasHyd1 Hydrophobins und eine damit verbundene Anheftung an den Wirt ab dem fünften Tag nach der Infektion, während bei einer Mutante mit Deletion des kodierenden Gen *in vitro* keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mykoparasitischen Aktivität festgestellt werden konnten (Viterbo & Chet 2006). Hydrophobin-Deletionsmutanten von *Botrytis cinerea* zeigten hinsichtlich der Infektion ebenfalls keinen Unterschied zum Wildtyp (Mosbach *et al.* 2011). Auch die Hydrophobine von *Fusarium* ssp wurden auf eine etwaige Beeinflussung der Pathogenität hin untersucht. Fucks *et al.* (2004) zeigten, dass beim Keimlings-Infektionstest auch bei den Hydrophobinen FvHyd1 bis 5 in Deletionsstämmen von *F. verticillioides* sowie bei einem Stamm von *F. verticillioides*, der die doppelte Deletion *hyd1Δhyd2Δ* trug, hinsichtlich der Pathogenität kein Unterschied zum Wildtyp auftrat.

### **1.5.4.5 Hydrophobine als Elicitoren (Auslöser)**

Abgesehen von der Funktion der Hydrophobine als Adhäsionsproteine (Mpg1) oder Toxine (CU) sind noch weitere Funktionen vorgeschlagen worden. So haben Templeton *et al.* (1994) vermutet, dass die Hydrophobine als Auslöser der pflanzlichen Immunantwort fungieren könnten. Die Annahme basierte teilweise auf der Tatsache, dass verschiedene bekannte Auslöser von pflanzlichen Abwehrreaktionen kleine, cysteinreiche Proteine sind, wie auch Hydrophobine sie darstellen (Laugé & De Wit 1998). Es wurden mehrere Experimente durchgeführt, um diese Funktionsweise der Hydrophobine zu beweisen. Eine Tomaten-Zellsuspension, die sich als empfindlich gegenüber einer Vielzahl von pilzlichen Elicitoren erwies (Boller 1995), reagierte nicht auf die Behandlung mit Präparaten, die das *C. fulvum*-Hydrophobin HCF-1 enthielten. Darüber hinaus wurden verschiedene *Solanum*-Arten mit einem Kartoffel-Virus infiziert, das ein rekombinantes Hydrophobin enthielt (PVX::HCF-1). Diese Untersuchungen zeigten keine spezifische Reaktion seitens der Pflanze (Whiteford & Spanu 2002). Obwohl diese negativen Ergebnisse formal nicht die Möglichkeit ausschließen, dass die Pflanzen die Hydrophobine als Auslöser für eine Immunantwort nutzen könnten, gibt es bisher keinen experimentellen Beweis dafür.

### 1.5.5 Einfluss von unterschiedlichen Nährstoffen auf die Hydrophobinproduktion

Nährstoffe bewirken in pathogenen Pilzen unterschiedliche Arten von Gen-Expression. So kann beispielsweise Stickstoff zu einer erhöhten Pathogenität von Pilzen führen (Snoeijers et al. 2000). Manche Autoren haben einen Einfluss von Stickstoff und Kohlenhydraten auf die Expression und Produktion von Hydrophobinen festgestellt. Eine Generalisierung der Annahme, dass z.B. Zucker die Expression der Hydrophobine erhöht, ist jedoch nicht möglich. Verschiedene Stoffe wirken sich unterschiedlich auf die Produktion der Hydrophobine aus wie dies aus Tabelle 2 hervorgeht.

**Tabelle 2: Einfluss von unterschiedlichen Nährstoffen auf die Hydrophobinproduktion**

Pilz	Hydrophobin	Wirkung der NS-Quelle	Literatur-Quelle
<i>C. fulvum</i>	HCf1-4	Hohe Expression bei N- und C-Mangel.	(Segers et al. 1999)
	HCf5	Maximale Expression auf Medien mit hohem C-Gehalt und N-Mangel	
<i>Hypocrea atroviridis</i>	Hfb-1c und Hfb-6c	Erhöhte Expression bei C-Mangel	(Mikus et al. 2009)
<i>M. grisea</i>	MPG1	Hefe-Extrakt unterdrückt die Expression von MPG1 C- und N-Stoff Limitation führt zu Aktivierung des MPG1-Promoters	(Talbot et al. 1993) (Donofrio et al. 2006)
<i>Pisolithus tinctorius</i>	hydPt3	C- und N-Konzentrationen bewirken keine Gen-Expression	(Sorin et al. 2001)
<i>T. asperellum</i>	HFB1	Fehlen von Kohlenstoff stimuliert die Expression von HFB1 Stickstoff und Phosphate hemmen die Expression von HFB1	(Viterbo & Chet 2006)
<i>T. atroviride</i>	HFB, Klasse I	Glukose-Limitierung führt zu erhöhter Hydrophobin-Expression	(Seidl-Seiboth et al. 2011)
<i>T. reesei</i>	Hfb2	Stärkere Expression bei N- und C-Limitierung	(Nakari-Setälä et al. 1997)
<i>Xanthoria parietina</i>	XPH1	N-Mangel hat keinen Einfluss	(Scherrer et al. 2002)

### 1.5.6 Hydrophobine in Flechten und Ektomykorrhizen

Die Hydrophobine spielen nicht nur bei den Pilzen eine wichtige Rolle, sondern auch bei Flechten und Ektomykorrhizen. Flechten sind symbiotische Assoziationen zwischen Pilzen (Mycobiont) und einzelligen Algen oder Cyanobakterien (Phycobiont). Die Pilze erhalten von ihrem Phycobionten-Partner festen Kohlenstoff, der durch Photosynthese gewonnen wird. Einer der Gründe, warum Flechten extreme Standorte besiedeln können, ist ihre Fähigkeit, wiederholte Zyklen von Desikkation und Überflutung zu überleben. Die Strukturen, die die Flechten bilden, sind sehr vielfältig und reichen von einfachen bis zu komplexen blattähnlichen Flechtenkörpern mit differenzierten vielzelligen Geweben und Fortpflanzungsorganen. Ihre inneren Hohlräume sind mit einer hydrophoben Membran ausgekleidet. Es wird angenommen, dass ein Beitrag des Mykobionten in dieser symbiotischen Verbindung die Bildung von Hydrophobinen ist, die durch den Mykobionten sezerniert werden. Scherrer et al. sequenzierten aus mehreren Flechten die für Hydrophobine kodierenden Gene und konnten zwei davon Askomyzeten-Arten (z.B. *Xanthoria*) und Basidiomyzeten (*Dictyonema glabratum*) zuordnen. Im Inneren der Flechten waren die Wände sowohl der Mykobionten als auch der Photobionten mit einer Schicht aus typischen Hydrophobin-Rodlets bedeckt (Scherrer et al. 2000, 2002; Trembley et al. 2002a, 2002b). Hierbei ist die Analogie zur Lokalisierung und Funktion von SC4 im Fruchtkörper von *S. commune* auffällig. Es wurde daher vermutet, dass diese hydrophobe Membran sowohl bei den Flechten als auch bei dem genannten Pilz dazu dient, im Fall von Überschwemmungen einen effizienten Gasaustausch zwischen den medullären Schichten zu gewährleisten.

Außerdem sorgt diese Rodlet-Schicht für eine optimale Weiterleitung von Wasser und gelösten Stoffen an diejenigen Strukturen, die mit Hydrophobin beschichtet sind (Dyer 2002). Ausgehend von dieser Annahme und da es möglich ist, dass die Flechten zu den ersten Pflanzen gehören, die an Land gewachsen sind, wurde vermutet, dass die Hydrophobine vielleicht sogar mitverantwortlich dafür waren, dass aquatische Organismen auch an Land wachsen konnten (Wessels 2000; Whiteford & Spanu 2002).

Ectomycorrhizae sind mutualistische Symbiosen zwischen Pilzen (Ascomyceten, Basidiomyceten und einigen Zygomyceten) und vielen Gymno- und Angiospermen. Sie sind gekennzeichnet durch die Bildung von komplexen mehrzelligen Pilz-Geweben, die

umgeben zwischen den Zellen der äußeren kortikalen und tieferen Schichten der Pflanzenwurzeln liegen. Die Beteiligung von Hydrophobinen an der Bildung von Mykorrhiza wurde erstmals für *Pisolithus tinctorius* vermutet. Es wurde dabei festgestellt, dass drei Hydrophobin-Gene (HydPt-1, HydPt-2 und HydPt-3) speziell während der Bildung von Mykorrhiza auf Eukalyptuspflanzenhochreguliert waren. Diese Hydrophobine befanden sich innerhalb der Zellwände aller Pilzzellen in der Mykorrhiza (Tagu et al. 2001). Die höchste Expression des Hydrophobins TTr-Hyd-1 wurde während der Ektomykorrhiza Bildung zwischen *Tricholomaterreum* und der Fichte *Pinus sylvestris* festgestellt. Wenn der Pilz versucht, eine Nichtwirtspflanze zu infizieren, führt dies zu einer geringeren Hydrophobin-Expression (Mankel et al. 2000, 2002). Dies zeigt, dass Hydrophobine möglicherweise eine Rolle bei der Bildung der Mykorrhiza spielen.

### **1.5.7 Bildung von stabilem Schaum – Gushing**

Als Gushing bezeichnet man das spontane Übersäumen von karbonisierten Getränken. Der Gushing-Effekt ist seit mehr als 400 Jahren bekannt. Die erste Beschreibung erfolgte im 16. Jahrhundert von Alexander Nowell (Zapf 2006). Seitdem werden die Gründe dieses Phänomens erforscht. Gushing ist das Resultat von zwei zusammenhängenden Mechanismen: Blasenbildung und Wachstum der Blasen (Sahu et al. 2006). In den 60er-Jahren des 20. Jahrhunderts wurde festgestellt, dass Gushing mehrere Ursachen haben kann. Im Hinblick auf diese Ursachen wurde Gushing in zwei Typen unterteilt: primäres und sekundäres Gushing (Gjertsen et al. 1963; Gjertsen 1967). Sekundäres Gushing entsteht durch unabsichtliche und unerwünschte Zugabe von unterschiedlichen Partikeln zum Bier. Bekannte Partikel sind Kalzium Oxalat-Kristalle, Metall-Ionen oder Reste von Spülmittel (Rammert & Pahl 1992).

Dagegen führt eine schlechte Qualität von Rohstoffen, vor allem des Braumalzes, zu Primärem Gushing. Primäres Gushing tritt im Bier auf, wenn für dessen Produktion Getreide benutzt worden ist, das mit Pilzen der Gattungen *Fusarium*, *Trichoderma*, *Nigrospora*, *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Stemphylium* infiziert war (Shokribousjein et al. 2011). Die Rohstoffe können dabei entweder schon im Feld während der Lagerung oder auch während der Mälzung infiziert worden sein. Während ihres Wachstums produzieren die Schimmelpilze unterschiedliche Metaboliten, die die Qualität des Malzes beeinflussen, unter anderem Hydrophobine. Hydrophobine können schon drei Wochen nach der Aussaat in der Gerste gefunden werden sowie während des gesamten

Wachstums der Gerste (Shokribousjein et al. 2011). Hydrophobine entstehen auch im Verlauf der Mälzung, vor allem während des Weichens und Keimens des Getreides. Interessanterweise ist die Hydrophobin-Konzentration beim Malz zehnmal höher als bei der Gerste. Die Konzentration, die notwendig ist, um Gushing zu verursachen, hängt vom Pilz ab. Allerdings reicht meistens schon eine geringe Konzentration von 1 mg/l oder weniger aus, um das Bier zum Überschäumen zu bringen (Garbe et al. 2009; Sarlin et al. 2005; Shokribousjein et al. 2011).

### 1.6 Polycistronische mRNA in Eukaryoten

In Prokaryoten befinden sich Gene, die eine ähnliche Funktion haben, häufig in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft auf dem Chromosom angeordnet. Derartige Gen-Cluster werden in aller Regel ko-reguliert und auf einer polycistronischen mRNA exprimiert. Normalerweise ist ein einziger Promoter notwendig, um eine polycistronische mRNA zu transkribieren. Trotz der gemeinsamen Transkription der Gene wird jedoch jedes der kodierten Proteine unabhängig von den anderen Proteinen translatiert. Im Vergleich zu Prokaryoten werden die Gene bei Eukaryoten in der Regel mit Hilfe einer monocistronischen mRNA exprimiert. Die Expression jedes einzelnen Gens wird durch einen dazugehörigen Promoter reguliert. Die Translation der mRNA wird dabei von einem eigenen AUG Start Kodon gestartet (Sachs et al. 1997). Allerdings sind bei einigen Eukaryoten wie z.B. Trypanosomen und Nematoden auch Gene bekannt, die auf einer polycistronischen mRNA kodiert sind (Blumenthal 1998; Matthews et al. 1994). Darüber hinaus wurden auch andere Beispiele für polycistronische mRNA und Co-Transkription mehrerer Gene in höheren Eukaryoten gefunden: in Mammalia (Gray et al. 1999; Lee 1991; Sloan et al. 1999), *Drosophila* (Andrew et al. 1996), Seidenraupe (Kanamori et al. 2010) und Tomaten (García-Ríos et al. 1997). Auch bei Hefen wurde eine Expression polycistronischer mRNA sowohl während der snRNA (snoRNA) Expression als auch bei der Expression der *argB* und *argC* Gene im Rahmen der Arginin-Biosynthese in *S. cerevisiae* gefunden (Chanfreau et al. 1998; Minet et al. 1979; Petfalski et al. 1998). Als erstes Beispiel für eine dicistronische mRNA Expression bei phytopathogenen filamentösen Pilzen wurde das Phänomen in *Cercospora nicotianae* entdeckt. Bei diesem Pilz werden Cercosporin Toxin Resistenz Gene (CRG1) als dicistronische mRNA exprimiert (Chung et al. 2003). Eine Erklärung für die Möglichkeit

der Translation der polycistronischen mRNA in Eukaryoten liegt in dem so genannten "*context-dependet leaky-skanning mechanism*". In diesem Fall existieren zwei verschiedene Populationen von Ribosomen. Eine dieser Populationen von Ribosomen erkennt das Start-Kodon des ersten Gens auf der polycistronischen mRNA nicht und translatiert daher nur das zweite Gen der beiden polycistronischen mRNA Transkripte. Die zweite Population der Ribosomen in dieser Zelle translatiert dagegen nur das erste Gen auf der polycistronischen mRNA (Kozak 2002; Kanamori et al. 2010; Wall et al. 2005).

### **1.7 sGFP – Modifiziertes „*green fluorescent protein*“**

GFP ist ein 238 Aminosäuren großes Protein aus der Qualle *Aequora victoria*. Es wurde 1992 aus einer cDNA in *Escherichia coli* kloniert. Im Laufe der Zeit wurde dieses Gen auch in Säugetieren (Pines 1995), Insekten (*Drosophila*) (Wang et al. 1993), Pflanzen (Haseloff & Amos 1995) und filamentösen Pilzen (Spellig et al. 1996) exprimiert. Dieser Erfolg ist einer einzigartigen Qualität des Proteins zu verdanken. Es hat ein Molekulargewicht von 27 kDa, absorbiert Licht bei 395 und 475 nm und emittiert Licht einer Wellenlänge von 508 nm als Fluoreszenz. Um zu fluoreszieren, benötigt das GFP UV-Licht oder blaues Licht sowie Sauerstoff, solange das Protein sich noch nicht richtig gefaltet hat (Lorang et al., 2001; Cormack, 1998). Das richtig gefaltete Protein ist gegen viele Proteasen resistent und bei 65°C und pH5-11 in 1% Natriumdodecylsulfat oder 6M Guanidiumchlorid stabil (Cubitt et al. 1995). GFP verliert seine Fluoreszenz auch nicht in Gewebe, das mit Formaldehyd, Methanol oder Glutaraldehyd fixiert ist. Die beste Fluoreszenz zeigt das Protein bei einem pH-Wert zwischen 7,2 und 8,0 (Lorang et al. 2001).

Durch konfokale Mikroskopie oder quantitative Bild-Analyse kann das GFP in Isolaten von transformierten oder spezifischen Zellen aus einer Zell-Population (Cormack et al. 1996) verfolgt werden. Eine andere Möglichkeit ist seine Beobachtung während einer quantifizierten Genexpression in einzelnen Zellen außerhalb des Organismus (Brand 1995). Man kann die Verteilung und Biomasse einiger Mikroorganismen auch in komplexer Umwelt verfolgen, z.B. in Tieren oder in anderen Wirtsorganismen (Maor et al. 1998), in Biofilmen (Sternberg et al. 1999) oder im Boden (Bae & Knudsen 2000).

Der Wildtyp des GFP aus *Aequora victoria* zeigt in vielen Organismen keine erkennbare Fluoreszenz, weil das Gen nichteffizient translatiert wurde (Cormack 1998; Fernández-



Abalos *et al.* 1998). Aus diesem Grund wurde nach und nach eine optimierte Codon-Nutzung für Hefe (Cormack *et al.* 1997), Pflanzen (Chiu *et al.* 1996) und Säugetiere (Haas *et al.* 1996) entwickelt, um diesen Nachteil zu umgehen.

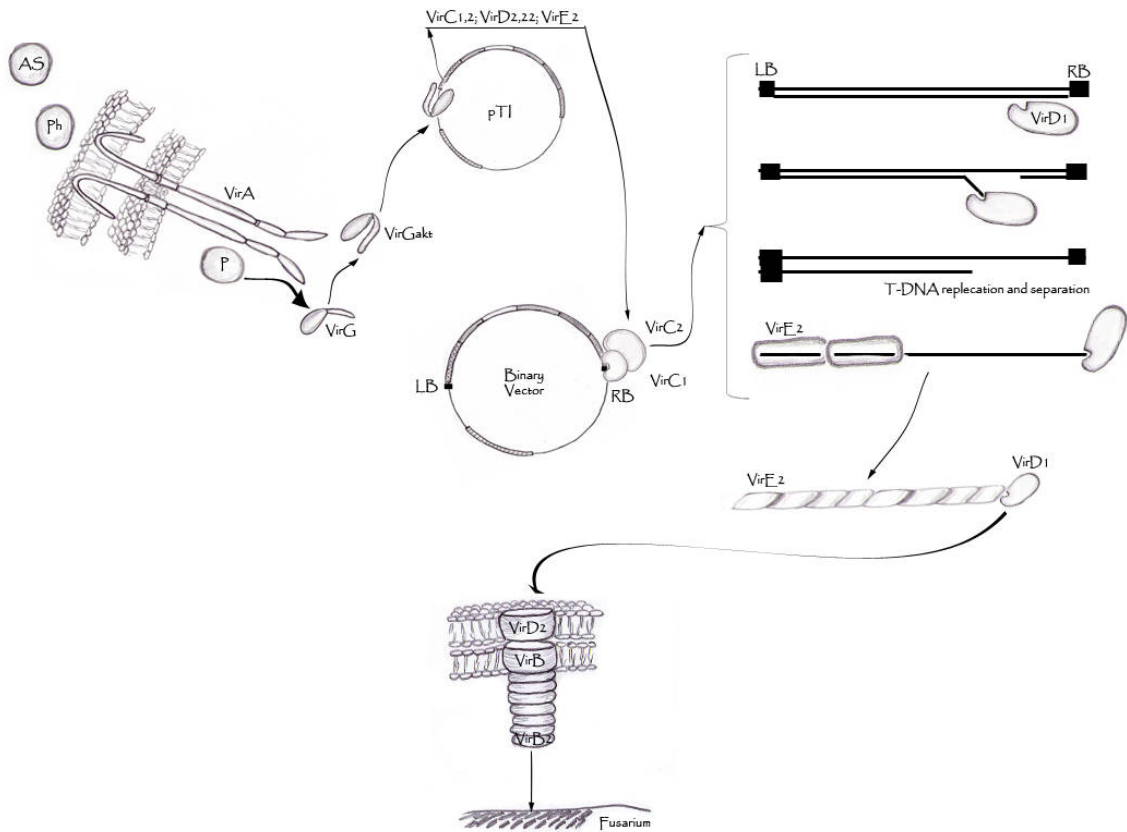
Das GFP wurde sowohl für die Genexpression und Protein-Lokalisierung als zur zellbiologischen Untersuchung von Pilzen verwendet. Nukleus, ER und N-Terminus verschiedener Pilze wurden dabei mit dem GFP markiert (Lorang *et al.* 2001). Der erste Pilz in dem das GFP erfolgreich exprimiert werden konnte, war der Verursacher des Maisbeulenbrands, *Ustilago maydis* (Cormack 1998). Danach folgten *Aspergillus nidulans* (Fernández-Abalos *et al.* 1998) und *Aureobasidium pullulans* (Vanden *et al.* 1997). Bis zum Jahr 2001 wurde das GFP in 16 Pilz-Arten verschiedener Gattungen exprimiert, darunter *Colletotrichum*, *Mycosphaerella* und *Schizophyllum* (Lorang *et al.* 2001). Im Laufe der Zeit wurden auch GFP-Derivate entwickelt, die in anderen Bereichen des Lichtspektrums fluoreszieren: EYFP (gelb), ECFP (blau), DsRed2 (rot) und RCFP (dunkelrot) (Andrie *et al.* 2005; Bourett *et al.* 2002; Nahalkova & Fatehi 2003). Auch diese GFP-Derivate wurden mittlerweile erfolgreich in Pilzen exprimiert.

Das GFP wurde auch bei der Entwicklung von Fusionsproteinen benutzt, unter anderem für Fusionen mit Hydrophobinen. So wurde ein HFB1-GFP ein Fusionsprotein von GFP mit dem Hydrophobin HFB1 aus *T. reesei* entwickelt (Gutiérrez *et al.* 2013; Lienemann *et al.* 2013). Auch für *F. verticillioides* wurden zwei Fusionsproteine mit Hyd1, Hyd2 und monomerem GFP entwickelt (Fuchs *et al.* 2004)

### **1.8 Transformation von Pilzen mittels *Agrobacterium tumefaciens***

*Agrobacterium tumefaciens* ist ein gramnegatives Bodenbakterium, das häufig für die Pflanzen-Transformation verwendet wird (Hansen & Chilton 2000). Bundock und Hooykaas (1996) beschrieben eine neue Methode für die Transformation von *S. cerevisiae* mit Hilfe von *Agrobacterium* Zellen (*Agrobacterium Mediated Transformation*, AMT), zunächst nur im Zusammenhang mit der Pflanzen-Transformation. Zwei Jahre später beschrieben de Groot *et al.* (1998) als erste den Einsatz der Methode für die Transformation eines filamentösen Pilzes mit Hilfe von *Agrobacterium*. In der Folge der ersten Publikation wurden mit Hilfe von AMT viele verschiedene Pilze aus der Gruppe der Ascomyzeten, Basidiomyceten, Oomyceten und Zygomyceten transformiert (Michielse *et al.* 2005). *A. tumefaciens* kann Pflanzen-Protoplasten sowie -Gewebe und -Blätter transformieren. Bei Pilzen kann dieses Bakterium Konidien und Hyphen direkt

transformieren, ohne dass dafür vorher Protoplasten hergestellt werden müssen. Der zweite Vorteil dieser Methode ist die Integration von nur einer Kopie der DNA im Chromosom, wodurch ein gutes Substrat für die homologe Rekombination entsteht. In der Natur kann *A. tumefaciens* Tumore bei Pflanzen verursachen. Dieses Bakterium besitzt die natürliche Fähigkeit, ein DNA-Segment, das sich auf einem sog. Ti-Plasmid (200kbp *tumor inducing Plasmid*) befindet, in die Pilzzelle zu übertragen, sodass das DNA-Fragment in ein Chromosom integriert wird. Das zu übertragende Segment wird dazu am 5' und am 3' Ende mit kurzen (24 bp) Sequenzen, sogenannten *left* und *right borders*, markiert. Die Integration der DNA hängt von der Aktivierung durch ein Set von Virulenz genen (*vir*-Gene) ab, die sich auch auf dem Ti-Plasmid befinden. Diese Gene werden in der Natur durch eine Mischung von Stoffen aktiviert, die der Wirt ausschüttet, z.B. durch Acetosyringon (de Groot et al. 1998). Heutzutage wird ein sogenanntes binäres System benutzt, das aus zwei Vektoren besteht. Ein Vektor enthält *vir*-Gene und der andere die T-DNA. Der pTi-Vektor enthält eine Region mit *vir*-Genen und T-DNA. Die *vir*-Region enthält acht Operons (*vir A* bis *vir H*), die die Proteine für die Verarbeitung und den Transport der T-DNA kodieren. Die T-DNA-Verarbeitung erfolgt durch die Induktion der *vir*-Gene, welche die konstitutiven Gene *virA* und *virG* exprimieren. Das *virA*-Gen wird durch die von den Pflanzen sekretierten Stoffe, z.B. Phenole, Zucker und auch durch niedrigere pH-Werten, aktiviert. Das aktivierte *virA* transphosphoryliert das *virG*, das wiederum zur Aktivierung der übrigen Gene führt (Gelvin 2003). Nachdem die *vir*-Gene aktiviert wurden, wird *virD2* exprimiert. Das Protein *virD2* bindet sich kovalent an die T-DNA, welche vom VirE2 beschichtet wird. Es entsteht ein T-Komplex, der durch einen aus VirB-Proteinen bestehenden Kanal in die Membran transportiert wird. Der T-Komplex integriert sich dann in die Pflanzenzellen und anschließend in ein Chromosom (Zupan et al. 2000). Wenn die T-DNA keine zum Chromosom homologen Sequenzen enthält, wird sie in eine unbestimmte Stelle im Chromosom integriert. Wenn die T-DNA aber eine homologe Sequenz aufweist, wird die T-DNA mittels homologer Rekombination an einer bestimmten Stelle des Chromosoms in dieses aufgenommen (siehe Abb.3). In 20% der Transformationen wird aber nicht nur die T-, sondern auch die Vektor-Sequenz als einzelnes Fragment oder in Verbindung mit der T-DNA in das Chromosom aufgenommen (Permyakova et al. 2009).



**Abb.3: Schematische Darstellung des genetischen Vorgangs in der *A. tumefaciens*-Zelle während der *Fusarium*-Transformation. Acetosyringon (AS).pH-Wert (pH). Phosphor(P). Vir Proteine (VirA, VirG, VirC, VirD, VirE). Left border und right border (LB und RB). Tumor inducing Plasmid (pTI). DNA-Sequenz ( — )**

## Zielsetzung

Der vorliegenden Dissertation lag die folgende Arbeitshypothese zu Grunde:

„Das Klasse II Hydrophobin FgHyd5p ist von Bedeutung für den Lebenszyklus und die Virulenz des Getreidepathogens *F. graminearum*.“

Das Ziel der im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Untersuchungen war damit die Klärung der Frage nach der natürlichen Funktion des Klasse II Hydrophobins FgHyd5p im Hinblick auf den Phänotyp von *F. graminearum*, die physiologischen und morphologischen Eigenschaften des Pilzes, seine Virulenz gegenüber Getreidepflanzen sowie auf sein Potential zur Auslösung von Gushing in Bier. Die genannten Eigenschaften sollten mithilfe von Mutanten von *F. graminearum* untersucht werden, die das *fghyd5* Gen nicht exprimieren, bzw. dessen Expression durch (Co)-Expression des GFP Proteins anzeigen und ggf. FgHyd5p lokalisieren helfen.

## Materialien und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mikroorganismen und Getreide

Der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (TMW 2.493) wurde für Herstellung von Plasmidkonstrukten benutzt. Dieser Stamm weist eine endA1-Mutation auf, die die intrazellulären Endonukleasen inaktiviert. Das führt zu einer erhöhten Stabilität des DNA Plasmids in der Zelle.

Die *F. graminearum*-Stämme TMW4.0130, TMW 4.0139, TMW 4.0157, TMW 4.0154, TMW 4.0449, TMW 4.0184, TMW 4.0133 und TMW 4.0173 wurden für den Test auf Antibiotika-Resistenz verwendet.

Der *F. graminearum*-Stamm (TMW 4.0157) ist ein Isolat aus Gerstenkörnern (isoliert von L. Niessen) und weist auf Medien mit einer Hygromycin B-Konzentration höher als 50  $\mu\text{g/ml}$  eine erhöhte Sporulation und keine Wachstum auf. Dieser Stamm ist bei CBS mit der Nummer 136009 hinterlegt und ist öffentlich zugänglich. Dieser Stamm wurde für die Amplifikation genomischer DNA benutzt sowie für die Entwicklung der Knock-out- und Reporterstämme.

Der *A. tumefaciens*-Stamm AGL1 (TMW2.1458) wurde für die homologe Integration von Inserts in das *F. graminearum* Genom verwendet. Der AGL1-Stamm enthält ein hypervirulentes Ti-helper-Plasmid pTiBo542 $\Delta$ T mit einer deletierten „border sequence“ (Hood et al. 1986; Komari et al. 1986) und einer Insert mutation in *recA*, dem allgemeinen Rekombinations-Gen, welches das rekombinante Plasmid stabilisiert (Lazo et al. 1991)

In Tabelle 3 sind die *E. coli*-, *A. tumefaciens*- und *F. graminearum*-Stämme aufgelistet, die nach den Transformationen entstanden sind. Die Inserts in die Plasmide sind in der Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 3: In dieser Arbeit entstandene Stämme von *E. coli*, *A. tumefaciens* und *F. graminearum***

Organismen	Vektor, Resistenz
<i>E. coli</i> DH5α	pHyd5-Int, <i>amp<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α	pGFP, <i>amp<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α,	pHGFP, <i>amp<sup>r</sup></i> , TMW2.1479
<i>E. coli</i> DH5α	pPHGFP, <i>amp<sup>r</sup></i> , TMW2.1480
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2-Thyd5, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i> , TMW2.1481
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2-PHT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2-PHtaaT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2PkoT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i> , TMW2.1482
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2-PkosGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i> , TMW2.1483
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2-PHtaasGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α	pPK2-PHsGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i>
<i>E. coli</i> DH5α	pSK-379sgfp, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i>
<i>A. tumefaciens</i>	pPK2-PkosGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i> , TMW2.1483
<i>A. tumefaciens</i>	pPK2-PHtaasGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i> , TMW 1.1528
<i>A. tumefaciens</i>	pPK2-PHsGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , <i>kan<sup>r</sup></i> , TMW 1.1529
<i>F. graminearum</i>	pPK2-PkosGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , TMW4.268
<i>F. graminearum</i>	pPK2-PHtaasGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , TMW 4.2467
<i>F. graminearum</i>	pPK2-PHsGT, <i>hygB<sup>r</sup></i> , TMW 4.2468

Für die Infektionsversuche wurden handelsübliche Bio-Gerste und -Weizen benutzt. Diese Weizen und Gerste waren nicht genotypisiert. Winter Gerste Sorte "Regina" wurde freundlicherweise durch den Lehrstuhl für Brau- und Getränketechnologie, TU-München bereitgestellt. Bio-Weizen wurde per Internet unter bei [www.getreidemuehlen.de](http://www.getreidemuehlen.de) (Ursprung des Weizens: Deutschland, Werl) bestellt.

### 2.1.2 Chemikalien

Wenn nichts anderes angegeben ist, wurden Chemikalien von den folgenden Firmen verwendet: Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Fluka Serva (Heidelberg, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland).

### 2.1.3 Geräte

**Tabelle 4: Geräte**

Gerät	Model	Hersteller
Agarose Gel Kamera 25 x 20 cm	Easy Cast electrophoresis system	Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
Agarose Gel Kamera 13.8 x 12 cm	Easy Cast electrophoresis system	Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA
Autoklaven	2540 ELV	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
	Varioklav	H + P Labortechnik, Oberschleißheim, Deutschland
Brutschränke	Certomat BS-1	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
	Hereaus B5042E	Hereaus Instruments, Hanau, Deutschland
	Memmert INB series	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
	WiseCube®WIS-ML02	Witeg Labortechnik GmbH, Wertheim, Deutschland
Zentrifugen	Sigma 1 K 15	Sigma Labortechnik, Osterode am Harz, Deutschland
	Sigma 6-16K	Sigma Labortechnik, Osterode am Harz, Deutschland
	J-6	Beckman, Palo alto, CA, USA
	J-2	Beckman, Palo alto, CA, USA
	Hermle Z383 K	Hermle Labortechnik, Wehningen, Deutschland
	Hermle Z382 K	Hermle Labortechnik, Wehningen, Deutschland
Elektroporation System	Bio-Rad Gene pulser device	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Sterilbank	HERA safe	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Microscope	Axiolab	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland
Nanodrop	Nanodrop1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
PCR-Cycler	Primus 96 plus	MWG Biotech, AG, Ebersberg, Deutschland
	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
pH determination (Elektrode)	InLab 412, pH 0-14	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
pH determination (Messgerät)	Knick pH 761 Calimatic	Knick elektronische Geräte, Berlin, Deutschland
Photometer	Novaspellq	Pharmacia Biotech, Cambridge, England

## Materialien und Methoden

Pipetten	Pipetman	Gilson-Abomed, Langenfeld, Deutschland
Stromversorgung	MPP 2 x 3000 Power Supply	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
	Electrophoresis Power Supply EPS 3000	Pharmacia Biotech, Cambridge, England
	2197 Supply PPS 200-1D	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Rein Wasser	Euro 25 und RS 90-4/UF rein Wasser System	SG Wasseraufbereitung GmbH, Barsbüttel, Deutschland
Schüttelgerät	Certomat R	B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland
	Vortex 2 Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Rührer	RCT-Basic	Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland
Thermoblock	Techne DRI-Block DB3	Thermo-Dux Gesellschaft für Laborgerätebau mbH, Wertheim, Deutschland
Ultraschallwasserbad	Sonorex Super RK 103H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Ultraschall	UP 200S	Dr. Hielscher GmbH, Teltow, Deutschland
	SONOPLUS/SH70G	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
UV Tisch	Herolab UVT 28M	Herlab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland
Wasserbad	Lauda BD	LAUDA Dr. D. Wobser GmbH & Co., Lauda-Königshofen, Deutschland
UV Lichtaus Schwarzlichtröhre	Leuchtstofflampe 18W Schwarzlicht L 18/73	Osram GmbH, München, Deutschland
Weislichtlampe	Leuchtstofflampe 18W Weslichtlicht L 18/73	Osram GmbH, München, Deutschland
Turbidimeter	Loopamp LA-320C real-time Turbidimeter	EIKEN Chemical Co., LTD, Tokyo, Japan
Mühle	Labor-Scheibenmühle DLFU	Bühler GmbH, Braunschweig, Deutschland
Gefriertrockner	FreeZone 2,5Plus,	Labconco, Kansas City, USA

### 2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG-Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und bis auf 100 pmol/µl mit sterilem VE-Wasser verdünnt. Primer für die RT-LAMP- und die LAMP-Reaktionen wurden bis auf 50 pmol/µl verdünnt. Die in dieser



Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den hier folgenden Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgelistet.

**Tabelle 5: Oligonukleotide für die Klonierungen**

Name	Sequenz 5' → 3'	Annealing
5' HydSall-2	GCGGTTCGACATGAAGTTCTCACTCGCCGCCGTTGCC	55°C
3' HydSall-2	CGCGTCGACTTAGTCCTGGACACCAGTAGGGGTA	55°C
5' PromHind-2	GCGAAGCTTGTGGAGATTTTCTTGATTCTG	62°C
3' PromHind-2	CGCAAGCTTGATGAATAGAGTGATTGGTTAG	62°C
5' ThydHindIII	GCGAAGCTTAGTGTCACGAGTTTGTGACCTTGTATAAT	64°C
3' ThydHindIII	CGCAAGCTTTATCTCACTTTCACTCGGAAGCGCATGAGTG	64°C
5' PhydEcoRV-2	GCGGATATCGTGGAGATTTTCTTGATTCTGGGGCA	60°C
3' Hyd5-Apa-EcoRV-2	CGCGATATCGGGCCCTTAGTCCTGGACACCAGTAGGGG	55°C
3' Hyd5taa-AE-2	CGCGATATCGGGCCCGTCCTGGACACCAGTAGGGGTAT	55°C
3' Pknock out	CGCGATATCGGGCCCATGAATAGAGTGATTGGTTT	62°C
5' sGFPApal-2	GCGGGGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTT	55°C
3' sGFPApal-2	CGCGGGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGT	55°C
5' 50bpminPhyd	GAGAATCAAGAATCCCCAGATGTACATAGG	62°C
3' Schnittstellen	GTTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT	62°C
5' RevTtrpC	CGTGTACTGTGTAAGCGCCCACTCCACATCTCCA	64°C

**Tabelle 6: Oligonukleotide für die RT-LAMP**

Name	Sequence 5' → 3'	Annealing
Hyd5-ID1-F3	CAGGCCTACATCCCTTGC	68°C
Hyd5-ID1-B3	CAGAGGATGCCTTGGTCAAG	
Hyd5-ID1-FIP	GAAGGGGGGTTTCCGCAGTCAGTGGCCTCTACGGCACTT	
Hyd5-ID1-Bip	TCTCCCACCGACGCCGACATGGGGAGGACACAGCAG	
Hyd5-ID1-F2	AGTGGCCTCTACGGCACTT	
Hyd5-ID1-F1c	GAAGGGGGGTTTCCGCAGTC	
Hyd5-ID1-B2	TGGGGAGGACACAGCAG	
Hyd5-ID1-B1c	TCTCCCACCGACGCCGACA	
Hyd5-ID1-LoopF	CCAAGACATCAGTAGCACAG	
Hyd5-ID1-LoopB	ACTTCAGCGCTGTCTGCG	
EF1-ID22-F3	ACCACTACCGGTCACCTTGA	
EF1-ID22-B3	GCGTCAATGACGGTGACAT	
EF1-ID22-FIP	AGGAACCCTTACCGAGCTCGG-CGGTGGTATCGACAAGCG	
EF1-ID22-BIP	CTTGACAAGCTCAAAGCCGAGCAGGAGTCTCGAACTTCCAGA	
EF1-ID22-F2	CGGTGGTATCGACAAGCG	

EF1-ID22-B2	AGGAGTCTCGAACTTCCAGA
EF1-ID22-F1c	AGGAACCCTTACCGAGCTCGG
EF1-ID22-B1c	CTTGACAAGCTCAAAGCCGAGC
EFG1-ID22-Loop F	GCTTCCTTCTCGAACTTCTC
EFG1-ID22-LoopB	TCAAGTACGCCTGGGTT
βT -ID175-F3	GCTTTTCCGACCCGACAAC
βT -ID175-B3	GGTACCACCACCAAGAGAGT
βT-ID175-FIP	TCAGCACCTCGGTGTAATGACTTCGTTTTCCGGTCAATCCGG
βT -ID175-BIP	CCAAGTTCTCGATGTCGTCCGCGGGTGATTTGGAAACCCTGG
βT -ID175-LoopF	CTTGGCCAGTTGTTTCCG
βT -ID175-LoopB	GAGGGCTGTGACTGCCT

### 2.1.5 Restriktiosenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden bei der Firma MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) bestellt und gemäß der Bedienungsanleitung des Herstellers benutzt. Wenn es möglich war, wurden Fastdigest®-Enzyme verwendet.

### 2.1.6 Puffer

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Komponenten für die Puffer in deionisiertem Wasser gelöst, wobei die Prozentwerte für die flüssigen Komponenten Volumen pro Volumen (v/v) und für feste Bestandteile Gewicht pro Volumen (w/v) entsprechen. Alle Puffer, die in dieser Arbeit benutzt wurden, sind – mit Ausnahme der fertigen Kit-Puffer, in **Table 7** aufgelistet.

### Table 7: Puffer

#### Agarose Gel Electrophoresis

Name	Zusammensetzung
TAE buffer	2,0 M Tris, 1,0 M Essigsäure, 0,1 M EDTA, pH 8,2
5x Loading dye	50 mM EDTA, 40% Saccharose, 0,001% Bromphenol blau

#### DNA Extraktion

Name	Zusammensetzung
------	-----------------

<b>TES buffer</b>	100 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 2% SDS
<b>TE buffer</b>	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0
<b>Lysis buffer</b>	2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

### PEG-mediated transformation

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>STC buffer</b>	0,8 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>SPTC buffer</b>	STC Puffer, 40% Polyäthylenglykol 4000

### 2.1.7 Medien

Alle Medien wurden 20min lang bei 121°C autoklaviert. Hitzesensible Stoffe und Lösungen wurden steril filtriert (Porenweite 0,2 µm) und erst dann zu den Medien gegeben, wenn diese auf ca. 55°C abgekühlt waren. Für die Verfestigung wurde 1,5% Agar (Difico) zugefügt. Prozentangaben verstehen sich immer als Gewichtsprozent bezogen auf 1 L Medium (% w/v).

### Tabelle 8: Nährboden

#### *Escherichia coli*

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>LB</b>	1% SojaPepton, 0,5% Hefe-Extrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5

#### *F. graminearum*

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>CM</b>	0,6%Hefeextrakt, 0,6% Kasein Hydrolysat; <u>Nach dem Autoklavieren</u> : 1% Saccharose
<b>Regeneration</b>	0,1%Hefeextrakt, 0,1% Kasein Hydrolysat; <u>Nach dem Autoklavieren</u> : 0,1 M Saccharose
<b>Malz-Extrakt</b>	3% Malz-Extrakt, 0,2% Soja Pepton, pH 6,5
<b>Mungbohnen</b>	Grüne Mungbohnen ( <i>Vigna radiata</i> ) (4% w/v) wurden 5min lang in Wasser gekocht und anschließend filtriert, um die Bohnen vom Wasser zu trennen. 2% w/v Agar wurde zugefügt und das Medium wurde autoklaviert.
<b>MMC Medium</b>	0,3% KNO <sub>3</sub> , 6,25% M-100 Salz-Stammlösung
<b>YPG</b>	1% Pepton aus Casein, 5% Hefeextrakt, 2 % Glukose, 1,5% Agar

## Materialien und Methoden

<b>YES</b>	2% Hefeextrakt, 1,5 % Saccharose, 0,5 g/L MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,001 g/L ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,005g/L CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O, 1,5% Agar, pH 6,5+/-0,1
<b>SNA</b>	1g/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1g/L KNO <sub>3</sub> , 0,5g/L KCl, 0,5g/L MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,4 g/L Glykose, 0,4 g/L Saccharose, 2 % Agar
<b>PDA</b>	200 g in Scheiben geschnittene Kartoffeln wurden 1h lang in 1 l Wassergekocht. Das Wasser wurde durch ein Sieb gegeben, 2% Glucose, 1,5% Agar
<b>Karotten-Agar</b>	400g Karotten wurden 20min lang in 500ml H <sub>2</sub> O gekocht, püriert, auf 1 L H <sub>2</sub> O aufgefüllt, 1,5% Agar
<b>OA</b>	3% Haferflocken, 0,01g/L ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 0,005g/L CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O

### *Agrobacterium tumefaciens*

<b>Stammlösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Salz für das Induktionsmedium</b> (Hooykaas et al. 1979)	3,625 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 5,125 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,375 g/l NaCl, 1,250 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O, 0,165 g/l CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 0,0062 g/l FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O und 1,250 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . Die Salze wurden separat in Wasser gelöst und autoklaviert.
<b>MES</b>	1 M MES, pH 5,3 MES wurde steril filtriert.
<b>Acetosyringone</b>	10 mM Acetosyringone, pH 8,0 Acetosyringon wurden sterilfiltriert
<b>Mikroelemente für die M-100 Salze</b>	60 mg/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 140 mg/l MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O, 400 mg/l ZnCl <sub>2</sub> , 40 mg/l Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 100 mg/l FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 400 mg/l CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O
<b>Salz für das M-100-Medium</b>	1,6% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,4% Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,8% KCl, 0,2% MgSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 0,1% CaCl <sub>2</sub> , 0,8% Mikroelement-Lösung
<b>Induktionsmedium</b>	10 mM Glukose (5 mM für Agarplatten), 0,5% Glycerin, 40% Salzstammlösung. Nach dem Autoklavieren wurden 40 mM MES und 200 µM Acetosyringone hinzugefügt
<b>M-100</b>	1% Glukose, 0,3% KNO <sub>3</sub> , 6,25% M-100 Salzstammlösung

### 2.1.8 Plasmide

Für 14 Klonierungsschritte wurden mehrere DNA-Vektoren benutzt, diese sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die verwendeten Vektor-Karten sind in Kapitel 7.1 zu finden.

**Tabelle 9: Vektoren**

<b>Name</b>	<b>Inserts</b>
pHyd5-Int	<i>hyd5</i> ohne Introns <i>amp<sup>r</sup></i>
pGFP	Inventrogen, <i>ngfp</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>
pHGFP	<i>hyd5</i> ohne Intronen, <i>ngfp</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>
pPHGFP	<i>Phyd5</i> , <i>hyd5</i> ohne Intronen und <i>ngfp</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>

pPK2	Covert et al. (Covert et al. 2001)
pPK2-Thyd5	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, hygB<sup>r</sup></i>
pPK2-PHT	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, Phyd5, hyd5</i> ohne Intronen, <i>hygB<sup>r</sup></i>
pPK2-PHtaaT	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, Phyd5, hyd5</i> - ohne Intronen und stop Codon – <i>taa</i> , <i>hygB<sup>r</sup></i>
pPK2PkoT	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, Phyd5, hygB<sup>r</sup></i>
pPK2-PkosGT	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, Phyd5, sgfp, hygB<sup>r</sup></i>
pPK2-PHtaasGT	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, Phyd5, hyd5</i> - ohne Intronen und stop Codon – <i>taa</i> , <i>sgfp, hygB<sup>r</sup></i>
pPK2-PHsGT	<i>Thyd5, kan<sup>r</sup>, Phyd5, hyd5</i> ohne Intronen, <i>sgfp, hygB<sup>r</sup></i>
pSK-379sgfp	<i>sgfp, hygB<sup>r</sup>, kan<sup>r</sup></i>

Plasmid pPK2 wurde für die *F. graminearum*-Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* benutzt. pPK2 enthält den pBR322 Origin, der wiederum Ampicillin- und Tetrazyklin-Resistenzgene sowie Kanamycin-Resistenzgene für die Replikation und Selektion in *E. coli* und *A. tumefaciens* enthält. Der pPK2-Vektor enthält eine T-DNA. Die Transfer DNA hat eine Hygromycin-Resistenzkassette (*hygromycin B phosphotransferase* Gene), die unter der Kontrolle des Promoters *PgpdA* sowie des Terminators *TtrpC* von *Aspergillus nidulans* liegt. Die T-DNA wurde mit Cloning Sites und zwei T-DNA Border Regionen markiert. Die T-DNA Border Regionen sind für die Übertragung des jeweiligen Gens in das *F. graminearum*-Genom mittels *A. tumefaciens* verantwortlich (Covert et al., 2001)

Plasmid pSK-379sgfp ist ein Derivat aus dem Plasmid pSK-379 und enthält eine *sgfp*-Sequenz unter der Kontrolle des *PgpdA* - Promoters sowie eine Pyriminamin-Resistenzkassette (Dirr et al. 2010; Wagener et al. 2008).

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen (Calciumchlorid-Methode)

10 ml des LB Mediums wurden mit *E.coli* DH5α geimpft und ÜN bei 37°C und 180rpm bis OD<sub>590</sub> 0,5. inkubiert. Zellen wurden mittels Zentrifugierung (5.000xg, 5 min, 4°C) gesammelt und in 5ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Das Prozedere wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen 30minlang auf Eis inkubiert und in 1 ml eiskalter 100 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach der Zugabe von eiskaltem Glycerin (87% v/v) wurden die Zellen in 0,1 ml-Portionen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### **2.2.2 Herstellung von elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen**

Einzelne Kolonien von *A. tumefaciens* AGL1 wurden ausgewählt und in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (25°C, 180 rpm, ÜN) inkubiert. 500 µl der ÜN-Kultur wurden in 100 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und bei 25°C und 180rpm bis auf OD<sub>660</sub> 0.7 wachsen gelassen. Diese Kultur wurde 10min lang auf Eis inkubiert und anschließend mittels Zentrifugation (4.000 rpm, 5min, 4°C) sedimentiert. Das Pellet wurde in 15 ml eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und noch einmal sedimentiert (4.000 rpm, 5min, 4°C). Es folgte ein weiterer Resuspensionsschritt in 4ml 10% Glycerin und noch eine Zentrifugierung (4.000 rpm, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1.5 ml 10% Glycerin resuspendiert und in 100 µl-Portionen aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert (Shen & Forde 1989).

### **2.2.3 Transformation des chemisch kompetenten *Escherichia coli***

Zu den chemisch kompetenten, noch bei -80°C eingefrorenen *E. coli*-Zellen wurden 1005µl Plasmid (100ng/µl) gegeben. Die Zellen wurden 30min lang auf Eis inkubiert. Das Gemisch aus *E. coli*-Zellen und Plasmid wurde für 90 s bei 45°C inkubiert und danach für weitere 90 sauf Eis inkubiert. Die transformierten *E. coli*-Zellen wurden mit 1 ml LB Medium gemischt und 1 h bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen bei für 1min 2.300 x g. Das Pellet wurde resuspendiert und auf LB Agar (mit Zusatz verschiedener Antibiotika, je nach Plasmid) ausplattiert. Die Platten wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Die einzeln wachsenden Kolonien wurden mittels PCR (siehe 2.3.1) und Gen-spezifischen Primern (siehe Tabelle 5) auf die richtige Insert-Orientierung untersucht (Hanahan 1983).

### **2.2.4 Transformation des elektrokompetenten *Agrobacterium tumefaciens***

Elektrokompetente Zellen von *Agrobacterium tumefaciens* wurden auf Eis aufgetaut. Bis zu 200 ng Plasmid-DNA von pPK2-PkosGT, pPK2-PHsGT oder pPK2-PHtaasGT (vgl. Kapitel 2.3.5, 2.3.6 und 2.3.7) wurden zu 50µl-Zellen gegeben und in eine eiskalte Elektroporationsküvette übertragen. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit dem GenePulser II Electroporation System von Bio-Rad (Hercules, USA) mit folgenden Einstellungen gepulst: 25 µF, 400 Ω und 2.5 kV. Sofort nach dem Pulsen wurde 1 ml des LB-Mediums ohne Antibiotika zugegeben und die Zellen wurden für 3h bei 30°C ohne Schütteln inkubiert. Schließlich wurden die Zellen auf LB-Platten mit

50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und für 3 d bei 30°C inkubiert. Die einzeln wachsenden Kolonien wurden mittels PCR und einem Gen-spezifischen Primerpaar auf die richtige Insert-Orientierung überprüft (Shen & Forde 1989).

### **2.2.5 Herstellung *F. graminearum* Sporen-Suspensionen**

*F. graminearum* wurde auf MB-Platten eingimpft und für 14 d bei RT und einer je 12-stündigen Photoperiode (Weißlicht + UV aus Schwarzlichtröhre) inkubiert. Die Konidien wurden durch Zugabe von 3 ml sterilem Leitungswasser und Glasperlen (0,5 cm) geerntet. Dann wurden sie mit einer Zählkammer nach Thoma (Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim/Rhön, Deutschland) ausgezählt und die Konidien-Konzentration (Konidien pro ml) nach der Standard-Methode berechnet.

### **2.2.6 Herstellung eines Extraktes aus den Konidien von *F. graminearum***

Wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, wurden 20ml einer Konidien suspension mit  $5 \times 10^6$  Konidien/ml hergestellt. Die Sporen wurden für 10min bei 5000 x g abzentrifugiert. Das Sediment wurde in flüssigem Stickstoff lange gemörsert, bis eine homogene Masse entstand, die nach mikroskopischer Überprüfung keine intakten Konidien mehr enthielt. Die Suspension wurde in 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O verdünnt und direkt in die Versuche eingesetzt.

### **2.2.7 Produktion von Perithezien (*Gibberella zeae*)**

Der *F. graminearum* Wildtyp-Stamm sowie drei Transformanten-Stämme wurden auf Karotten-Agar zur Produktion der Perithezien verwendet. Je Stamm wurden zwei Myzelium-Fragmente auf zwei gegenüberliegenden Seiten einer Petrischale auf dem Karotten-Agar platziert und für 6 d bei Tageslicht und RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Luftmyzel entfernt und die Platten wurden mit 2,5% Tween 60 überschichtet, um eine weitere Luftmyzel-Entwicklung zu vermeiden (Cavinder et al. 2012). Nach drei Tagen weiterer Inkubation wurde die Perithezien-Zahl makroskopisch bestimmt.

### **2.2.8 Transformation von *F. graminearum* mittels ATMT**

Eine „*Agrobacterium tumefaciens* Mediated Transformation“ wurde nach Schmidt-Heydt et al. (2009) durchgeführt. Der *A. tumefaciens*-Stamm, der einen pPK2-PkosGT-, pPK2-PHtaasGT- oder pPK2-PHsGT-Vektor enthielt, wurde in 7 ml des LB-Mediums mit 50 µg/ml Kanamycin eingimpft und für 20h bei 250 rpm und 29°C inkubiert. Nach

der Inkubation wurden die Zellen mit dem Induktionsmedium unter Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Acetosyringone (AS) bis auf  $\text{OD}_{660}$  0.15 verdünnt. Die Zellen wurden bei 29°C und 250 rpm weiter inkubiert, bis sie eine  $\text{OD}_{660}$  von 0.6 - 0.7 erreicht hatten. Eine *F. graminearum* TMW 4.0157 Konidien-Suspension mit einer Konidienkonzentration von  $10^5$  bis  $10^6$  Konidien/ml wurde mit der *A. tumefaciens*-Zellsuspension gemischt. 100  $\mu\text{l}$  dieser Suspension wurden auf den Induktionsmedium-Platten mit und ohne 200  $\mu\text{M}$  AS ausplattiert. Die Platten mit dem Induktionsmedium waren vorher mit zurechtgeschnittenen sterilen Zelophanmembranen bedeckt worden. Nach 48h co-Kultivierung bei 30°C wurden die Zelophanmembranen auf M-100 Platten mit Zusatz von 300  $\mu\text{g/ml}$  Cefoxin und 150  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B übertragen und für 7 d bei RT inkubiert. Die gewachsenen Transformanten wurden danach mittels PCR auf das Vorhandensein der entsprechenden Inserts untersucht.

### **2.2.9 Single-Spore-Isolation**

Die Konidien-Suspension der *F. graminearum*-Transformanten wurde hergestellt, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Mungbohnen-Medium wurde mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B hergestellt. 100  $\mu\text{l}$  der Konidien-Suspension mit einer Konzentration von  $3 \times 10^2$  Konidien/ml wurden ausplattiert und für 4h bei 20°C inkubiert. Ausgekeimte Konidien, die in ausreichend weitem Abstand zu anderen Konidien lagen, wurden unter dem Mikroskop untersucht, ausgestochen und auf eine unbewachsene Platte mit Mungbohnen-Medium übertragen.

### **2.2.10 Antibiotika-Resistenz von *F. graminearum* Stämmen**

Um die Antibiotika-Resistenz von *F. graminearum*-Stämmen zu testen, wurden ein SNA-Agar-Medien mit jeweils 50, 100, 150, 200, 250, 300 und 350  $\mu\text{g/ml}$  Hygromycin B hergestellt. Das Myzel der *F. graminearum*-Stämme TMW4.0130, TMW 4.0139, TMW 4.0157, TMW 4.0154, TMW 4.0449, TMW 4.0184, TMW 4.0133 und TMW 4.0173 wurde zentral auf die Platten eingepflegt und für 7d bei RT inkubiert. Das Wachstum der *F. graminearum*-Stämme wurde als positiv eingestuft, wenn die Kolonien in dieser Zeit einen Durchmesser von mindestens 2-3 cm erreicht hatten.



## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gDNA und cDNA wurden mittels PCR und Phusion® High-Fidelity *Taq*DNA Polymerase (NEB Inc.) amplifiziert. Für die Amplifikation wurde der Thermo Cycler Primus96 plus (MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland) und spezifische Oligonukleotid-Primer (Kapitel 2.1.4) benutzt. Die PCR-Bedingungen wurden nach der Gebrauchsanweisung der verwendeten *Taq* Polymerase gewählt: „Initial Denaturation“ 98°C - 30 s, (Denaturierung 98°C - 10 s, Annealing 55-62°C - 15 s, Extension 72°C - 10-30 s) x 35 Zyklen, „Final Extension“ 72°C - 5 min. Die optimale Annealing Temperatur wurde für jedes Primer-Paar mit Hilfe eines Temperaturgradienten bestimmt (siehe Tabelle 2.1.4). Als Länge der Extension wurden 15 s/Kbp errechnet.

### 2.3.2 Agarose Gel-Elektrophorese

Die DNA wurde in 1% Agarose-Gel (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) in einem 1x TAE-Puffer mit Hilfe des „Easy Cast electrophoresis system“ (Owl Separation Systems, Portsmouth, NH, USA) aufgetrennt. Dafür wurden die folgenden Einstellungen verwendet: 120 V, 1h. Als Größenstandards wurden die 100 bp oder 1000 bp DNA-Leitern (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) benutzt. Anschließend wurden die Gele in einem Dimidiombromid-Bad gefärbt. DNA-Fragmente wurden mittels UV Strahlung (Herolab UVT 28M, Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland) visualisiert. Die Gele wurden mittels einer Videokamera abfotografiert und mit Hilfe der Intas® GDS Software als digitales Bild aufgenommen und verarbeitet.

### 2.3.3 DNA-Isolation aus *F. graminearum* TMW 4.0157

*F. graminearum* TMW 4.0157 wurde in 50 ml ME Medium bei RT und 180rpm für 2d inkubiert. Das Myzel wurde mittels Filtration durch steriles Filterpapier (Munktel & Filtrak GmbH, Bärenstein, Deutschland) gesammelt. Die DNA wurde aus dem gewonnenen Myzel mit Hilfe des MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit (Epicentre, USA) entsprechend den Herstellerangaben extrahiert. Der DNA-Gehalt in µg/µl wurde durch ein NanoDrop™ ND1000 Spektralphotometer (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

### 2.3.4 Klonierung

Die Modifikation der DNA wurde nach Ausubel *et al.* 1993 durchgeführt. Die DNA wurde mit dem QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus PCR Ansätzen isoliert oder durch das E.Z.N.A. gel extraction kit (Peqlab, Deutschland) aus dem Agarosegel gereinigt. Plasmide wurden aus *E. coli* mit Hilfe des Plasmid Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) isoliert. Für die Klonierungsarbeiten wurden Restriktionsenzyme und T4-Ligasen der Firma Fermentas (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe eines NanoDrop™ ND1000 Spektralphotometers (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

### 2.3.5 Entwicklung des pPK2-PkosGT-Vektors.

Mit dem Ziel, eine *hyd5* Gen Deletionsmutante herzustellen, wurde ein pPK2-PkosGT-Vektor entwickelt. Dazu wurde die genomische Sequenz des *hyd5*-Gens aus der Genomsequenz von *F. graminearum* PH1 verwendet (Accession N: XM\_382007). Das *hyd5* Gen wurde durch die Firma Gene Art (Regensburg, Deutschland) unter Weglassung der Intron-Sequenzen synthetisiert. Das Gen wurde von dem gelieferten Vektor pHyd5 mittels der Primer 5'Hyd5Sall und 3'Hyd5Sall in einer PCR amplifiziert und nach Reinigung des Fragmentes und Restriktion mit *Sall* in den ebenfalls mit *Sall* geschnittenen pGFP-Vektor (Invitrogen, Deutschland) kloniert. Das in diesem Vektor vorhandene *gfp*-Gen wird nicht in die weitere Klonierung einbezogen. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pHG. Da die genaue Größe und Sequenz des Promoter-Bereichs des *F. graminearum hyd5*-Gens unbekannt ist, wurde ein Bereich von 879 bp vor dem Startkodon des *hyd5*-Gens als „Promoter Bereich“ *Phyd5* angenommen. Das Fragment *Phyd5* wurde mit den Primern 5'PromHind2 und 3'PromHind2 bei gleichzeitigem Einbau von zwei unabhängigen *HindII* Schnittstellen von der gDNA des *F. graminearum* TMW 4.0157 als Template amplifiziert. Das *Phyd5* Fragment wurde aus dem Agarosegel gereinigt und nach Restriktion mit *HindII* in den ebenfalls mit *HindII* geschnittenen pHG Vektor kloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPHG. In den späteren Schritten wurde das *phyd5-hyd5* Fragment von diesem Vektor amplifiziert. Somit spielt das auf dem Vektor vorhandene *gfp* Gen keine weitere Rolle in den anschließenden Klonierungsschritten. Als „Terminator-Bereich“ für das *hyd5*-Gen wurde ein Sequenzbereich von 1002pb nach dem Stopkodon des *hyd5*-Gens definiert. Das

Fragment wurde von der genomischen DNA von *F. graminearum* TMW 4.0157 als Template mit Hilfe der Primer 5'ThydHindIII und 3'ThydHindIII unter gleichzeitigem Einbau von zwei *HindIII*-Schnittstellen amplifiziert. Das Fragment *Thyd5* wurde nach Reinigung aus dem Gel und Restriktion mit *HindIII* in den zuvor mit *HindIII* geschnittenen pPK2-Vektorkloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-Thyd5. Das Promoter-Fragment *Phyd5* wurde bei gleichzeitigem Einbau von zwei endständigen *EcoRV* Schnittstellen mit den Primern 5' PhydEcoRV-2 und 3' Pknock out von dem pPHG-Vektor als Template amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Fragmentes aus dem Gel und Restriktion mit *EcoRV* wurde dieses in den zuvor mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pPK2-Thyd5 kloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-PkoT. In diesen Vektor wurde anschließend eine *sgfp*-Kassette für die Expression des sGFP Fluoreszenzmarkers kloniert. Dazu wurde die gesamte Kassette mit Hilfe der Primer 5'sGFPApaI-2- und sGFPApaI-2 in einer PCR mit dem Vektor pSK379-sGFP als Template unter gleichzeitigem Einbau von zwei endständigen *ApaI* Schnittstellen amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Fragmentes aus dem Gel und Restriktion mit *ApaI* wurde dieses in den zuvor mit *ApaI* geschnittenen Vektor pPK2-PkoT kloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-PkosGT. Eine schematische Übersicht über die beschriebene Klonierungsstrategie findet sich in Abb.4.

### 2.3.6 Entwicklung des pPK2-PHsGT Vektors

Es wurde ein Vektor entwickelt, der zur Herstellung von *F. graminearum* Transformanten verwendet wurden, bei denen eine translationale Koppulung des Hyd5-Proteins an den sGFP Fluoreszenzindikator vorlag. Dazu wurde in einer PCR das *Phyd5-hyd5*-Fragment des pPHG-Vektors als Template (siehe Kapitel 2.3.5) mit Hilfe der Primer 5' PhydEcoRV-2 und 3' Hyd5-Apa-EcoRV-2 unter gleichzeitigem Einbau von zwei endständigen *EcoRV*-Schnittstellen amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Fragmentes aus dem Gel und Restriktion mit *EcoRV* wurde dieses in den zuvor mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pPK2-Thyd5 (siehe Kapitel 2.3.5) eingebaut. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-PHT. In diesen Vektor wurde die *sgfp*-Sequenz kloniert. Die *Sgfp*-Gensequenz wurde zuerst mit Hilfe der Primer 5'sGFPApaI-2 und sGFPApaI-2 in einer PCR mit dem Vektor pSK379-sGFP als Template amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Fragmentes aus dem Gel und Restriktion mit *ApaI* wurde dieses in den zuvor mit *ApaI*

geschnittenen Vektor kloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-PHsGT (siehe Abb.4).

### **2.3.7 Entwicklung des pPK2-PHtaasGT-Vektors.**

Um den pPK2-PHtaasGT-Vektor zu entwickeln, der für die Bildung eines Fusions-Proteins bestehend aus dem Hydrophobin Fghyd5p und dem sGFP Protein als Fluoreszenzmarker verwendet werden sollte, wurde das *Phyd5-hyd5-taa*-Fragment (Promoter-Bereich mit dem *hyd5*-Gen ohne Stoppkodon TAA) als Template in einer PCR mit den Primern 5' PhydEcoRV-2 und 3'Hyd5taa-AE-2 unter gleichzeitigem Einbau von zwei enständigen *EcoRV*-Schnittstellen amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Fragmentes aus dem Gel und Restriktion mit *EcoRV* wurde dieses in den zuvor mit *EcoRV* geschnittenen Vektor pPK2-Thyd5 kloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-PHtaaT. Anschließend wurde in diesen Vektor eine *sgfp*-Kassette für die Expression des sGFP Fluoreszenzmarkers kloniert. Dazu wurde die gesamte Kassette mit Hilfe der Primer 5'sGFP*ApaI*-2 und sGFP*ApaI*-2 in einer PCR mit dem Vektor pSK379-sGFP als Template unter Einfügung zweier endständiger *ApaI*-Schnittstellen amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Fragmentes aus dem Gel und Restriktion mit *ApaI* wurde dieses in den zuvor mit *ApaI* geschnittenen Vektor kloniert. Der so entstandene Vektor erhielt die Bezeichnung pPK2-PHtaasGT (siehe Abb.4).

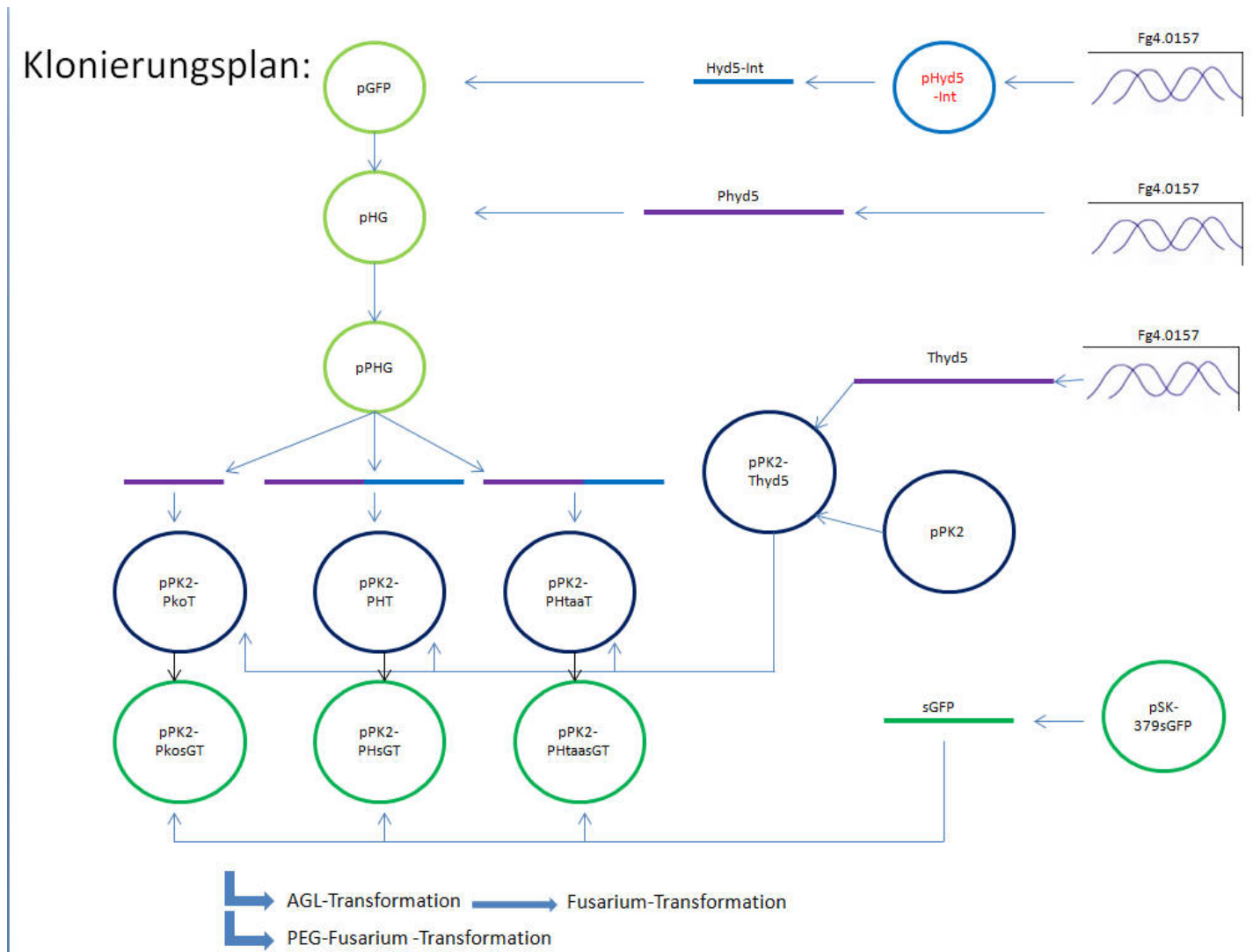


Abb.4: Schematische Darstellung des kompletten Kloniervorgangs.

### **2.3.8 RNA-Isolation aus *F. graminearum***

RNA wurde aus Hyphen von *F.graminearum* isoliert, die innerhalb von 48h bei RT und 180 rpm in einem Malzextrakt-Medium gewachsen waren. Das Myzel wurde mittels Filtration durch Filterpapier (Munktel & Filtrak GmbH, Bärenstein, Deutschland) gesammelt. 10 g Myzel wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Mörsern pulverisiert. Die RNA aus dem pulverisierten Myzel wurde mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben isoliert. Bei Bedarf wurde mRNA mit DNase verdaut (Kapitel 2.3.10). Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

### **2.3.9 RNA-Isolation aus infizierter Gerste und infiziertem Weizen.**

Mit *F. graminearum* infizierte Gersten- und Weizenpflanzen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und durch Mörsern pulverisiert. Anschließend wurde aus den gefrorenen, pulverisierten Pflanzen mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben die gesamte RNA isoliert. Bei Bedarf wurde die gesamte RNA mit DNase verdaut (Kapitel 2.3.10). Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

### **2.3.10 Reverse Transkription**

Die isolierte mRNA wurde zuerst bei 37°C für 1h mit RQ1 RNase-freier DNase (Promega, Freiburg, Deutschland) behandelt, um die DNA zu entfernen. Danach wurde diese Reaktion mit 4µl Stop Solution (Promega) und durch Inkubation bei 65°C für 10 min gestoppt. Die Transkription der mRNA in cDNA wurde zuerst mit Hilfe von 0.5 U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) durchgeführt. Danach wurde sie mit 1 µl der mRNA-Probe, 2µg oligo(dT)<sub>15</sub> Primer (Promega), 40 µM dNTPs (Qiogene), 4 µl RT Puffer (Promega), 0,5 U M-MLV Reverse Transcriptase(Promega), RNase H Minus Point Mutant (Promega) und 1.5 µl H<sub>2</sub>O versetzt. Die Reaktion wurde entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.3.11 LAMP**

Die „Loop-mediated isothermal amplification“ (LAMP) wurde nach Denschlag *et al.*(2012) in 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Die 25 µl des Reaktionsmixes enthielten 2,5 µl 10×LAMP Puffer (200 mM MOPS, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH

8,8 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 2,6 µl Primer-Mischung (siehe unten), 1µl Bst2.0 (8U/µl, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland); 3,5 µl dNTP Mischung (10 mM von jedem Nukleotid, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland); 1 µl MgCl<sub>2</sub> (200 mM); 5 µl DNA; 1 µl Calcein; 8,4 µl H<sub>2</sub>O). Die LAMP-Primer wurden mit dem Primer Explorer V4 Software tool (Freeware auf <http://primerexplorer.jp/e/>, Eiken Chemical Co., Ltd. / Tokyo, Japan) entworfen. Die Primer-Sequenzen sind in Kapitel 2.1.4 angegeben. Die Primer-Mischung enthielt: 1,6 µM FIP; 1,6 µM BIP; 0,2 µM F3; 0,2 µM B3; 0,8 µM LoopF und 0,8 µM Loop B (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Die Reaktionen wurden als positiv betrachtet, wenn innerhalb von 40min durch das Calcein eine hellgrüne Fluoreszenz und gleichzeitig eine Trübung der Ansätze auftrat.

### 2.3.12 RT-LAMP

Die RT-LAMP wurde in 25 µl des Reaktionsmixes durchgeführt. Dieser enthielt 2,5 µl 10×LAMP Puffer (200 mM MOPS, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 8,8 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), 2,6 µl Primer Mischung, 1 µl Bst2.0 (8U/µl, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland); 3,5 µl dNTP Mischung (10 mM von jedem Nukleotid, Promega GmbH, Mannheim, Deutschland); 1 µl MgCl<sub>2</sub> (200 mM); 1µl DTT 25 mM; RNase Inhibitor 25 U (Promega GmbH, Mannheim); AMV reverse Transkriptase 5 U (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland); RNA 1 µl; 11,3 µl H<sub>2</sub>O. Die Primermischung enthielt: 1,6 µM FIP; 1,6 µM BIP; 0,2 µM F3; 0,2 µM B3; 0,8 µM LoopF und 0,8 µM Loop B (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland). Wenn für den Nachweis der DNA-Amplifikation während der LAMP Calcein verwendet wurde, wurde 1 µl des Wassers durch Calcein ersetzt (Niessen & Vogel 2010). Die LAMP-Primer wurden mit dem Primer Explorer V4 Software tool (Freeware auf <http://primerexplorer.jp/e/>, Eiken Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japan)) entworfen. Die Primer für die *hyd5*- und *Ef1α*-Gene wurden so in die Gensequenz platziert, dass die Primer Ef1-ID22-LoopF und Ef1-ID22-B3 (für das *Ef1α*-Gen) und Hyd5-ID1-F1c (für das *hyd5*-Gen) die jeweils in der gDNA Sequenz vorhandenen Introns überbrückten. Dadurch wurde gewährleistet, dass nur die cDNA oder mRNA der betreffenden Gene und nicht deren gDNA-Sequenz erkannt und amplifiziert wurde. Reaktionen wurden bis zu 40 min lang bei einer konstanten Temperatur von 68°C im Loopamp LA-320C real-time Turbidimeter (EIKEN Chemical Co., LTD, Tokyo, Japan) inkubiert. Zur Kontrolle des Fortschritts der Reaktionen wurde das LA-320CE software package (EIKEN Chemical Co., LTD, Tokyo,

Japan) benutzt. Die während der Reaktion entstandene Trübung wurde bei einer Wellenlänge von 650 nm gemessen.

### **2.3.13 Prüfung der *F.graminearum*-Transformanten**

Die Prüfung der *F.graminearum* Transformanten wurde zunächst mittels PCR mit 5' 50 bpminPhyd und 3'sGFP-Primern oder mit 5' sGFPApa-2 und 3' sGFPApa-2 durchgeführt. Diejenigen Transformanten, bei denen ein PCR Fragment der richtigen Größe festgestellt wurde, wurden mit den Primern 5'HydSalI-2, 5'RevTtrpC und 5'sGFPApa-2 sequenziert (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland). Die Sequenzen wurden mit Hilfe des Alignment Tool ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) verglichen (siehe 7.3).

## **2.4 Mälzung und Gushing-Tests**

### **2.4.1 Malzherstellung**

Mälzungen wurden in Malzkästen (160/130/196, Horlenblech-Schlitze 2mmx20mm) mit 600 g Gerste oder Weizen je Kasten durchgeführt. Dazu wurden 600 g Getreide mit 180 ml Konidiensuspension der Transformanten und des Wild Typs ( $5 \times 10^4$  Konidien/ml) infiziert. Als Negativkontrolle diente Gerste und Weizen, der jeweils mit 180 ml sterilem Wasser ohne Pilzkonidien behandelt wurde. Die Mälzkästen wurden vor Versuchsbeginn tariert und das Gewicht wurde vermerkt, sodass im Folgenden alle Wassergehalte des Keimgutes durch Abwiegen bestimmt werden konnten. Die Mälzung wurde nach folgendem Schema durchgeführt: 18 h bei einem Wassergehalt von 30% und RT, anschließend weitere 42h bei einem Wassergehalt von 38% und RT, gefolgt von 6d bei 48% Wassergehalt und 16°C zur Keimung. Das so hergestellte Grünmalz wurde anschließend durch Darren haltbar gemacht. Der Darrprozess fand in einem Trockenschrank (Memmert) statt. Das Grünmalz wurde 1h lang bei 45°C mit mehrmaliger Wendung inkubiert. Danach erfolgten folgende Inkubationsschritte: 1h bei 55°C (ebenfalls mit mehrmaligem Wenden), 17h bei 65°C, 2h bei 80°C, 2h bei 85°C (mit einmaligem Wenden) und 1h bei 88°C. Das Malz wurde anschließend mit einer Mühle (Bühler GmbH, Braunschweig, Deutschland) zu Grobschrot (200 µm) vermahlen.



### **2.4.2 Modifizierter Carlsberg-Test**

Der Modifizierte Carlsberg-Test wurde mit Grobschrot durchgeführt. 100g Grobschrot wurden bei RT mit 400ml Wasser für 1min bei maximaler Geschwindigkeit mit einem Haushalts-Handmixer suspendiert. Die Suspension wurde anschließend für 10min bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch Kochen auf 190 ml reduziert und mit Hilfe von Filterpapier (Munktel und Filtrak GmbH, Bärenstein, Deutschland) filtriert. Das Filtrat wurde mit frischem Wasser auf 200 ml aufgefüllt. Dann wurde eine Spatelspitze Natriumacid hinzugefügt, um das Filtrat haltbar zu machen. Von drei - Bonaqua-Flaschen (0,33 l) wurden Kühlung auf 0 °C im Eisbad und vorsichtiger Öffnung je 50 ml Wasser durch Filtrat ersetzt. Die Flaschen wurden mit neuen und sterilen Kronkorken verschlossen und gewogen. Anschließend wurden sie für 3 d bei 70-80 rpm RT horizontal geschüttelt. Nach dem Schütteln wurden die Flaschen für 10min stehend ruhen gelassen, anschließend dreimal innerhalb von 10s um die Längsachse um 180° gedreht und wieder für 30s stehend ruhen gelassen. Danach wurden die Flaschen geöffnet. Es wurde die Überschäummenge (g/Flasche) ermittelt (Pfenninger 1996).

## **2.5 Vergleich zwischen dem *F.graminearum* Wildtyp und seinen Transformanten**

### **2.5.1 Kolonien-Morphologie**

Um Unterschiede in der Koloniemorphologie zwischen den *F.graminearum*-Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 und dem Wildtyp zu bestimmen, wurden je 20  $\mu$ l  $5 \times 10^4$  Konidien suspension (Kapitel 2.2.5) auf MEA-Platten eingimpft. Die Stämme wurden für 3 d bei RT inkubiert. Farbe, Existenz von Lyftmyzelien und Aussehen der Kolonien wurden makroskopisch bestimmt.

### **2.5.2 Breite der Hyphen**

Die Hyphen der für 3 d auf MEA-Platten gewachsenen *F.graminearum*-Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 und dem Wildtyp wurden mikroskopiert. Die Hyphenbreite wurde mit Hilfe der Software Axio Vision Rel. 4.7.2. (Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Jena, Deutschland) bestimmt. Pro Stamm wurden je 100 Messungen zur Mittelwertberechnung durchgeführt.

### 2.5.3 Bestimmung der Biomasse

50 ml ME Medium wurden mit 20  $\mu$ l  $5 \times 10^4$  Konidiensuspension (Kapitel 2.2.5) der *F. graminearum*-Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 und des Wildtyps angeimpft und für 3 d bei 25°C und 180rpm inkubiert. Anschließend wurden die Hyphen ÜN bei -80°C gefriergetrocknet (Gefriertrockner FreeZone 2,5Plus, Labconco, Kansas City, USA) und gewogen.

### 2.5.4 Untersuchung der Hydrophobizität der Myzeloberfläche

Um die Wirkung des Hydrophobins FgHyd5p auf die wasserabweisenden Eigenschaft der *F. graminearum*-Hyphen zu untersuchen, wurde ein Hydrophobizitätstest durchgeführt. SFA-Platten wurden jeweils mit einem der Transformanten-Stämme FgFP, FgTK oder Fg $\Delta$ hyd5 sowie mit dem Wildtyp inokuliert und für 3 d bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden von der Mitte bis zum Rand der entstandenen Koloniefünf bis sechs Tropfen von je 3  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O aufgetragen. Nach jeweils 1min, 1h und 5h wurden die Tropfen fotografiert und die Tropfen-Kontaktwinkel wurden mit Hilfe der Software Axio Vision Rel. 4.7.2. (Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Jena, Deutschland) gemessen. Pro Stamm wurden je 30 Messungen zur Mittelwertberechnung durchgeführt.

### 2.5.5 Durchdringen der Wasser-Luft Grenzfläche

Um die Fähigkeit der Hyphen der Transformanten FgFP, FgTK oder Fg $\Delta$ hyd5 und des *F. graminearum* Wildtyp-Stamms zur Durchdringung der Wasser-Luft Grenzfläche zu überprüfen, wurden mit diesen Hyphen bewachsene, bei -80 °C eingefrorene Leca® Granula in ein 10 ml ME Medium angeimpft für 10 d ohne jegliche Bewegung bei RT inkubiert. Nach 10 d des Wachstums wurde überprüft, ob Hyphen die Oberfläche des Mediums durchdrungen hatten.

### 2.5.6 Anzahl, Länge und Auskeimungspotential der Konidien und Zellzahl je Konidie

Um den Einfluss des Hydrophobins FgHyd5p auf die Sporulation zu überprüfen, wurden die Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 und Wildtyp von *F. graminearum* auf MB-Medium zur Sporulation gebracht (Kapitel 2.2.5). Nach 7d Inkubation bei RT und UV-Licht wurden die Konidien mit 3 ml sterilem Wasser und Glasperlen von einer Platte gesammelt. Pro Transformant wurden je 3 Messungen zur Mittelwertberechnung durchgeführt. Die Konidienzahl wurde mit einer Thoma-Kamera bestimmt. Um die

Sporenlänge des Wildtyps und der Transformanten zu messen, wurde die Länge der Konidien (Abstand zwischen Fuß und Kopfzelle) mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen. Pro Transformant wurden je 200 Messungen zur Mittelwertsberechnung durchgeführt. Bei jedem Stamm wurde außerdem das Auskeimungspotenzial gemessen. Dazu wurden 20 µl einer Konidien suspension ( $5 \times 10^4$  Konidien pro ml) von jedem Stamm in 20 ml ME-Medium angeimpft und für 3h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Prozentsatz der ausgekeimten Sporen bestimmt. Pro Stamm wurden 300 Sporen für die Mittelwertsberechnung betrachtet. Für die Zellzahl pro Konidie wurden von jedem Stamm 100 Konidien aus verschiedenen Gesichtsfeldern des Mikroskops ausgewählt. Für jede dieser Konidien wurde die Zellzahl (die Kopf- und Fußzellen wurden mitgezählt) für die Mittelwertsberechnung bestimmt.

### **2.5.7 Konidienfluoreszenz**

Die Fluoreszenz der Konidien des *F. graminearum* Wildtyp Stammes und der Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen. Folgende Kameraeinstellungen wurden dazu verwendet: Belichtungszeit 170ms; Cyan 0,59; Magneta 00; Gelb 30. Fluoreszenz Licht wurde mit folgendem Filterset betrachtet: Exzitation BP 450-450, Beam Splitter Ft 510, Emission 515.

### **2.5.8 Wachstum der Stämme auf unterschiedlichen Medien**

#### ***2.5.8.1 Wachstum der Stämme und Aktivierung des hyd5-Promoters auf unterschiedlichen Kohlenstoff-Quellen***

Eine Konidien suspension ( $10 \mu\text{l } 5 \times 10^4$ ) des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 wurde jeweils in die Mitte einer MMC-Platte angeimpft, die jeweils unter Zugabe von Raffinose, Salizin, Saccharose, Glykose, Erytriol oder Glycerol als C-Quelle hergestellt worden waren. Die C-Atom-Anzahl wurde äquivalent zu Glukose (w/w 10g/L) berechnet (Miller & Greenhalgh 1985). Das tägliche Wachstum wurde in mm gemessen. Die Fluoreszenz der Hyphen des Wildtyps und der Transformanten wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen. Folgende Kameraeinstellungen wurden dazu

verwendet: Belichtungszeit 170ms; Cyan 0,59; Magenta 00; Gelb 30. Fluoreszenz Licht wurde mit folgendem Filterset betrachtet: Exzitation BP 450-450, Beam Splitter Ft 510, Emission 515.

#### **2.5.8.2 Wachstum der Stämme und Aktivierung des *hyd5*-Promoters auf unterschiedlichen Stickstoff-Quellen**

Eine Konidiensuspension ( $10\mu\text{l}$   $5 \times 10^4$ ) des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 wurde jeweils in die Mitte einer M-100 Platten angeimpft, die jeweils unter Zugabe von Natriumnitrat, Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat (1g/L) hergestellt worden waren. Das tägliche Wachstum wurde in mm gemessen. Die Fluoreszenz der Hyphen wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen.

#### **2.5.8.3 Aktivierung des *hyd5*-Promoters auf komplexen Medien**

Konidiensuspensionen ( $10\mu\text{l}$   $5 \times 10^4$ ) des *F. graminearum* Wildtyp Stamms und der Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 wurden jeweils in die Mitte eines SNA, OA, PDA, YPG, MA, YES und Karottenagars angeimpft und für 3 d bei RT inkubiert. Die Fluoreszenz der Hyphen des Wildtyps und der Transformanten wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen.

#### **2.5.8.4 Wachstum der Stämme und Aktivierung des *hyd5*-Promoters bei unterschiedlichen pH Werten**

Konidiensuspensionen ( $10\mu\text{l}$   $5 \times 10^4$ ) des *F. graminearum* Wildtyp Stamms und der Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 wurden jeweils in die Mitte von M100-Platten mit pH-Werten von 4-8 angeimpft und für 6d bei RT inkubiert. Das tägliche Wachstum wurde in mm gemessen. Die Fluoreszenz der Hyphen des Wildtyps und der Transformanten wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen.

#### **2.5.8.5 Wachstum der Stämme und Aktivierung des *hyd5*-Promoters auf Pflanzenextrakt und pflanzlichen Zellresten**

200g junge Gersten- oder Weizenpflanzen wurden kleingeschnitten und mit 50ml Wasser gemischt. Die Pflanzenschnitte wurden mit einem Handmixer (Philips

HR1365/00) homogenisiert. Der Zellextrakt wurde zweimal durch Filterpapier (Munktel und Filtrak GmbH, Bärenstein, Deutschland) filtriert und mit einem Nalgene Rapid-Flow bottle top filter 0,2µm (Thermo Fisher Scientific Inc.) steril filtriert. 10 ml dieses Filtrats wurden mit 10 ml einer 3%-igen sterilen geschmolzenen Agar Lösung (55°C) gemischt und in eine Petrischale gegossen. Konidiensuspension (10µl 5x10<sup>4</sup>) des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, FgΔhyd5 wurden in die Platten angeimpft und für 4d bei RT inkubiert. Die Fluoreszenz der Hyphen des Wildtyps und der Transformanten wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software Zeiss, Deutschland) gemessen. Die Zellreste (5-7g) wurden in sterile Petrischalen gelegt und mit Konidiensuspension (10µl 5x10<sup>4</sup>) des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, FgΔhyd5 infiziert. Diese Petrischalen wurden ebenfalls für 4 d bei RT inkubiert. Die Fluoreszenz der Hyphen des Wildtyps und der Transformanten wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software Zeiss, Deutschland) gemessen.

### **2.5.8.6 Aktivierung des hyd5-Promoters auf wasserabweisender Oberfläche**

Konidiensuspensionen (10µl 5x10<sup>4</sup>) des *F. graminearum* Wildtyp Stamms und der Transformanten FgFP, FgTK, FgΔhyd5 wurden jeweils mit 40 µl eines flüssigen PDA-Mediumsgemischt und in der Mitte steriler Petrischalen aufgetropft. Die Platten wurden für 4 d ohne jegliche Bewegung bei RT inkubiert. Die Hyphen, die an der Petrischalenoberfläche gewachsen waren, wurden mikroskopiert. Die Fluoreszenz der Hyphen des Wildtyps und der Transformanten wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software Zeiss, Deutschland) gemessen.

### **2.5.8.7 Fluoreszenzmessung – CTCF**

Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software Zeiss, Deutschland) gemessen und es wurde die CTCF (*correct total cell fluorescence*) errechnet (Burgess *et al.* 2010; Gavet & Pines 2010).

### **2.5.9 Pathogenitätstests**

Um Unterschiede zwischen der Pathogenität des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, FgΔhyd5 festzustellen, wurden mit Gerste und Weizen

jeweils zwei unterschiedliche Pathogenitätstests durchgeführt: 1. Blatinfektion, 2. Keimlingsinfektion.

### **2.5.9.1 Blatinfektion von Gerste und Weizen**

Samen von Gerste und Weizen wurden mit 70% Ethanol abgewaschen und mit einem sterilen Papiertuch getrocknet. 100 Körner wurden zwischen drei Papiertuch-Schichten in eine große Petrischale gelegt und mit reichlich Wasser übergossen. Die Körner wurden für 3 d bei 22°C inkubiert. Am dritten Tag sollten 90-95% der Körner ausgekeimt sein. Die Keimlinge wurden mit 15 ml Seramis (Seramis, Mars, Verden/Aller, Deutschland) in 50ml-Zentrifugationsröhrchen eingepflanzt. Dann wurden sie mit 3 ml 0,5%-Dünger ("Vitalnahrung für Grünpflanzen", N/P/K: 1,8/1,0/2,3, Seramis, Verden/Aller, Deutschland) gegossen. Die Setzlinge wurden mit einer Photoperiode von 16 Stunden (5% UVB und 30% UVA zusammen mit Weißlicht) bis zum Zweiblattstadium aufgezogen. Kondiensuspensionen des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 mit einer Sporenkonzentration von jeweils  $1 \times 10^6$  wurden wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben hergestellt. Die Oberfläche beider Blätter einer Pflanze wurde mit Schleifpapier der Körnung 320 (Lux-Tools, Wermelskirchen, Deutschland) durch leichtes Abreiben verletzt. Dann wurden die Pflanzen mit 20 ml der Konidiensuspension besprüht für 1 d unter einer durchsichtigen Plastiktüte gehalten, um ein Verdunsten des Wassers von der Blattoberfläche zu vermeiden. Danach standen die Pflanzen für 6 d ohne Plastiktüte. Nach Bedarf wurden sie mit 1-2 ml des 0,5% igen Düngers (siehe oben) gegossen. Nach 7 d wurden die Blätter analysiert. Für die Handbonitur der Infektion wurden folgende Infektionsgrade vergeben: 0 – Die Pflanze war gesund, 1 – Die Pflanze zeigte keine typischen Läsionen an der Oberfläche, sah aber nicht gesund aus, 2 – Die Pflanze zeigte an den Blättern die typischen Läsionen.

### **2.5.9.2 Keimlingsinfektion von Gerste und Weizen**

Um bezüglich der Pathogenese die Unterschiede zwischen dem WildTyp von *F. graminearum* und den Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 zu untersuchen, wurde ein Wurzelfäule-Infektionstest mit Gerste und Weizen durchgeführt, wie bei Babaeizad *et al.* (2009) beschrieben ist. Weizen- und Gerstenkörner wurden mit Natriumhypochlorid (10% aktives Chlor) 15min lang sterilisiert und anschließend 3-

mal je 5min lang mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samenkörner wurden zwischen 3 Lagen von sterilem Filterpapier in eine große Glas-Petrischale gelegt, wo sie innerhalb von 3 d bei RT auskeimten. Nach der Auskeimung wurden diejenigen Keimlinge, deren Blattspross mindestens 1 cm lang war, für 2h mit einer Konidien suspension ( $5 \times 10^4$  Konidien pro ml in 0,02% Tween 20 (v/v) und 0,5% Gelatine (w/v) in sterilem Wasser) des *F. graminearum* Wildtyps und der Transformanten FgFP, FgTK, FG $\Delta$ hyd5 inkubiert. Als negative Kontrolle wurden die Sporen mit Wasser inkubiert. Nach der Infektion wurden die Keimlinge mit 7ml Seramis (Seramis, Mars, Verden/Aller, Deutschland) in 15ml-Zentrifugationsröhrchen eingepflanzt, mit 3 ml 0,5% Pflanzendüngung ("Vitalnahrung für Grünpflanzen", N/P/K: 1,8/1,0/2,3, Seramis, Verden/Aller, Deutschland) gegossen. Anschließend und wuchsen sie für 10 d bei 16h Beleuchtung (5%UVB, 30% UVA) und RT. Am Tag 10 wurde die Länge von Wurzeln und Blättern in mm zur Mittelwertsberechnung gemessen.

### **2.5.9.3 Herstellung von mikroskopischen Schnittpräparaten von infizierten Gersten- und Weizen-Pflanzen**

Infizierte und nicht-infizierte Gerste- und Weizen-Pflanzen (Kapitel 2.5.9.2) wurden am Tag 10 nach der Infektion in 3-5mm lange Stückchen geschnitten und für 24h 70% FPA (Ethanol 90 w/v, Propionsäure 5 w/v, Formaldehyd 5 w/v) fixiert. Die Schnitte wurden in einer Ethanolreihe dehydriert (70%,75%, 80%, 85%,90% 96% Ethanol, je 2 h). Anschließend wurden die Proben für 24 h in Solution A inkubiert (Histoiresin (Leica Histoiresin, Heidelberg, Deutschland) 50w/v, Ethanol 99% 50 w/v), danach für 2h in Solution B (aktiviertes Histoiresin 50w/v, Ethanol 99% 50 w/v). Anschließend wurden die Proben in aktiviertem Histoiresin für 48h bei 70 rpm geschüttelt. Die Proben wurden in Solution C (4ml Solution C, 267  $\mu$ l Histoiresin Hardener (Leica Histoiresin, Heidelberg, Deutschland)) eingebettet. Nach 24h Trocknung bei RT wurden die in Histoiresin eingelegten Proben auf Holzblöcke geklebt und nach weiteren 12h Trocknung bei RT mit einem Mikrotom (820 Spencer Microtome, American Optical Corporation, Southbridge, USA) in 8  $\mu$ m dünne Scheiben geschnitten (Richards 1959; Ruzin 1999; Walter 1980). Die Schnitte wurden auf einem Objektträger bei 55°C fixiert und nach 24h mikroskopiert. Die Fluoreszenz wurde mit Hilfe des Softwarepakets AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen. Folgende Kameraeinstellungen wurden dazu verwendet: Belichtungszeit 170ms; Cyan 0,59;

Magneta 00; Gelb 30. Das Fluoreszenzlicht wurde mit folgendem Filterset betrachtet: Exzitation BP 450-450, Beam Splitter Ft 510, Emission 515.

### **2.6 Oxidativer Stress bei Gerste und Weizen**

Die Messung der Produktion von *Reactiv Oxygen Species* (ROS) wurde wie bei Gomez-Gomez et al.(1999) mit folgenden Veränderungen durchgeführt: für die Reaktion wurden 3 mm<sup>2</sup> große Disks aus 10 Tage alten Gersten- oder Weizenblättern ausgestanzt und in einer 100 mM Lösung von L<sub>012</sub> (Luminol) inkubiert. Als Auslöser wurden die Extrakte aus der in Kapitel 2.2.6 beschriebenen Konidien suspension oder lyophilisierte FcHyd5-Proteine (freundlicherweise überlassen durch Claudia Specker, Lehrstuhl für Technische Mikrobiologie, Freising, Deutschland) benutzt. Als positive Kontrolle wurde eine Chitin- oder F12-Lösung (Flagelin) (unbestimmte Konzentration) verwendet. Die Lumineszenz wurde in Intervallen von 30 s gemessen (Tecan F 200 plate reader, Tecan Trading AG, Männedorf Switzerland).

### **2.7 Statistik**

Die Signifikanz der Daten wurde mit dem ungepaarten t-Test überprüft. Als Tendenz wurden Werte definiert, wenn  $P < 0,1$ , als gesicherter Unterschied im Falle von  $P < 0,05$ . Alle Untersuchungen wurden zur Berechnung von Mittelwerten jeweils dreimal durchgeführt.

### **2.8 GenBank accession numbers**

Die Nukleotid-Sequenz des FgHyd5p ist in GenBank unter accession no. XM\_382007 gespeichert (siehe 7.2). Die Sequenz befindet sich zwischen den Nukleotiden nt 5963308 und nt 5963699 des Chromosom 1 von *F. graminearum* PH1. Die vollständige Chromosom 1 Sequenz ist unter NCBI *Reference Sequence*: NT\_086521.1 hinterlegt.



## Ergebnisse

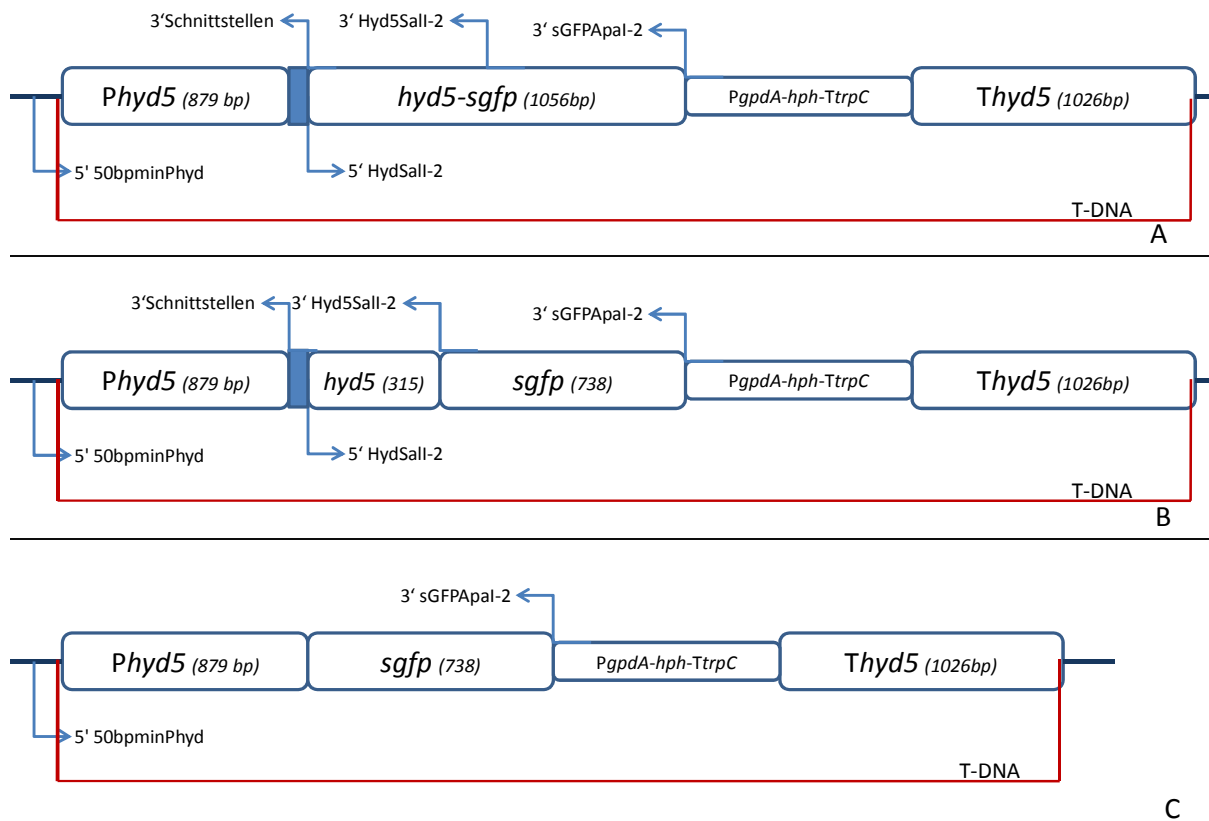
### **3.1 Entwicklung und Prüfung von *F. graminearum* Transformanten mit knock out, translationaler Kopplung und Fusion des *hyd5* Gens mit einem Fluoreszenzmarker.**

Ziel dieses Arbeitsabschnittes war es, die Funktionen des Hydrophobins FgHyd5p im Lebenszyklus von *F. graminearum* zu untersuchen, um damit folgende Fragen zu beantworten: Ist das Hydrophobin FgHyd5p an der Infektion von Pflanzen durch *F. graminearum* beteiligt? Wann und wo genau in der Zelle wird das FgHyd5p produziert? Wird die Bildung durch die Nährstoffzusammensetzung des Substrats oder durch abiotische Umweltfaktoren beeinflusst? Hierzu wurde der *F. graminearum* Wild Typ Stamm so verändert, dass die resultierenden Transformanten-Stämme einerseits kein FgHyd5p mehr produzieren konnten (Deletionsmutante oder knock-out Mutante) oder andererseits das Hydrophobin zusammen mit einem leicht detektierbaren Markerfarbstoff produzierten. Bei der knock-out Mutante (Fg $\Delta$ hyd5) wurde das *hyd5* Gen durch das für sGFP kodierende *sgfp*-Gen ersetzt, so dass anstelle des Hydrophobins das fluoreszierende Protein unter der Kontrolle des *hyd5* Promoters produziert wurde. Diese Mutation ermöglicht es einerseits zu untersuchen, wie sich das Fehlen des Hydrophobins FgHyd5p auf die Mikro- und Makromorphologie sowie auf die Infektionsfähigkeit des Pilzes auswirkt. Die gleichzeitig vorhandene sGFP-Reporterfunktion dieses Konstruktes erlaubt zudem Zeitpunkt und die Bedingungen, unter denen eine Aktivität des *hyd5*-Promoters in *F. graminearum* auftritt, zu identifizieren, damit diese später untersucht werden können. Neben der knock-out Mutante wurden noch zwei weitere Transformanten des *F. graminearum* Wild Typs hergestellt, die beide ein vollständiges *hyd5*-Gen enthielten, aber zusätzlich mit einer sGFP Reporterfunktion ausgestattet waren. Mittels zweier Transformanten, die sowohl FgHyd5p als auch sGFP unter der Kontrolle des *hyd5*-Promoters können, sollte zum einen das FgHyd5p in der Zelle lokalisiert und zum anderen seine Produktion unter unterschiedlichen Bedingungen erforscht werden. FgFP enthielt schließlich als dritter Mutantentyp ein gentechnisches Konstrukt, das zur Bildung eines FgHyd5p-sGFP Fusionsproteins führt. Da Hydrophobin 5 ein stark oberflächenaktives Protein ist und sowohl hydrophobe als auch hydrophile Teile besitzt, wurde bereits bei der

Konstruktion vermutet, dass die Funktionen von FgHyd5p und/oder des sGFP in einem FgHyd5p-sGFP-Fusionsprotein infolge einer Fehlfaltung beeinträchtigt sein könnte. Es wurde deshalb eine weitere Transformante (FgTK) hergestellt, in der das *hyd5*-Gen und das *sgfp*-Gen so auf einer polycistronischen mRNA kodiert sind, so dass beide Gene unter der Kontrolle des *hyd5*-Promoters exprimiert werden. Durch die Konstruktion werden jedoch beide Proteine getrennt voneinander synthetisiert, so dass die Funktionalität beider Proteine angenommen werden kann.

Um die drei Transformanten Fg $\Delta$ hyd5, FgTK und FgFP aus dem *F. graminearum* Wildtyp-Stamm herzustellen, wurden eine Reihe von Klonierungen durchgeführt (siehe Abb.4). In 14 einzelnen Klonierungsschritten wurden drei Vektoren auf der Basis des pPK2-Plasmids (Covert et al. 2001) hergestellt. Jeder enthielt sowohl einen Promoter- und einen Terminator-Bereich des *hyd5*-Gens und der *sgfp*-Sequenz als auch eine Hygromycin-Resistenz-Kassette (hygromycin B phosphotransferase Gen), die unter der Kontrolle des Promoters *PgpdA* und des Terminators *TtrpC* von *Aspergillus nidulans* stand. Das Plasmid pPK2-PkosGT enthielt keine *hyd5*-Sequenz und wurde für die Herstellung des *hyd5* knock out-Stammes verwendet. pPK2-PHsGT und pPK2-PHtaasGT enthielten sowohl eine *hyd5*-als auch eine *sgfp*-Gen Sequenz, die beide unter der Kontrolle des *Phyd5* Promoters standen. In dem mit dem pPK2-PHsGT-Vektor transformierten *F. graminearum* Stamm sollten beide Proteine, FgHyd5p und sGFP, unabhängig voneinander nach der Aktivierung des *hyd5*-Promoters produziert werden (translationelle Kopplung). In dem mit dem pPK2-PHtaaGT-Vektor transformierten *F. graminearum* Stamm sollte dagegen das Fusionsprotein FgHyd5p-sGFP produziert werden. Zum besseren Verständnis ist in Abb.5 die Lage und Verknüpfung der Sequenzelemente in den verschiedenen Transformanten schematisch dargestellt. Das Schema der verschiedenen durchgeführten Klonierungsexperimente ist in Abb.4 dargestellt. Alle Klonierungsschritte wurden in *E. coli* DH5 $\alpha$  nach klassischen molekularbiologischen Methoden (Kapitel 2.3) durchgeführt. Nach jedem Klonierungsschritt wurden die Inserts durch PCR-Screening sowie durch Sequenzierungen überprüft. Der direkte Nachweis des Einbaus der T-DNA in das Genom des Pilzes wurde über die Transfer-DNA flankierenden Primer 5'50bpminPhyd (genomischer Genotypisierungsprimer) durchgeführt. Der Primer 5' 50bpminPhydbindet 50 bp upstream von der Transfer-DNA.

## Ergebnisse



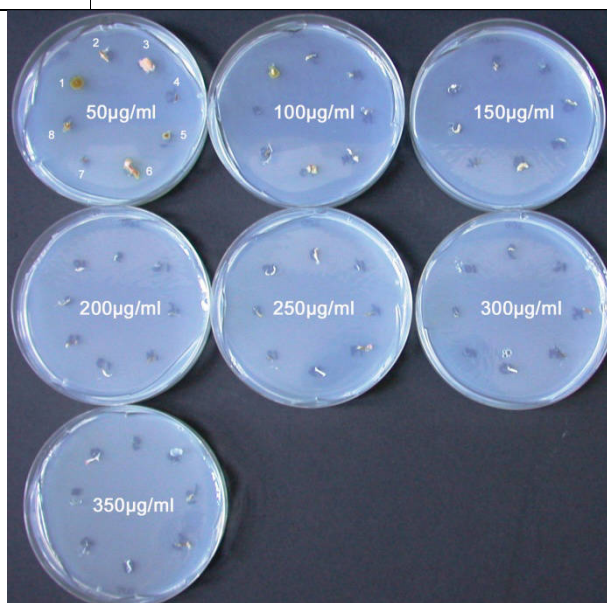
**Abb.5: Schematische Darstellung der Chromosom-1-Sequenzen der drei Transformanten FgFP (A), FgTK (B) und Fg $\Delta$ hyd5 (C) nach der Transformation mit den Vektoren pPK2-PHtaasGT (A), pPK2-PHsGT (B) und pPK2-PkosGT (C). In der Abbildung ist auch die Lokalisation der für das PCR-Screening der *F. graminearum*-Transformanten benutzten Primer dargestellt. Die Grenzen der Transfer-DNA sind mit einer roten Linie markiert.**

Die Vektoren wurden mittels Elektroporation in *Agrobacterium tumifaciensis* transformiert (Kapitel 2.2.4). Von jeder Transformation wurden je 10 Kanamycin-resistente Kolonien durch ein PCR-Screening mit den Primern 5'sGFPApaI-2 und sGFPApaI-2 (55°C) überprüft.

Bevor ein bestimmter *F. graminearum*-Stamm für die ATMT ausgesucht wurde, wurden acht *F. graminearum*-Stämme auf eine mögliche Hygromycin B-Resistenz getestet. Der Test wurde auf SFA-Platten mit einer Hygromycin B-Konzentration von 50-350 µg/ml mit folgenden *F. graminearum*-Stämmen durchgeführt: TMW4.0130, TMW 4.0139, TMW 4.0157, TMW 4.0154, TMW 4.0449, TMW 4.0184, TMW 4.0133 und TMW 4.0173. Die *F. graminearum*-Stämme 4.0157, 4.0154 und 4.0133 wiesen keine Hygromycin B-Resistenz auf. Da der Stamm 4.0157 bereits in früheren Arbeiten (Stübner 2011) mehrfach für die Transformation verwendet worden ist, wurde dieser Stamm auch für die vorliegende Arbeit gewählt.

**Tabelle 10: Hygromycin B-Resistenz der acht *F. graminearum*-Stämme**

Position	in	TMW Nr.	Hygromycin-Konzentration, µg/ml						
			50	100	150	200	250	300	350
Abb. 7									
1		4.0130	+	-	-	-	-	-	-
2		4.0139	+	+	-	-	-	-	-
3		4.0157	+	-	-	-	-	-	-
4		4.0154	-	-	-	-	-	-	-
5		4.0449	+	+	-	-	-	-	-
6		4.0184	+	-	-	-	-	-	-
7		4.0133	-	-	-	-	-	-	-
8		4.0173	+	+	-	-	-	-	-



**Abb.6: Hygromycin B Resistenz der acht *F. graminearum*-Stämme auf SFA-Platten mit unterschiedlichen HygromycinB Konzentrationen. Die Nummer der jeweiligen Probe entspricht jeweils der Nummer des zugehörigen Stammes in Tabelle 10.**

Anschließend wurde eine Transformation von *F. graminearum*-TMW 4.0157 mittels ATMT durchgeführt. Die Transformationsraten waren  $2,2 \times 10^{-15}$  für die Transformation mit pPK2-PkosGT,  $1,5 \times 10^{-14}$  für die Transformation mit pPK2-PHsGT und  $6,6 \times 10^{-14}$  für die Transformation mit pPK2-PHtaasGT. Jeweils ein Hygromycin B-resistenter Klon der Transformanten FgTK, FgFP und Fg $\Delta$ hyd5 wurde durch PCR mit folgenden Primer-Paaren überprüft: 5' 50bpminPhyd- und 3'- Schnittstellen (62°C); 5' HydSall-2 und 3' sGFPapal-2 (55°C); 5' HydSall-2 und 3' HydSall-2 (55°C). Tabelle 11 zeigt die theoretische Größe der jeweils zu erwartenden Amplifikate.

**Tabelle 11: Größe der Amplifikate nach den PCR Screenings der Transformanten**

	Fg $\Delta$ hyd5	FgFP	FgTK	FgWT
5' 50bpminPhyd3' Schnittstellen	-	953bp	953 bp	-
5' 50bpminPhyd3' sGFPApaI-2	1667	1979 bp	1982 bp	-
5' HydSall-2 3' HydSall-2	-	315 bp	315 bp	393 bp

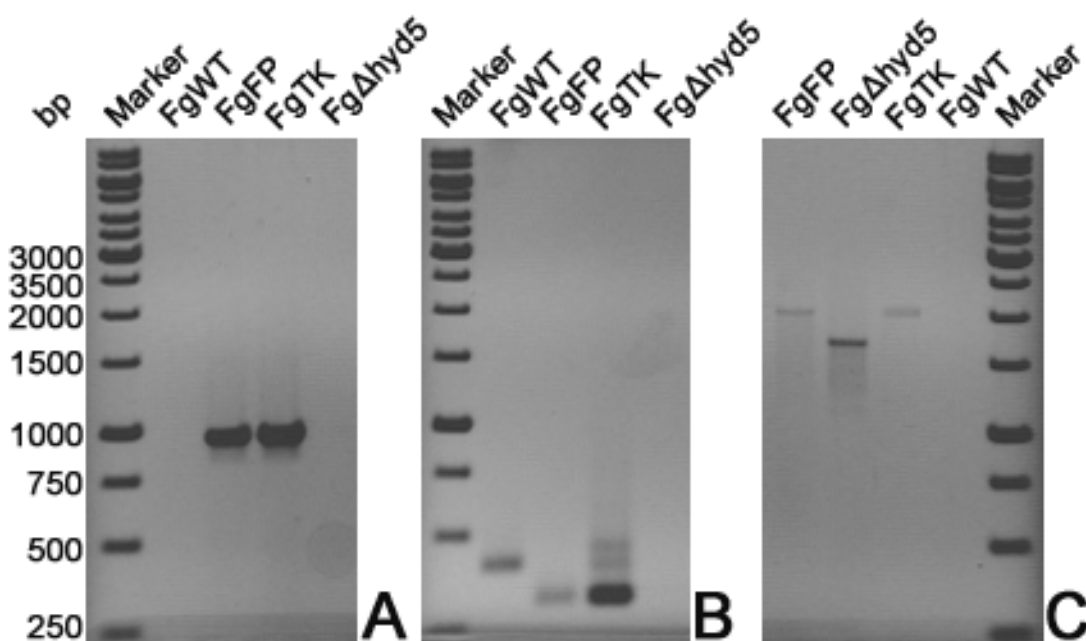


Abb.7: PCR Screening der *F. graminearum*-Transformanten. 1% Agarose-Gel mit darauf aufgetragenen PCR-Produkten von den PCR-Reaktionen mit folgenden Primern: 5' 50bpminPhyd und 3' Schnittstellen (A), 5' HydSall-2 und 3' HydSall-2 (B), 5' 50bpminPhyd und 3' sGFPApaI-2 (C). Als Template wurde gDNA von FgWT und der Transformanten FgTK, FgFP und Fg $\Delta$ hyd5 verwendet.

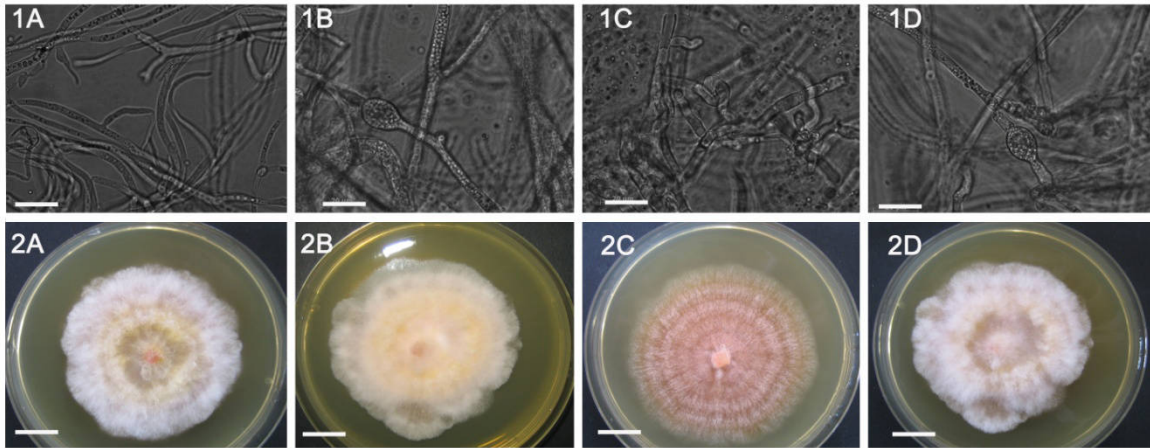
Abb.7 zeigt ein Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Amplifikaten, die mit gDNA des Wildtypstammes sowie der verschiedenen Transformanten erhalten wurden. Der 5' 50bpminPhyd Primer bindet sich upstream der Transfer-DNA. Damit wurde gezeigt, dass T-DNA in das Genom gerichtet und homolog eingebaut wurde. Nachdem die PCR-Amplifikate die richtige Größe gezeigt hatten, wurde die gDNA der Transformanten zur Sequenzierung geschickt. Alle drei Transformanten wurden mit den Primern 5' 50bpminPhyd, 5' HydSall-2 und 3' sGFPApaI-2 sequenziert. Die Sequenzen zeigten, dass die Transformanten die richtige Sequenz von *Phyd5*, *hyd5* und *sgfp* aufwiesen.

### **3.2 Vergleich der Morphologie der Transformanten mit der *F. graminearum* Wild Typs.**

Hydrophobine können im Laufe des Lebenszyklus eines Pilzes mehrere Aufgaben haben. Unter anderem beeinflussen sie die Morphologie des Pilzes. Hydrophobin-Deletionsmutanten wiesen in verschiedenen Untersuchungen unterschiedlich starke Abweichungen ihrer Morphologie vom Wild Typ auf: Die Bandbreite reichte dabei von der schlichten Abwesenheit des Luftmyzels bis hin zur vollkommenen morphologischen Übereinstimmung von Transformanten und Wild Typ (Whiteford & Spanu 2001; Fuchs *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Izumitsu *et al.* 2010; Mosbach *et al.* 2011). Im folgenden Teil der Arbeit wurden die morphologischen Merkmale der hier hergestellten Transformanten sowie der Wild Typ-Stämme miteinander verglichen.

#### **3.2.1 Morphologie der Kolonien und der Hyphen.**

Sowohl der Wild Typ von *F. graminearum* als auch die Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 wurden hinsichtlich ihrer Unterschiede beim Wachstum der Kolonien sowie hinsichtlich der morphologischen Merkmale ihrer Hyphen untersucht. Die Stämme wurden auf MM-Agar eingepflegt und für 3 d bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Kolonien makroskopisch und die Hyphen mikroskopisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Transformanten Fg $\Delta$ hyd5 (Abb.8, 2D) und FgTK (Abb.8, 2B) die gleiche Menge an Luftmyzel bildeten, wie FgWT (Abb.8, 2A). Die beiden Stämme unterschieden sich weder in Farbe des Myzels, noch in der Form der Kolonien. Die Transformante FgFP (Abb.8, 2C) wuchs genauso schnell wie der Wild Typ, produziert jedoch deutlich weniger Luftmyzel und hat eine rötliche Färbung (vgl. Abb.8).

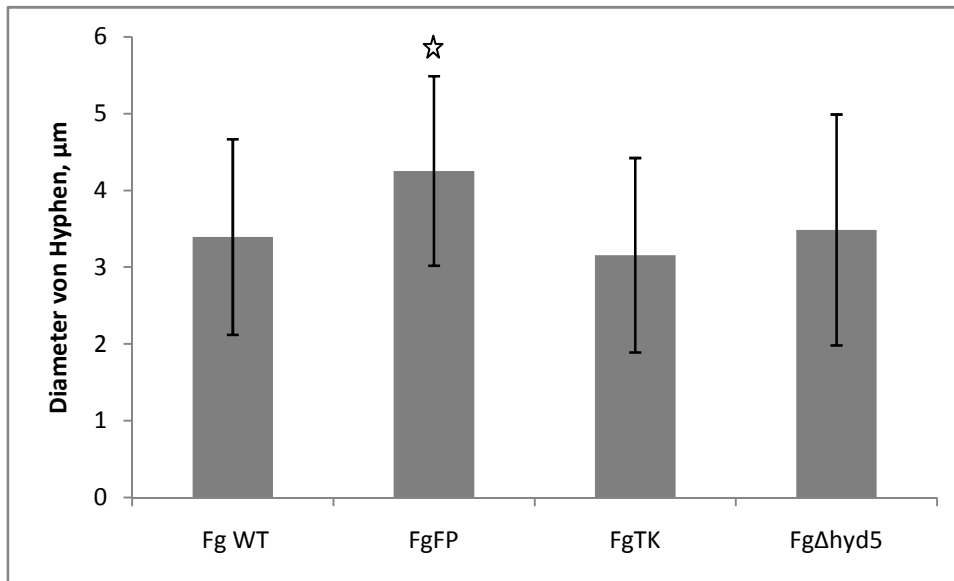


**Abb.8: Morphologie der Hyphen (1) und Kolonien (2) des *F. graminearum* Wild Typs (A) sowie der Transformanten FgTK (B), FgFP (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D) auf MM-Agar. Die Balken entsprechen 20 $\mu$ m in Reihe 1 bzw. 1 cm in Reihe 2.**

Die Hyphen von allen drei Transformanten waren im Vergleich zu FgWT in ihrer Morphologie verändert. Am stärksten war diese Veränderung beim FgTK (1B) zu sehen. Die Hyphen des FgTK waren kürzer, verkrümmter und wuchsen sehr dicht gedrängt nebeneinander. Die Hyphen von Fg $\Delta$ hyd5 (Abb. 8, 1D) und FgFP (Abb. 8, 1C) wiesen verdickte Stellen auf, in denen viele Vesikel zu sehen waren (vergl. Abb.8).

### **3.2.2 Vergleich des Hyphendurchmessers des *F. graminearum*-Wild Typs und der Transformanten**

Bei ersten Untersuchungen erschienen die Hyphen der Transformanten im mikroskopischen Bild breiter als die des Wild Typs. Um diesen Unterschied zu verifizieren wurde die Breite von je 100 Hyphen der drei Transformanten sowie des Wild Typs in Kulturen gemessen, die für 3 d bei RT auf MM-Agar gewachsen waren.



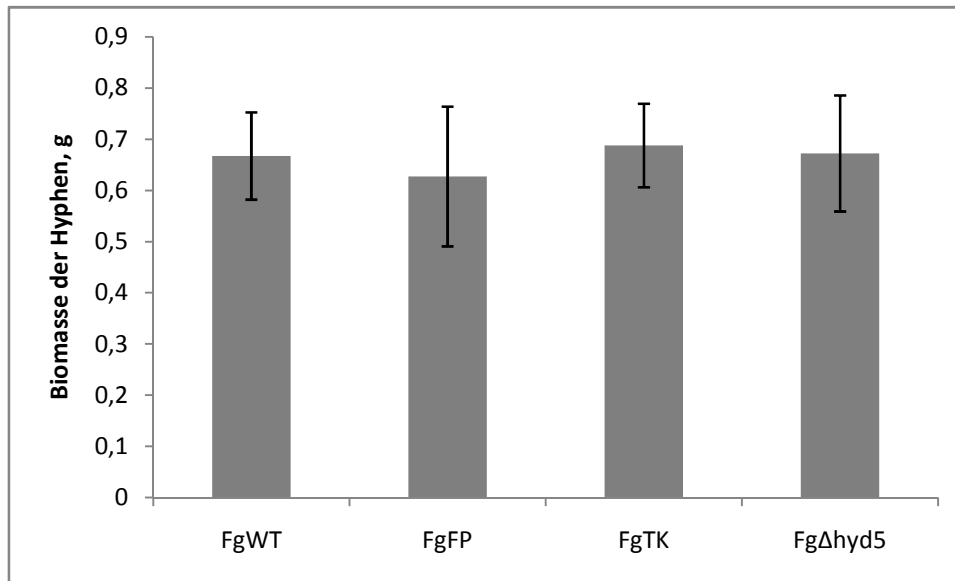
**Abb.9:** Durchmesser der Hyphen des *F. graminearum* Wild Typs FgWT sowie der drei Transformanten FgTK, FgFP und FgΔhyd5. Es wurde ein Mittelwert über 100 gemessene Hyphen ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichungen. Der Stern zeigt einen signifikanten Unterschied des Hyphendurchmessers der Transformante FgFP gegenüber FgWT, FgTK und FgΔhyd5 ( $P < 0.05$ ). Der Unterschied zwischen FgWT, FgTK und FgΔhyd5 untereinander war nicht signifikant.

Die Messung der Hyphen-Durchmesser ergab, dass weder die Deletionsmutante FgΔhyd5 ( $3,48 \mu\text{m} \pm 1,5$ ) noch die Transformante FgTK ( $3,27 \mu\text{m} \pm 1,13$ ) hinsichtlich des Hyphendurchmessers signifikante Unterschiede zum Wild Typ FgWT ( $3,39 \mu\text{m} \pm 1,27$ ) aufweisen. Im Gegensatz dazu besaß der Klon FgFP ( $4,25 \mu\text{m} \pm 1,23$ ) im Vergleich zum Wild Typ FgTK und zur Deletionsmutante FgΔhyd5 signifikant breitere Hyphen (vergl. Abb.9).

### 3.2.3 Biomasseproduktion des *F. graminearum* Wild Typs und der Transformanten

Um die Wirkung des Hydrophbins FgHyd5p auf die quantitative Entwicklung der Hyphen zu untersuchen, wurde die Produktion der Biomasse aller drei Transformanten mit der des *F.graminearum* Wild Typs verglichen. Dazu wurden Konidien jeweils in 50 ml eines Malzextrakt-Mediums angeimpft und für 3 d bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Hyphen bei -80°C gefriergetrocknet und anschließend gewogen. Im Vergleich zum Wild Typ FgWT, der  $0,66 \pm 0,08\text{g}$  Myzel produzierte, unterschieden sich die Transformanten FgFP mit  $0,62 \pm 0,13\text{g}$ , FgΔhyd5 mit  $0,67 \pm 0,11$  sowie FgTK mit  $0,68 \pm 0,08\text{g}$  von diesem kaum. Die festgestellten Unterschiede in der Biomasse-Produktion waren statistisch nicht signifikant (vgl. Abb.10).





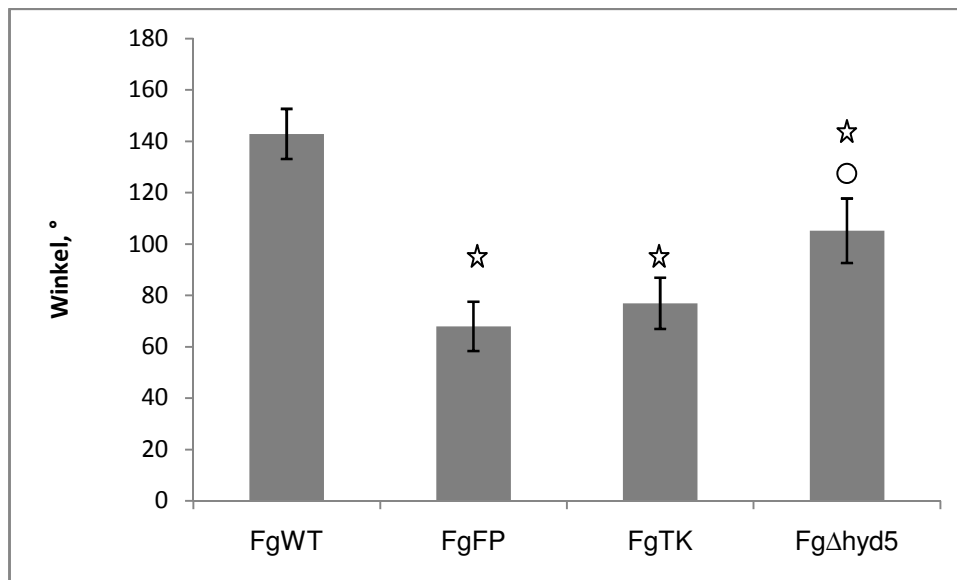
**Abb.10:** Produktion der Biomasse des *F. graminearum*-Wild Typs (FgWT) sowie der Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 innerhalb von drei Tagen bei RT in Malzextrakt-Medium. Die Balken zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Unterschiede waren in allen Fällen nicht signifikant.

### 3.2.4 Untersuchung der Hydrophobizität der Kolonieoberfläche

Um die Wirkung von FgHyd5p auf die wasserabweisenden Eigenschaften des *F. graminearum* zu untersuchen, wurde ein Hydrophobizitäts-Test durchgeführt. SFA-Platten wurden mit je einem Stamm (FgWT, FgFP, FgTK oder FgΔhyd5) inokuliert und für 3 d bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils fünf bis sechs Tropfen von 3 µl H<sub>2</sub>O auf die Oberfläche der Kulturen aufgetragen.

Der Hydrophobizitätstest ergab, dass die Hyphen der beiden Stämme FgFP und FgTK weniger wasserabweisend waren als der Wild Typ Stamm FgWT. Die Tropfen hatten eine flachere Form und einen größeren Kontaktwinkel. Außerdem war auch zwischen FgWT und FgΔhyd5 ein Unterschied bzgl. die Hydrophobizität der älteren Hyphen zuerkennen: Im Zentrum der Kolonie der *hyd5* Deletionsmutante FgΔhyd5, in dem sich die ältesten Hyphen befanden, wurden die Wassertropfen innerhalb von drei Sekunden durch das Myzel aufgesaugt. Dagegen dauerte das Verschwinden des Wassertropfens in den älteren Hyphen im Zentrum der Kolonie beim FgWT mehr als drei Minuten. Der Wassertropfen auf den 2 Tage alten Hyphen weiter außerhalb des Koloniezentrums war bei der Deletionsmutant FgΔhyd5 flacher und hatte einen größeren Kontaktwinkel als der entsprechende Tropfen beim Wild Typ FgWT. Da es schwierig war, mit bloßem Auge den Unterschied zwischen den Kontaktwinkeln zu erkennen, wurden die Kontaktwinkel mit dem Programm ImageJ gemessen. Dafür wurden je 50 Messungen durchgeführt. Die

Untersuchung der Kontaktwinkel zeigte einen deutlichen und signifikanten Unterschied zwischen den allen Transformanten und dem Wild Typ: So lag in Tropfen auf dem Myzel des FgWT durchschnittlich mit einem Winkel von  $142,82 \pm 9,76^\circ$  auf. Die Transformanten verfügten über eine deutlich geringere Hydrophobizität, was sich durch die geringeren Winkel zeigt:  $76,65 \pm 9,96^\circ$  beim FgTK,  $67,98 \pm 9,69^\circ$  bei FgFP und  $105,16 \pm 12,54^\circ$  beim Fg $\Delta$ hyd5 (vgl. Abb.11).

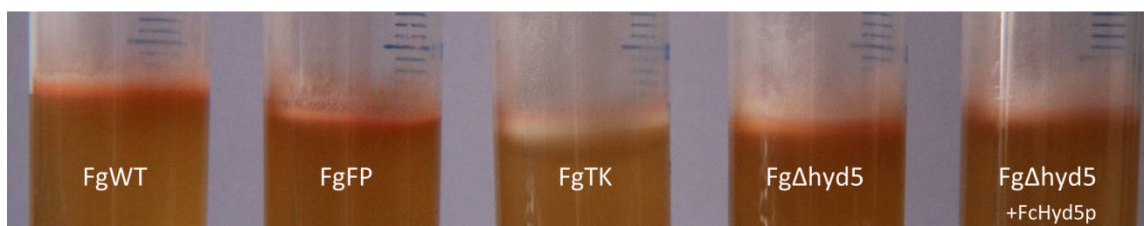


**Abb.11:** Kontaktwinkel der Wassertropfen auf dem Myzel von Kulturen des *F. graminearum* Wild Typs FgWT (A) und der Transformanten FgFP (B), FgTK (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D). Die Kontaktwinkel wurden jeweils mit Hilfe des Programms ImageJ gemessen. Die Balken zeigen Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten mit je 30 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede des Kontaktwinkels der Transformanten FgFP und FgTK gegenüber FgWT sowie gegenüber Fg $\Delta$ hyd5. Der Kreis zeigt signifikante Unterschiede der Kontaktwinkel von Fg $\Delta$ hyd5 gegenüber FgWT, FgFP und FgTK ( $P < 0.05$ ). Der Unterschied zwischen FgFP und FgTK war nicht signifikant.

### 3.2.5 Überwindung der Wasseroberflächenspannung

Da die Hydrophobizität der Hyphen der Transformanten beeinträchtigt war (siehe 3.2.4), wurde vermutet, dass auch die Fähigkeit der Hyphen, die Oberflächenspannung von Wasser zu senken, beeinträchtigt war. Eine Absenkung der Oberflächenspannung ist nötig, damit Hyphen die Grenzfläche zwischen dem wässrigen Medium und der Luft durchbrechen können. Um zu überprüfen, ob die Transformanten die Fähigkeit zur Absenkung der Oberflächenspannung besitzen, wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefrorene Leca® Granula in ein mit 10 ml ME-Medium gefülltes Kulturröhrchen überführt und dort für 10 d ohne jegliche Bewegung bei RT inkubiert. Es wurden eingefrorene Leca® Granula verwendet, um sicherzugehen, dass sich an der Oberfläche der Granula keine lebenden Hyphen oder Konidien befinden, die eventuell abgewischt werden und an der

Oberfläche des Mediums auskeimen könnten. Die Untersuchung ergab, dass es entgegen der Vermutung keinen Unterschied bzgl. der Penetration der Wasseroberfläche zwischen dem *F.graminearum* Wild Typ und den Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 gab. Auch bei der Zugabe von lyophilisiertem FcHyd5p (gereinigtes Hydrophobin 5 von *F. culmorum*) zum Medium des Fg $\Delta$ hyd5-Stammes konnte diesbezüglich kein Unterschied festgestellt werden. Alle vier Stämme waren in der Lage die Wasseroberflächenspannung senken, um Luftmyzel zu bilden (vgl. Abb.12).



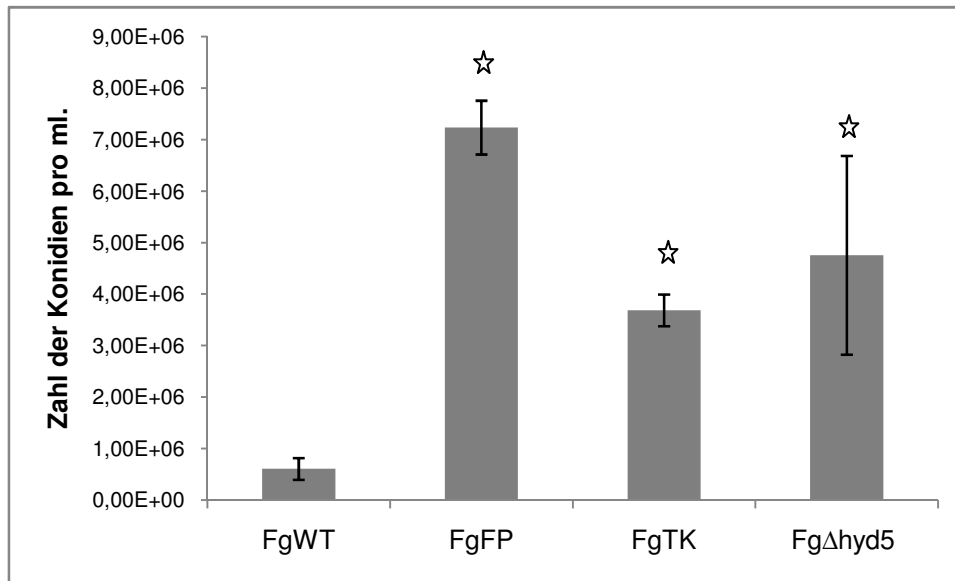
**Abb.12: Penetration der Wasseroberfläche und Bildung von Luftmyzel durch den *F. graminearum* Wild Typ, der drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5, sowie der Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 in ME-Medium nach Zugabe von reinem Hydrophobin FcHyd5p.**

### **3.3 Vergleich der Konidien des *F.graminearum* Wild Typs und der Transformanten**

Hydrophobine zeigen bei manchen Pilzen Auswirkungen auf die Produktion, Dissemination und Auskeimung der Konidien oder Sporen (Talbot *et al.* 1996; Whiteford *et al.* 2004; Askolin *et al.* 2005). In diesem Kapitel wurde die Wirkung des Hydrophobins FgHyd5p auf verschiedene Aspekte der Konidien untersucht.

#### **3.3.1 Konidienbildung**

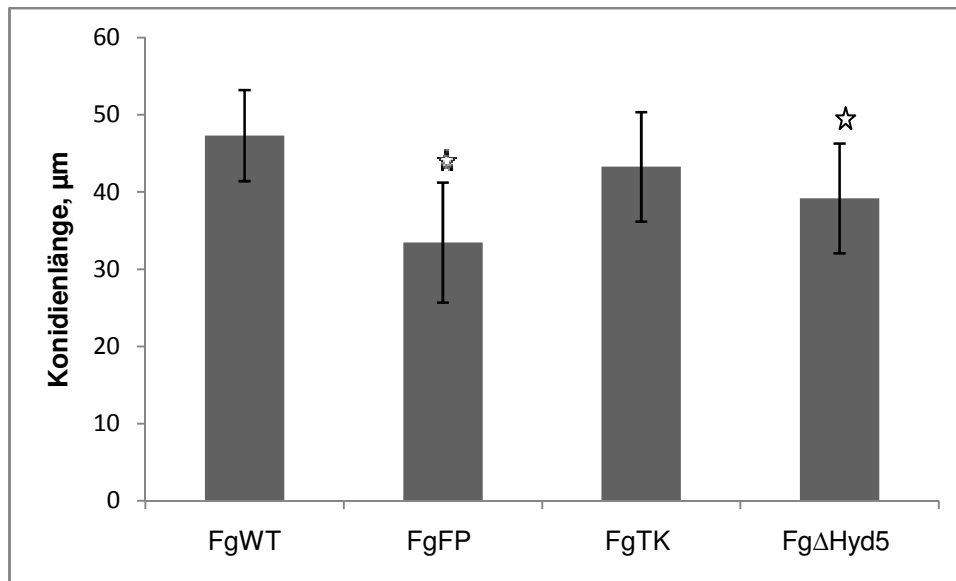
Um den Einfluss des Hydrophobin 5 auf die Sporulation zu überprüfen, wurden die Transformanten FgFP, FgTK, Fg $\Delta$ hyd5 sowie der *F.graminearum* Wild Typ FgWT auf MB-Agar zur Sporulation gebracht. Nach 7 d Inkubation bei RT und UV-Licht wurden die Konidien mit 1 ml sterilem Wasser und Glasperlen von der Platte gesammelt. Die Sporenzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Kamera bestimmt. Alle drei Transformanten bildeten statistisch signifikant mehr Konidien pro ml als der *F. graminearum* Wild Typ. Der FgWT bildete nach 7 d Wachstum  $6,09 \times 10^5 \pm 2,1 \times 10^5$  Konidien, während in derselben Zeitspanne die Transformante FgFP  $7,23 \times 10^6 \pm 5,21 \times 10^5$ , die Transformante FgTK  $3,69 \times 10^6 \pm 3 \times 10^5$  und die Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5  $4,76 \times 10^6 \pm 1,93 \times 10^6$  Konidien pro ml bildeten (vgl. Abb.13).



**Abb.13:** Zahl der Konidien pro ml. Es wurde sowohl die Sporenzahl pro ml des *F. graminearum*-Wild Typs FgWT als auch die der Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 auf MB-Agar berechnet. Die Balken zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 30 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschieden der Zahl der Konidien zwischen FgFP, FgTK und FgΔhyd5 gegenüber FgWT ( $P < 0,05$ ). FgΔhyd5 zeigte keinen signifikanten Unterschied zu FgFP ( $P > 0,05$ ). FgΔhyd5 zeigt keinen signifikanten Unterschied zu FgTK ( $P > 0,05$ ).

### 3.3.2 Länge der Konidien

Es wurde sowohl die Länge der Konidien des *F.graminearum* Wild Typs als auch der Transformanten gemessen. Die Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 sowie der Wild Typ FgWT wurden auf MB-Agar zur Sporulation gebracht. Nach 7d Inkubation bei RT und UV-Licht wurden die Konidien mit 3 ml sterilem Wasser und Glasperlen von den Platten gesammelt. Die Länge der Konidien wurde mit Hilfe des Programms AxioVision 4.7 gemessen. Die Messung zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich der Konidienlänge sowohl zwischen dem Wild Typ FgWT ( $47,33\mu\text{m} \pm 5,89 \mu\text{m}$ ) und der Deletionsmutanten FgΔhyd5 ( $39,20\mu\text{m} \pm 7,10 \mu\text{m}$ ) als auch im Vergleich zur Transformanten FgFP ( $33,46\mu\text{m} \pm 7,76 \mu\text{m}$ ). Die Konidienlänge der Transformante FgTK ( $43,27\mu\text{m} \pm 7,08 \mu\text{m}$ ) unterschied sich dagegen nicht auf signifikante Weise von der des Wild Typs (vgl. Abb.14). Der festgestellte Unterschied zwischen FgTK und FgWT war nicht signifikant, wohingegen der Unterschied zwischen FgFP und FgΔhyd5 sowie zwischen FgFP und FgTK, FgTK und FgΔhyd5 signifikant waren ( $P < 0,05$ ).

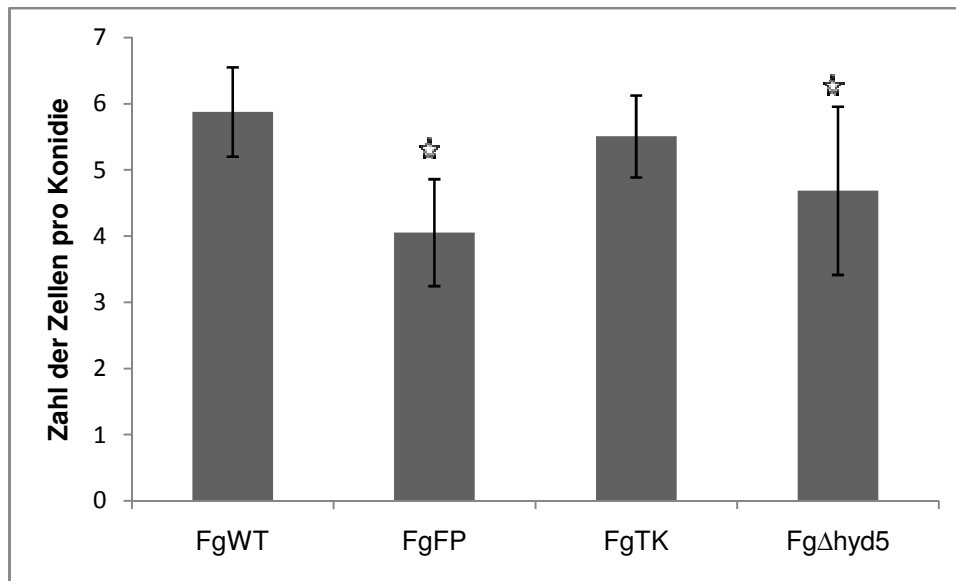


**Abb.14:** Konidienlänge des *F. graminearum*-Wild Typs FgWT und der drei Mutanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 auf dem MB-Medium nach 7 d Wachstum bei RT. Es wurde jeweils der Abstand zwischen der Fuß- und der Kopfzelle gemessen. Die Balken zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 200 Messungen pro Experiment und Transformante. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede in der Konidienlänge zwischen FgFP und FgΔhyd5 gegenüber FgWT ( $P < 0.05$ ). Der Unterschied zwischen FgTK und FgWT war nicht signifikant.

### 3.3.3 Zahl der Zellen pro Konidie

Da die Konidien der *hyd5* Deletionsmutante von *F. graminearum* signifikant kleiner waren als die Konidien des Wild Typs, wurde die Zellzahl pro Konidie gemessen. Die Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 sowie der Wild Typ FgWT wurden auf MB-Agar zur Sporulation gebracht. Nach sieben-tägiger Inkubation bei RT und UV-Licht wurden die Konidien mit 3 ml sterilem Wasser und Glasperlen von einer Plate gesammelt und es wurde die Zahl der Zellen, inklusive Kopf- und Fußzelle, pro Konidie gezählt.

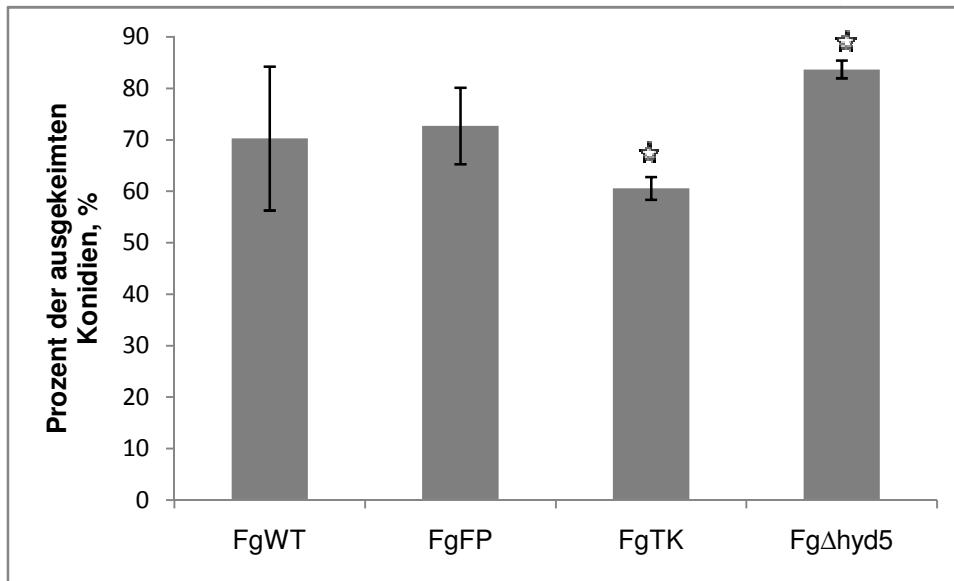
Die Sporen des FgWT-Stammes hatten  $5,87 \pm 0,67$  Zellen, während für die Transformanten FgFP  $4,05 \pm 0,80$  Zellen pro Konidie, FgTK  $5,50 \pm 0,619$  Zellen pro Konidie und FgΔhyd5  $4,48 \pm 1,2$  Zellen pro Konidie gezählt wurden (vgl. Abb.15). Die Messung zeigte signifikante Unterschiede zwischen FgFP und FgΔhyd5 Transformanten zudem Wild Typ, sowie zwischen FgFP und FgTK. Der Unterschied zwischen FgWT und FgTK war hingegen nicht signifikant.



**Abb.15:** Zahl der Zellen pro Konidie beim *F. graminearum*-Wild Typ sowie bei den drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 auf dem MB-Medium nach 7d Wachstum bei RT. Für die Berechnung wurden 100 Konidien pro Stamm zufällig ausgesucht, bei denen jeweils die Zellen gezählt wurden. Die Balken zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 50 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede in der Zahl der Zellen pro Konidie zwischen FgFP und FgΔhyd5 gegenüber FgWT ( $P < 0.05$ ). Die Unterschiede zwischen FgWT und FgTK sowie zwischen FgFP und FgΔhyd5 waren nicht signifikant.

### 3.3.4 Auskeimungspotenzial der Konidien

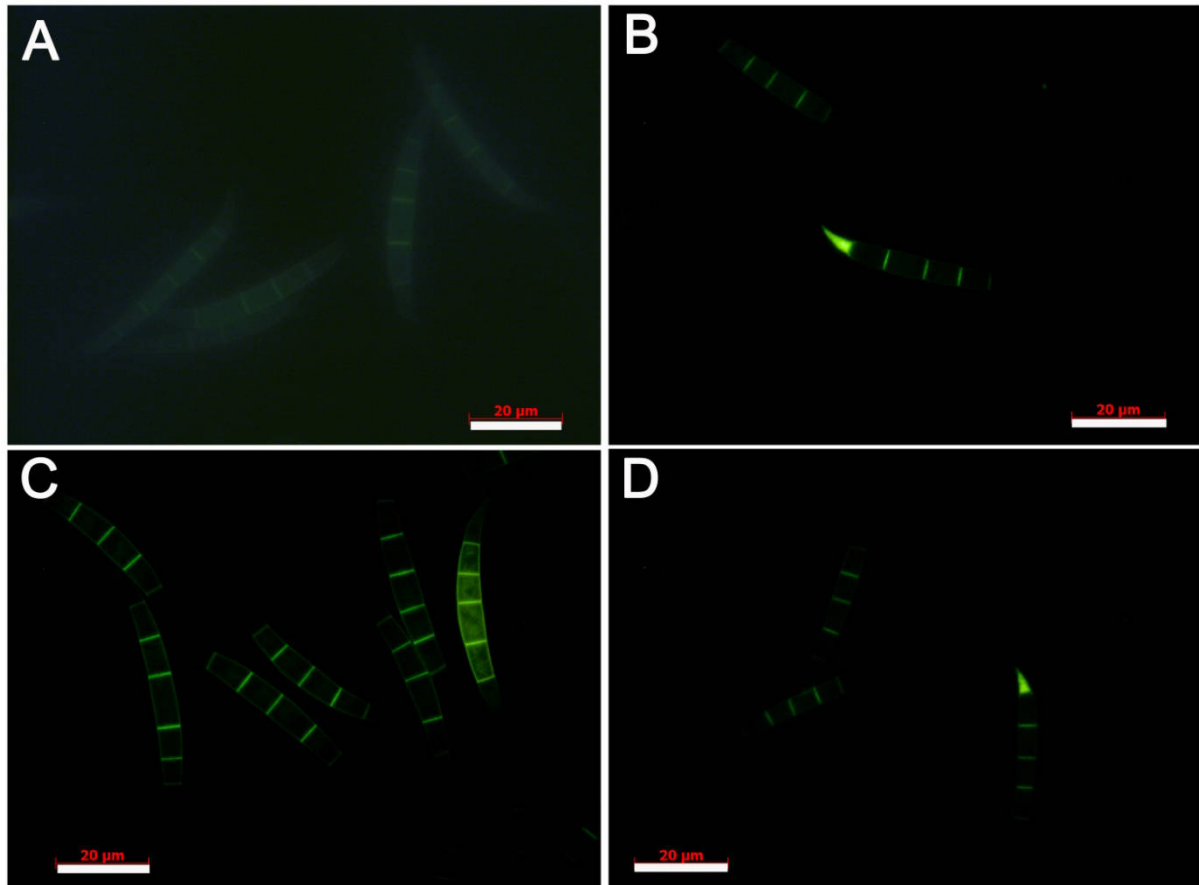
Es wurde die Vitalität der Konidien des *F. graminearum*-Wild Typs sowie der drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 miteinander verglichen. Die Konidien suspensionen wurden hergestellt wie im Kapitel 2.2.5 beschrieben. Anschließend wurde von jedem Stamm 20μl Konidien suspension (5x10<sup>4</sup> Konidien) in 20 ml ME-Medium angeimpft und für 3h bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Prozentsatz an ausgekeimten Konidien bestimmt. Pro Stamm wurden je 300 Konidien betrachtet. Die Untersuchung des Auskeimungspotenzials der Konidien zeigte beim Vergleich der Stämme keinen deutlichen Unterschied bzgl. der Vitalität der Sporen zwischen Transformanten und dem Wild Typ. Der Unterschied zwischen FgFP und FgTK sowie zwischen FgFP und FgΔhyd5 waren nicht signifikant. Demgegenüber war der Unterschied zwischen FgTK und FgΔhyd5 statistisch signifikant. Beim Wild Typ FgWT keimten 70,26±13,9% der Konidien, beim Stamm FgΔhyd5 83,65±1,7%, beim Stamm FgFP 72,69±7,42 % und beim Stamm FgTK 60,59±2,20% (vgl. Abb.16).



**Abb.16:** Auskeimungspotenzial der Konidien des *F. graminearum*-Wild Typs (FgWT) so wieder drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5. Die Sporen wurden für 3h bei RT in ME-Medium inkubiert. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der auskeimenden Konidien errechnet. Die Balken zeigen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 100 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Unterschiede zwischen den Transformanten und dem Wild Typ sind nicht signifikant. Unterschiede zwischen FgFP und FgTK, sowie zwischen FgFP und FgΔhyd5 sind nicht signifikant. Der Unterschied zwischen FgTK und FgΔhyd5 ist statistisch signifikant (Sternchen).

### 3.3.5 Aktivierung der *hyd5* Gen-Promoters in den Konidien

In allen drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 wurde unter der Kontrolle des *hyd5* Gen-Promoters ein *sgfp*-Gen kloniert, um auf diese Weise die Produktion und Lokalisierung des FgHyd5p verfolgen zu können (FgFP, FgTK) oder um die Aktivität des *hyd5* Promoters zu beobachten (FgΔhyd5). Mit dem Stamm FgFP, (FgHyd5p-sGFP Fusionsprotein) kann das FgHyd5p in der Zelle lokalisiert werden. Mit den Stämmen FgTK (translationelle Kopplung, führt zur gleichzeitigen Produktion von FgHyd5p und sGFP) und FgΔhyd5 (Deletionsmutante mit sGFP als Reporterprotein für Promoteraktivität) kann der Moment der FgHyd5p-Produktion ermittelt werden. Es wurde untersucht, ob in den Konidien FgHyd5p produziert wird. Die Konidien suspensionen der Transformanten wurden hergestellt wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die Konidien wurden unter Fluoreszenzmikroskopiert. Die Konidien des Wild Typ Stammes zeigten keine Fluoreszenz (Abb.17A). In manchen der Konidien der beiden Transformanten FgFP und FgΔhyd5 wurden grün leuchtende Kopfzellen beobachtet (vergl. Abb.17 B,D). Bei allen Transformanten trat eine grüne Fluoreszenz der Septen auf.

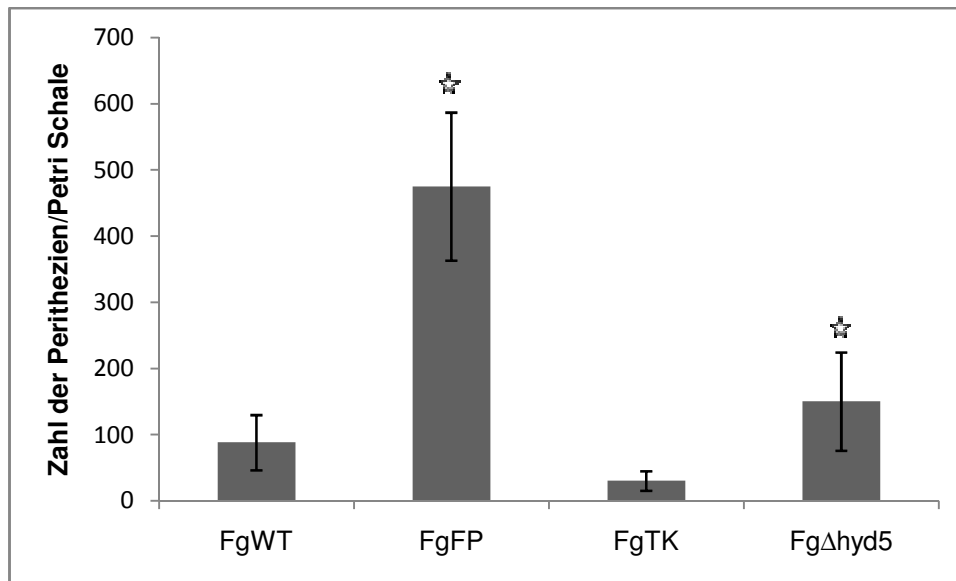


**Abb.17:** Fluoreszenz der Konidien des *F. graminearum*-Wild Typ-Stammes (A) und der drei Transformanten FgFP (B), FgTK (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D). Es ist deutlich zu sehen, dass die Kopfzellen des FgFP und des Fg $\Delta$ hyd5 grünleuchten. Bei Transformanten FgFP (B), FgTK (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D) sind leuchtende Septen zu sehen. Die Balken haben eine Länge von 20  $\mu$ m.

### 3.3.6 Bildung der Perithezien

Um den Einfluss des Hydrophobins 5 auf die Bildung von Perithezien und somit auf die Askosporenbildung (Teleomorph *Gibberella zeae*) zu überprüfen, wurden die Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 sowie der *F. graminearum* Wild Typ FgWT auf einem Karotten-Agar zur Perithezienbildung gebracht. Nach 7d Wachstum wurde die Zahl der Perithezien pro Petrischale ermittelt. Die zwei Transformanten bildeten statistisch signifikant mehr Perithezien als der *F. graminearum*-Wild Typ. So bildete FgWT  $88,33 \pm 41,68$  Perithezien pro Petrischale, FgFP  $475,10 \pm 111,80$  und Fg $\Delta$ hyd5  $150,33 \pm 74,28$ . Der Unterschied in der Perithezienbildung zwischen der Transformante FgTK ( $30,33 \pm 14,86$ ) und FgWT war statistisch nicht signifikant (vgl. Abb.18).





**Abb.18:** Perithezienzahl pro Petrischale. Diese wurde für den *F.graminearum* Wild Typ FgWT sowie für die Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 auf Karottenagar ermittelt. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten in denen je 5 Petrischalen ausgezählt wurden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede in der Zahl der Perithezien zwischen FgFP und FgΔhyd5 gegenüber dem *F. graminearum* Wild Typ FgWT ( $P < 0.05$ ). Der Unterschied zwischen FgWT und FgTK war nicht signifikant. Unterschiede zwischen FgTK zum FgFP und FgΔhyd5 waren signifikant.

### 3.4 Wachstum des *F.graminearum*-Wild Typs und der Transformanten auf unterschiedlichen Medien

Die Expression der unterschiedlichen Hydrophobin-Gene wird durch Nährstoffe wie Stickstoff, Kohlenstoff, Phosphat oder auch durch komplexe Nährstoffquellen wie Hefeextrakt beeinflusst (Nakari-Setälä *et al.* 1997; Nielsen *et al.* 2001; Askolin *et al.* 2005; Kim *et al.* 2005). In diesem Kapitel wird beschrieben, wie sich unterschiedliche Medien und Substrate auf das Wachstum des *F. graminearum* Wild Typs sowie der Transformanten auswirken und welchen Einfluss diese auf die Aktivierung des *hyd5* Promoters haben.

#### 3.4.1 Wachstum der Stämme auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen

Um die Wirkung der C-Quellen auf das Wachstum und die Aktivierung der *hyd5*-Promoters von *F. graminearum* zu untersuchen, wurden FgWT, FgFP, FgTK und FgΔhyd5 auf MM-Medium mit Zusatz unterschiedlicher Kohlenstoffquellen (Raffinose C18, Salizin C13, Saccharose C12, Glukose C6 oder Glycerin C3) für 5 d bei RT inkubiert. Täglich wurde das Wachstum der Kolonie gemessen (Koloniedurchmesser). Am fünften Tag wurden die Hyphen mikroskopiert und die Fluoreszenz betrachtet.

Keine der ausgewählten C-Quellen hemmte oder förderte das Wachstum der Stämme (Abb.19). Der Vergleich des Wachstums der verschiedenen Stämme untereinander zeigte, dass auch die Deletionsmutante *FgΔhyd5* keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zum Wild Typ *FgWT* aufwies. Dagegen zeigten die Transformanten *FgFP* und *FgTK* ein etwas geringeres Wachstum als der Wild Typ Stamm.

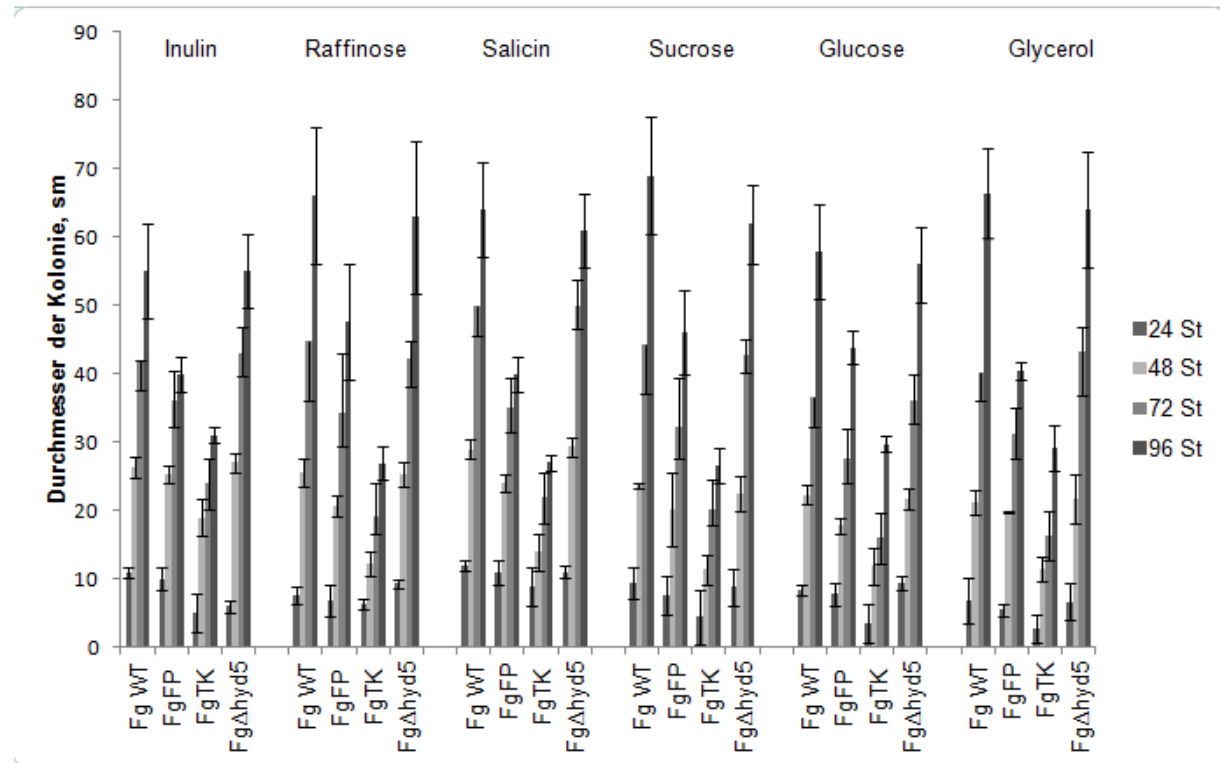
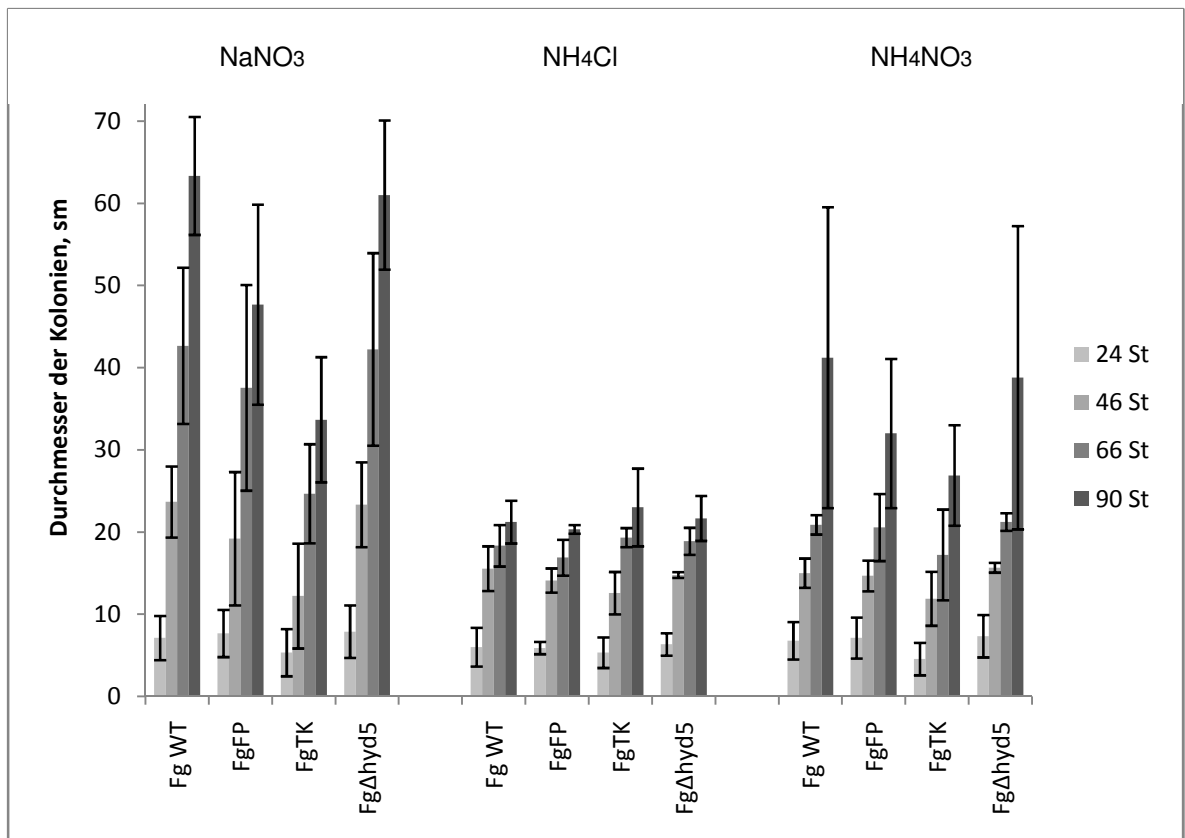


Abb.19: Durchmesser der Kolonien des *F. graminearum*-Wild Typs (*FgWT*) und der Transformanten *FgFP*, *FgTK* und *FgΔhyd5* auf MM-Medien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen. Das Wachstum der Kolonien wurde alle 24 Stunden gemessen. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 3 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

### 3.4.2 Wachstum der Stämme auf unterschiedlichen Stickstoffquellen

Um die Wirkung verschiedener N-Quellen auf das Wachstum und die Aktivierung des *hyd5*-Promoters von *F. graminearum* zu untersuchen, wurden *FgWT*, *FgFP*, *FgTK* und *FgΔhyd5* auf MM-Medium mit Stickstoffquellen (Natriumnitrat, Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat) für 96h lang bei RT inkubiert. Das Wachstum der Kolonie wurde täglich gemessen. Am fünften Tag wurden die Hyphen mikroskopiert und die Fluoreszenz betrachtet.



**Abb.20:** Durchmesser der Kolonien des *F.graminearum*-Wild Typs (FgWT) und der Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 auf MM-Medien mit unterschiedlichen Stickstoffquellen. Das Wachstum der Kolonien wurde alle 24 Stunden gemessen. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 3 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweiligen Standardabweichungen. Die Signifikanz der Ergebnisse ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Keine der ausgewählten N-Quellen hemmte oder förderte das Wachstum der Transformanten in Vergleich zum Wild Typ (Abb.20). Interessanterweise zeigt die Deletionsmutante FgΔhyd5 diesbezüglich keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wild Typ FgWT. Im Gegensatz dazu wuchsen die Transformanten FgFP und FgTK auf MM-Medien mit Natriumnitrat und Ammoniumnitrat signifikant schlechter als der Wild Typ.

### 3.4.3 Aktivierung der *hyd5* Gen-Promoters durch komplexe und definierte Medien, so wie auf unterschiedlichen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen

Um die Auswirkung verschiedener Zusätze auf die Aktivierung der *hyd5* Gen-Promoters zu untersuchen, wurden 10 µl Konidien suspensionen ( $5 \times 10^4$  Konidien) des *F.graminearum* Wild Typs sowie der drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 jeweils in die Mitte der komplexen Agarmedien OA, PDA, YPG, MA, YES und

Karottenagar als auch in die Mitte der definierten Medien SNA und SFA oder Wasseragar angeimpft und für 3 d bei RT inkubiert. Dann wurde die Fluoreszenz der Hyphen des Wild Typs und der Transformanten mit Hilfe des Programms AxioVision 4.7 (Imaging Solution Software, Zeiss, Deutschland) gemessen. Auf den komplexen Medien konnte eine Fluoreszenz sowohl beim *F. graminearum* Wild Typ als auch bei allen drei Transformanten festgestellt werden. Da das Myzel des *F. graminearum* Wild Typs eine grünliche Autofluoreszenz zeigte, konnte weder auf einem der Medien OA, PDA, YPG, MA, YES oder Karottenagar noch auf den definierten Medien SNA und SFA eine eindeutige Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters festgestellt werden.

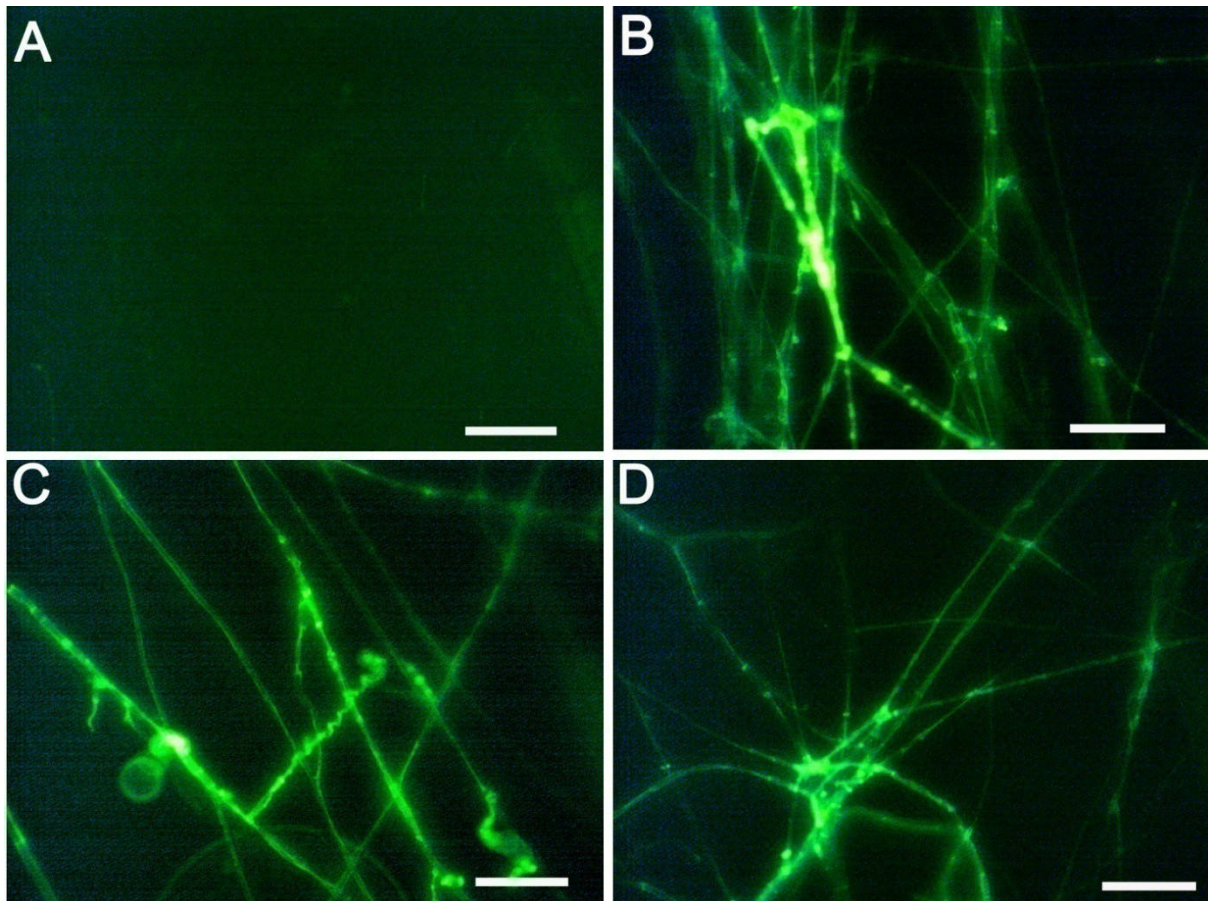
Nach 96 h Wachstum auf dem MM-Medium mit unterschiedlichen C- oder N-Quellen wurden die Hyphen mikroskopiert und es wurde ihre Fluoreszenz betrachtet. Dabei wurde eine Autofluoreszenz bei den Hyphen des FgWT festgestellt. Zwischen der Fluoreszenz des FgWT und der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 konnte kein Unterschied festgestellt werden. Es wurde weder auf einem der MM-Medien mit Raffinose, Salizin, Saccharose, Glukose oder Glycerin, noch auf MM-Medien mit Natriumnitrat, Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat ein Unterschied zwischen der Fluoreszenz des FgWT und der der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 festgestellt (Daten nicht gezeigt).

### **3.4.4 Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters durch Gerste- und Weizen-Zellextrakt**

Zellextrakt von 200 g jungen Gersten- und Weizenpflanzen wurde isoliert wie in Kapitel 2.5.8.5 beschrieben und mit Agar gemischt zu einem Festmedium verarbeitet. Der *F. graminearum* Wild Typ Stamm und die drei Transformanten Stämme wurden auf die Platten eingimpft und für 4d bei RT inkubiert. Danach wurden die Hyphen mikroskopiert und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz betrachtet. Dabei konnte beim *F. graminearum* Wild Typ sowie bei allen drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 eine vergleichbar schwache Fluoreszenz der Hyphen festgestellt werden. Ebenfalls kein Unterschied bezüglich der Fluoreszenz konnte zwischen den Hyphen festgestellt werden, die auf Weizenextrakt und denjenigen, die auf Gerstenextrakt gewachsen waren (Daten nicht gezeigt). Die Autofluoreszenz wurde wie bei den anderen, weiter oben beschriebenen Medien ermittelt.

### **3.5 Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters während des Wachstums des *F. graminearum*-Wild Typs und der drei Transformanten auf wasserabweisender Oberfläche**

Bei vielen Pilzarten haben Hydrophobine eine wichtige Funktion beim Anhaften der Zellen an wasserabweisende Oberflächen, etwa von Blättern (Wösten 2001). Um die Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters auf wasserabweisenden Oberflächen zu überprüfen, wurden Konidiensuspensionen des *F. graminearum* Wild Typs sowie der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 mit einem flüssigen PDA-Medium gemischt und für 4d ohne jegliche Bewegung bei RT inkubiert. Die Hyphen, die nun an der Oberfläche der Petrischale gewachsen waren, wurden mikroskopiert. Dort zeigten die Hyphen des *F. graminearum* Wild Typs keine Fluoreszenz. Die Hyphen von allen drei Transformanten dagegen zeigten eine deutliche Fluoreszenz. In Abb.21 ist deutlich zu erkennen, dass derjenigen Hyphen, die sich im direkten Kontakt mit der wasserabweisenden Oberfläche befanden, stärker fluoreszierten, als diejenigen Hyphen, die keinen Kontakt hatten.



**Abb.21:** Fluoreszenz des *F.graminearum* Wild Typs (A) sowie der Transformanten FgFP (B), FgTK (C) und Fg $\Delta$ hyd5 (D) auf der wasserabweisenden Oberfläche einer Petrischale. Die Fluoreszenz war nur in denjenigen Hyphen zu sehen, die direkt an der Oberfläche der Petrischale gewachsen waren. Die Balken stellen eine Länge von 40  $\mu$ m dar.

### **3.6 Infektion von Gerste und Weizen mit dem *F. graminearum*-Wild Typ und den drei Transformanten**

Es ist bekannt, dass manche Hydrophobine Auswirkungen auf die Pathogenität der Pilze haben (Talbot *et al.* 1993; Whiteford *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Viterbo & Chet 2006). Um die Wirkung des FgHyd5p auf die Pathogenität von *F. graminearum* zu überprüfen, wurden mit Gerste und Weizen jeweils zwei Pathogenitätstests durchgeführt: eine Keimlingsinfektion und eine Blattinfektion.

#### **3.6.1 Infektion der Keimlinge von Gerste und Weizen**

Keimlinge von Weizen und Gerste wurden entweder mit der Konidiensuspension des *F. graminearum* Wild Typs oder mit der Konidiensuspension einer der drei Transformanten infiziert wie in Kapitel 2.5.9.2 beschrieben. Die Länge der infizierten Keimlinge sowie von nicht-infizierten Keimlingen als Kontrolle wurden nach 10 tägigem Wachstum gemessen. Die Messung zeigte, dass alle Weizenpflanzen, die mit den

Transformantenstämmen infiziert wurden oder unbehandelt blieben, signifikant länger waren als die des mit FgWT infizierten Weizens. Die mit dem FgWT infizierten Weizenkeimlinge hatten eine Länge von  $7,00 \pm 5,86$  cm, während die mit dem FgTK infizierten Keimlinge nur  $15,39 \pm 6,07$  cm lang waren. Die mit FgFP infizierten Keimlinge waren nur  $9,52 \pm 7,38$  cm lang und die mit Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Keimlinge maßen nur  $9,7 \pm 7,70$  cm. Alle infizierten Keimlinge waren signifikant kürzer als die nicht infizierten Kontrollkeimlinge, welche eine durchschnittliche Größe von  $18,41 \pm 6,06$  cm hatten. Die Messung der nicht-infizierten Gerstenkeimlinge ergab, dass auch diese Pflanzen signifikant länger waren als die mit FgWT infizierten Gerstekeimlinge. Die mit FgWT infizierten Gerstenkeimlinge waren  $9,73 \pm 6,91$  cm lang, während die mit FgTK infizierten Keimlinge  $14,09 \pm 8,26$  cm lang. Die mit FgFP infizierten Keimlinge der Gerste hatten eine Länge von  $13,48 \pm 7,07$  cm und die mit Fg $\Delta$ hyd5 infizierten maßen  $13,98 \pm 6,24$  cm. Alle infizierten Keimlinge waren signifikant kleiner als die nicht infizierten Keimlinge, die durchschnittlich  $18,18 \pm 6,63$  cm groß waren. Die Abbildung Abb.22 zeigt, dass sowohl die mit den Transformanten infizierten Gerstenkeimlinge als auch die mit den selben Stämmen infizierten Weizenkeimlinge signifikant länger waren als die jeweils mit dem Wild Typ infizierten Keimlinge.

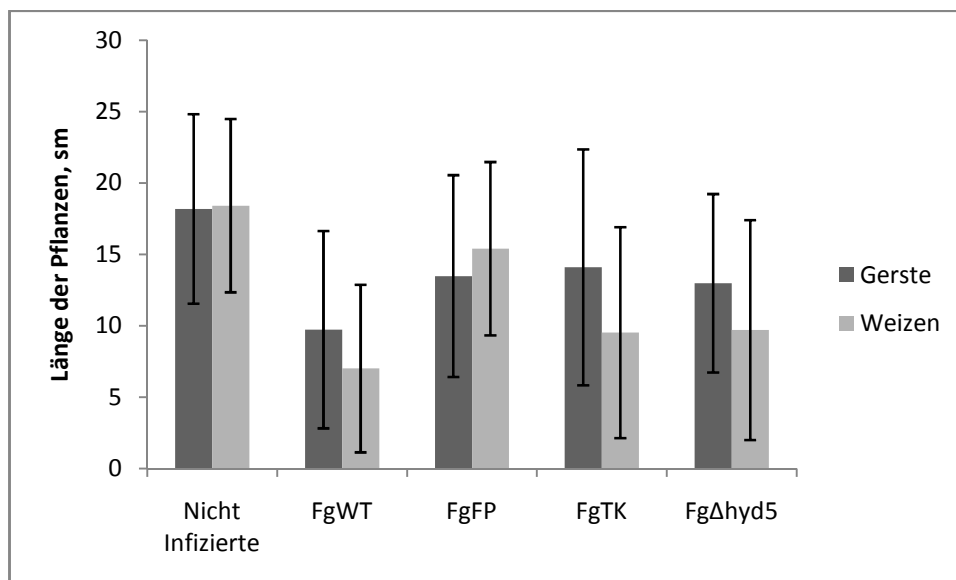


Abb.22: Länge von Weizen- und Gerstenkeimlingen nach der Keimlingsinfektion mit einer Konidiensuspension des *F. graminearum* Wild Typs bzw. der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 nach 10 tägigem Wachstum. Die Balken zeigen Mittelwerte von je 300 Messungen aus 3 unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Keimlingen waren in allen Fällen signifikant ( $P < 0.05$ ). Unterschiede zwischen mit den Transformanten FgTK, FgFP und Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Keimlingen und mit dem FgWT infizierten Keimlingen (sowohl Gerste wie Weizen)

waren statistisch signifikant. Die Unterschiede in der Länge der Gerste, die mit der Transformanten FgFP infiziert wurde zur Gerste, die mit der Transformante Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurde, waren nicht signifikant. Unterschied in der Länge der Weizenpflanze, die mit der Transformante FgFP infiziert wurden zum Weizen, der mit der Transformante Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurde, waren signifikant. Unterschiede in Länge der Pflanzen (Gerste und Weizen), die mit FgTK infiziert waren zur Länger der Pflanzen (Gerste und Weizen), die mit Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurden, war nicht signifikant. Unterschied zwischen Gerste, die mit FgFP und FgTK infiziert wurde war nicht signifikant. Unterschied zwischen Weizenpflanzen, die mit FgFP und FgTK infiziert wurden, war signifikant.

### 3.6.2 Blattinfektion von Gerste und Weizen

10 Tage alte Pflanzen von Gerste und Weizen wurden im Zweiblattstadium mit einer Konidien suspension des *F. graminearum* Wild Typs sowie der Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wie im Kapitel 2.5.9.1 beschrieben. Nach 7d Wachstum wurden die Blätter hinsichtlich der Stärke der Pilzinfektion analysiert. Folgende Grade wurden für die Bewertung vergeben: 0- Die Pflanze ist gesund, 1-Die Pflanze zeigt keine typischen Läsionen an der Blattoberfläche, sieht aber nicht gesund aus, 2- Die Pflanze zeigt die typischen Läsionen an den Blättern.

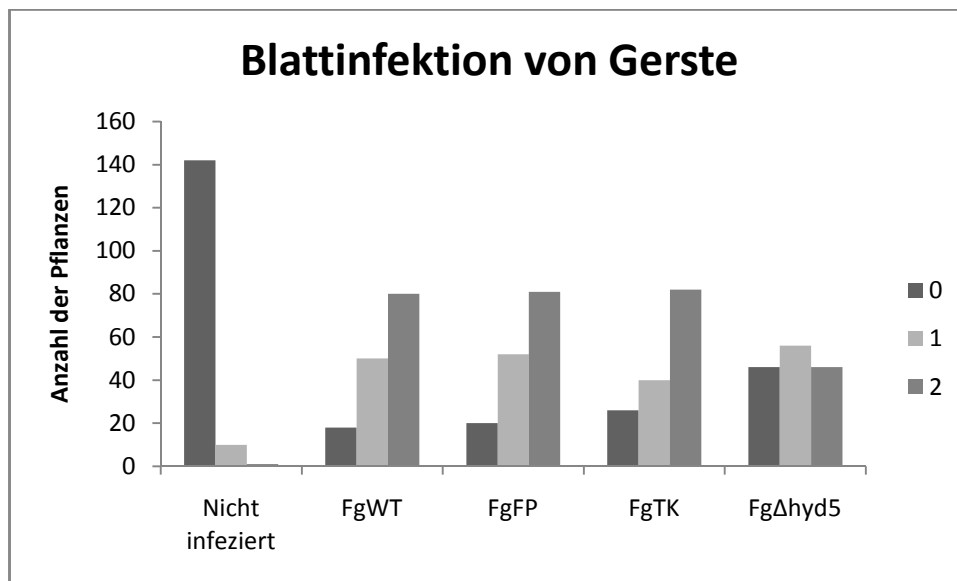


**Abb.23: Typische Läsionen an den Blättern von Gerste (A) und Weizen (B) nach Infektion mit *F. graminearum* Wild Typ.**

Es wurden drei unabhängige Experimente, jeweils mit Gerste und Weizen durchgeführt. Je 50 Pflanzen beider Getreidearten wurden mit jeder der *F. graminearum* Transformanten sowie mit dem *F. graminearum* Wild Typ infiziert. Mit sterilem Wasser behandelte Pflanzen dienten jeweils als Negativkontrollen. Für die Auswertung wurde aus den Messungsergebnissen der drei unabhängigen Experimente eine Verteilung berechnet, die in Abb.24 dargestellt ist. Die berechneten  $\chi^2$  Werte ( $X$ -squared = 34.6568,  $df = 6$ ,  $p$ -value = 5.022e-06) zeigten, dass es keine signifikanten Unterschiede im Krankheitsbild der mit FgWT infizierten Gerste und solcher Gerste gab, die mit



Transformanten FgFP und FgTK infiziert wurden. Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede im Krankheitsbild zwischen nicht infizierten Gartenpflanzen und solchen Gerstenpflanzen, die mit dem *F. graminearum* Wild Typ sowie mit den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurden. Zusätzlich gab es einen signifikanten Unterschied im Krankheitsbild zwischen Gerstenpflanzen, die mit FgWT und Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurden. Die Ergebnisse der Versuche zur Blattinfektion von Gerste sind in Abb.24 zu sehen.



**Abb.24:** Grad der Gesundheit der mit dem *F. graminearum* Wild Typ bzw. den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Gerstenpflanzen am 7. Tag nach der Infektion. 0- Die Pflanze ist gesund, 1- Die Pflanze zeigt keine typischen Läsionen an der Blattoberfläche, sieht aber nicht gesund aus, 2- Die Pflanze zeigt die typischen Läsionen an den Blättern. Es gab keinen signifikanten Unterschied im Krankheitsbild der mit FgWT infizierten Gerste und Gerste, die mit FgFP oder FgTK infiziert wurden. Der Unterschied im Krankheitsbild zwischen nicht infizierter Gerste und Gerste, die mit dem *F. graminearum* Wild Typ oder den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurden, war signifikant. Der Unterschied im Krankheitsbild zwischen Gerste die mit FgWT oder Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurde, ist signifikant.

Somit zeigten die Gerstenpflanzen, die mit der Fg $\Delta$ hyd5 Deletionsmutante infiziert waren deutlich weniger Symptome als Gerstenpflanzen, die mit anderen Transformanten oder dem *F. graminearum* Wild Typ infiziert wurden.

Die berechneten  $\chi^2$  Werte (X-squared = 98.7453, df = 6, p-value < 2.2e-16) für Weizen zeigten, dass es einen signifikanten Unterschied im Krankheitsbild zwischen nicht infizierten Weizenpflanzen und solchen Weizenpflanzen gab, die mit dem *F. graminearum* Wild Typ sowie mit den drei Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5

infiziert worden waren. Es zeigten sich signifikante Unterschiede im Krankheitsbild zwischen den FgWT zum FgFP, FgTK und FgΔhyd5, zwischen FgFP zum FgWT und FgΔhyd5, sowie ein signifikanter Unterschied zwischen FgTK zum FgWT und FgΔhyd5. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen FgRP und FgTK. Die Ergebnisse von den Versuchen zur Blattinfektion von Weizen sind in Abb.25 zu sehen.

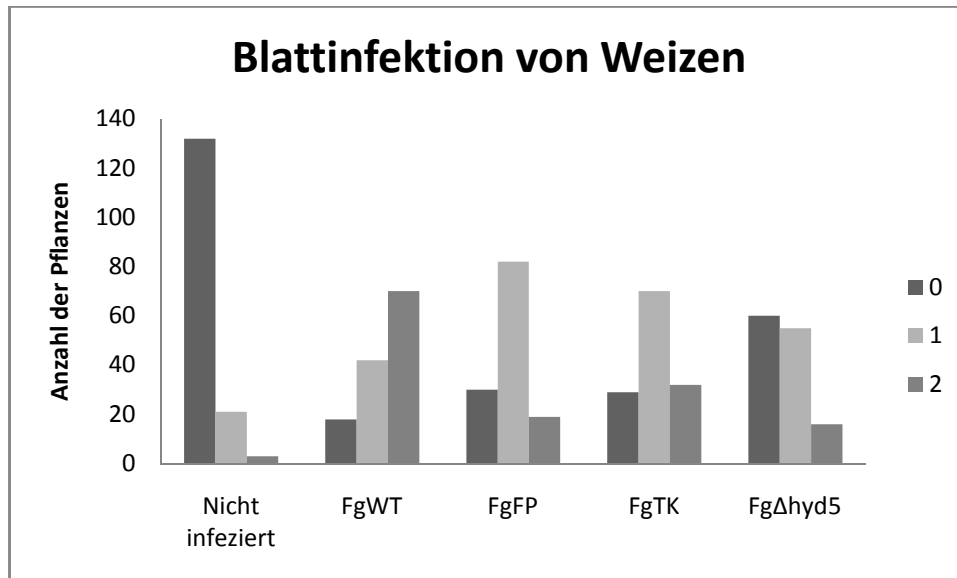


Abb.25: Grad der Gesundheit der mit dem *F. graminearum* Wild Typ bzw. den drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 infizierten Weizenpflanzen am 7. Tag nach der Infektion. 0- Die Pflanze ist gesund, 1- Die Pflanze zeigt keine typischen Läsionen an der Blattoberfläche, sieht aber nicht gesund aus, 2- Die Pflanze zeigt die typischen Läsionen an den Blättern. Es gab einen signifikanten Unterschied im Krankheitsbild zwischen nicht infizierten Weizenpflanzen und Weizenpflanzen, die mit dem *F. graminearum* Wild Typ sowie mit den drei Transformanten FgFP, FgTK und FgΔhyd5 infiziert wurden. Es gab signifikante Unterschiede im Krankheitsbild zwischen den FgWT zum FgFP, FgTK und FgΔhyd5, zwischen FgFP zum FgWT und FgΔhyd5, sowie ein signifikanter Unterschied zwischen FgTK zum FgWT und FgΔhyd5. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen FgFP und FgTK.

Somit zeigten auch die Weizenpflanzen, die mit der FgΔhyd5 Deletionsmutante infiziert waren deutlich weniger Symptome als Weizenpflanzen, die mit anderen Transformanten oder dem *F. graminearum* Wild Typ infiziert wurden. Auch die Weizenpflanzen, die mit FgFP und FgTK infiziert waren zeigten weniger Symptome als Weizenpflanzen, die mit dem *F. graminearum* Wild Typ infiziert wurden.

### 3.6.3 Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters an Tag 10 der Infektion von Gersten- und Weizenblättern

Um die Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters während der Blattinfektion zu untersuchen, wurden mit dem *F. graminearum* Wild Typ und der Transformante

Fg $\Delta$ hyd5 infizierte Gersten- und Weizenpflanzen sowie nicht infizierte Pflanzen als Kontrolle in 8  $\mu$ m dünne Stücke geschnitten (siehe Kapitel 2.5.9.3). Im Gewebe der gesunden Gersten- und Weizenpflanzen sowie in dem Gewebe derjenigen Pflanzen, die mit dem *F. graminearum* Wild Typ infiziert worden waren, konnte keine Fluoreszenz festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Fluoreszenz zeigte sich jedoch in den Gerstenblättern, die mit dem Fg $\Delta$ hyd5 Stamm infiziert worden waren, und zwar im Bereich des Parenchyms (Abb.26.2) und in den Gefäßen (Abb.26.1). Bei den Weizenblättern wurde die Fluoreszenz im Bereich der Epidermis festgestellt. Die Längsschnitte zeigten die Fluoreszenz auch im Bereich der Gefäße (Daten nicht gezeigt).

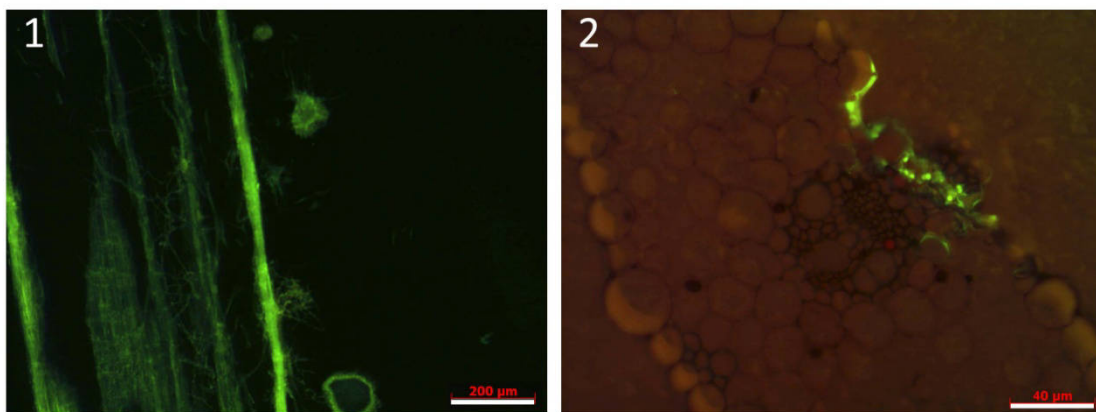


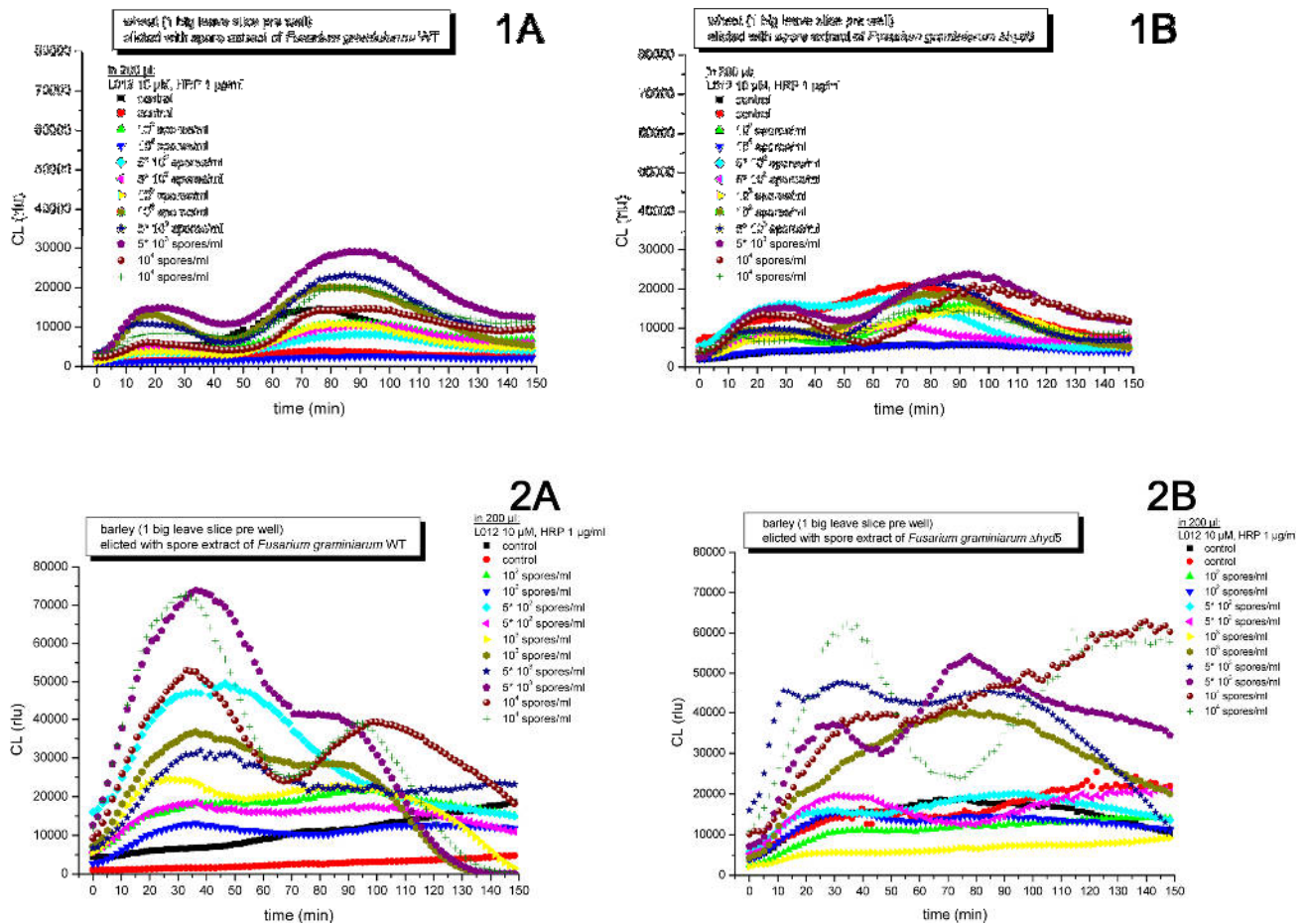
Abb.26: Fluoreszenz der Hyphen im Gewebe von Gerste, die mit der *F. graminearum* Transformante Fg $\Delta$ hyd5 infiziert wurde. 1-transverser Schnitt, der Balken stellt eine Länge von 200  $\mu$ m dar. 2- longitudinaler Schnitt, der Balken stellt eine Länge von 40  $\mu$ m dar. In Historesin eingebettete Gewebeprobe, in 8 $\mu$ m dünne Stücke geschnitten.

### 3.7 Oxydativer Stress bei Weizen und Gerste

Die erste Reaktion einer Pflanze nach der Erkennung eines Pathogens oder eines mit dem Pathogen verbundenen Elicitors ist die Bildung von Reaktiven Sauerstoff-Spezies (Dixon & Harrison 1994). Da unterschiedliche Moleküle des Pilzes als Auslöser (Elicitor) für diese Reaktion eine Rolle spielen können, wurde vermutet, dass möglicherweise auch das Hydrophobin FgHyd5p als kleines Proteinmolekül hierbei beteiligt sein könnte. Um dies zu überprüfen, wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, mit denen die Wirkung des FgHyd5p auf die Bildung von ROS untersucht wurde. Um die Wirkung von FgHyd5p im Vergleich zwischen *F. graminearum* Wild Typ und der Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 zeigen zu können, wurden diese Experimente nur mit diesen beiden Stämmen durchgeführt.

### **3.7.1 Bildung der ROS nach dem Kontakt von Weizen-bzw. Gerstebältern mit Konidienextrakten von FgWT und Fg $\Delta$ hyd5**

Um mögliche Unterschiede in der Stärke des durch den *F. graminearum* Wild Typ bzw. die *hyd5* Deletionsmutante verursachten oxidativen Stresses aufzuzeigen, wurden zwei Sporensuspensionsextraktionen durchgeführt wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Diese wurden als Auslöser für die Stressreaktion verwendet. Aus 10 Tage alten, nicht infizierten Gersten- bzw. Weizenblättern wurden 3-4 mm<sup>2</sup> große Stücke gestanzt und auf einer 96 Well-Platte für 12h bei RT in Wasser inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Wasser durch einen Reaktionsmix ersetzt (2.6) und es wurden 20 $\mu$ l des jeweils zu testenden Konidienextrakts direkt auf die Blattfragmente gegeben. Es wurden für jede Versuchsvariante je sechs Proben parallel untersucht. Nach zwei Stunden Messzeit war kein signifikanter Unterschied zwischen der durch FgWT und der durch Fg $\Delta$ hyd5 verursachten ROS-Bildung festzustellen (Daten nicht gezeigt). Es wurden auch unterschiedliche Konzentrationen der Sporen-Suspensionen (10<sup>2</sup>, 5x10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 5x10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>Konidien/ml) in Bezug auf die ROS-Bildungsreaktion getestet. Allerdings zeigten die durchgeführten Messungen keinen signifikanten Unterschied zwischen FgWT und Fg $\Delta$ hyd5 bei der ROS-Bildung (vgl. Abb.27).

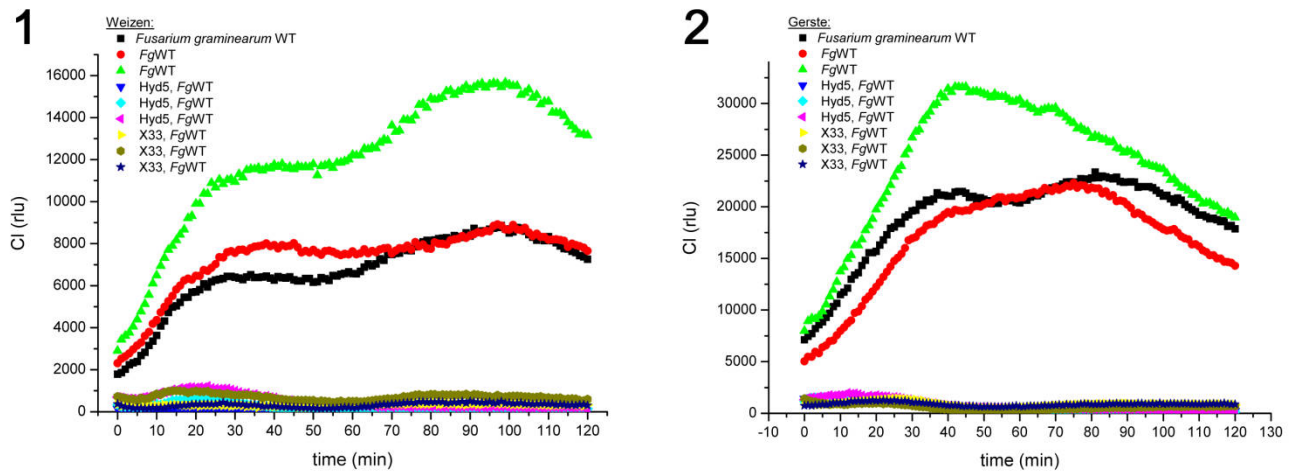


**Abb.27: Produktion der Reactive Oxygen Species ( $H_2O_2$ ), induziert durch einen Konidienextrakt in unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^2$ ,  $5 \times 10^2$ ,  $10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $10^4$  Konidien/ml) des *F. graminearum* Wild Typs (A) und der Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 (B). Sie wurde mit Hilfe des Luminol L012 Assay an Fragmenten (Durchmesser 3 mm) von Weizen- (1) und Gerstenblättern (2) untersucht. RLU = relative light units.**

### 3.7.2 Bildung der ROS nach dem Kontakt der Weizen-bzw. Gerstebblätter mit lyophilisiertem FcHyd5p

FcHyd5p ist das homologe Protein zum Hydrophobin FgHyd5p in *Fusarium culmorum*. Die Proteinsequenz des FcHyd5p ist der Proteinsequenz des FgHyd5p identisch. FcHyd5p wurde kürzlich heterolog in *P. pastoris* exprimiert (Stübner et al., 2010) und stand als gefriergetrocknete Präparation für die Untersuchungen zur Verfügung (Dank an C. Specker). Um festzustellen, ob FcHyd5p ein Auslöser von oxydativem Stress sein kann, wurde die Bildung von ROS nach Applikation auf Weizen- und Gerstenblättern untersucht. Als negative Kontrolle wurde ein Lyophilisat des Kulturüberstandes des Wild Typ Stammes X33 von *P. pastoris* verwendet (erhalten von C. Specker). Die Reaktion wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.6 beschrieben. Es konnte gezeigt werden,

dass die Zugabe des lyophilisierten Proteins FcHyd5p sowie von X33 nicht zu einer Bildung von ROS führte (vgl. Abb.28).



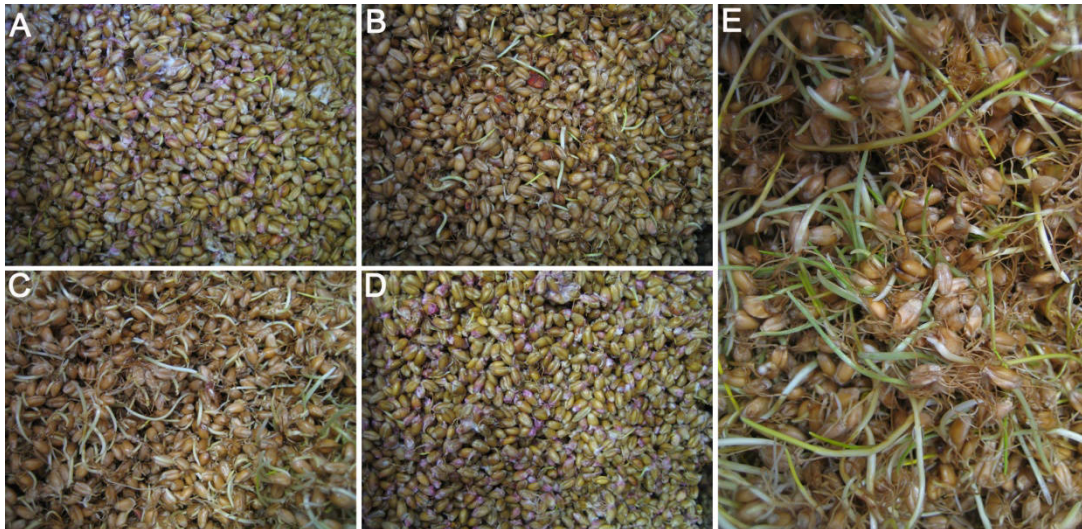
**Abb.28: Produktion der Reactive Oxygen Species ( $H_2O_2$ ), induziert durch lyophilisiertes Hydrophobin FcHyd5p und lyophilisierten Zellkulturüberstand von *P.pastoris* X33. RLU = relative light units.**

### 3.8 Gushing

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die Deletion des *hyd5* Gens eine Auswirkung auf das Auftreten von Gushing hat.

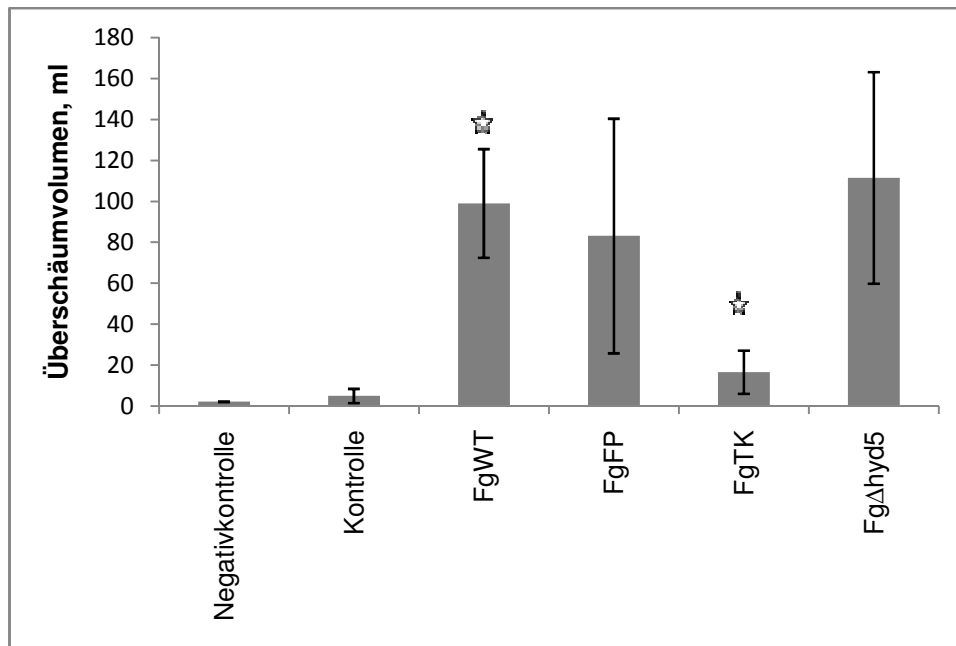
#### 3.8.1 Gushing bei Weizen-Malz

Drei parallele Mälzungsansätze für jeden der untersuchten Stämme wurden in Malzkästen mit Weizen durchgeführt. Je 600 g des Getreides wurden mit 180 ml  $5 \times 10^4$  Konidien pro ml Konidien suspension je eines der Transformanten FgTK, FgFP und Fg $\Delta$ hyd5 bzw. mit dem *F.graminearum* Wild Typ infiziert. Die Negativkontrolle wurde mit 180 ml Wasser behandelt. Das Mälzen wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben ist. Der Befall des Getreides mit *F. graminearum* war bei den verschiedenen Stämmen unterschiedlich hoch. Visuell waren die Grünmalzproben am stärksten mit FgWT befallen, danach folgten Fg $\Delta$ hyd5 und FgFP. Am wenigsten waren die Grünmalzproben mit FgTK befallen (Abb. 29)



**Abb. 29: Mit dem *F. graminearum*-Wild Typ (A), dem FgFP(B), dem FgTK (C) und dem Fg $\Delta$ hyd5 (D) infiziertes bzw. nicht infiziertes (E) Weizen-Malz nach 4 Keimtagen bei 16°C und 48% Wassergehalt.**

Das Grünmalz wurde nach dem in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Schema hergestellt. Nachdem das Malz getrocknet und gedarrt war, wurde es zu Grobschrot zermahlen und für einen modifizierten Carlsberg-Test verwendet. Dieser wurde nach MEBACK (Pfenninger 1996) durchgeführt. Als negative Kontrolle für den modifizierten Carlsberg-Test wurden unbehandelte ungeöffnete Flaschen mit karbonisiertem Wasser benutzt. Das Mälzen, das Darren und der Gushing-Test wurden für jeden Stamm dreimal unabhängig wiederholt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Überschäumvolumina des mit FgWT infizierten Malzes ( $99 \pm 26,55\text{ml}$ ), des mit Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Malzes ( $111,5 \pm 51,67\text{ml}$ ) und des mit FgFP infizierten Malzes ( $83,12 \pm 53,30\text{ml}$ ) festgestellt werden. Dagegen war das Gushing bei Verwendung des mit FgTK infizierten Malzes signifikant geringer  $16,62 \pm 10,50\text{ml}$  als bei dem Malz, das mit dem *F. graminearum*-Wild Typ infiziert worden war. Alle infizierten Malzproben wiesen signifikant mehr Gushing auf als das nicht infizierte Malz. Das als negative Kontrolle verwendete Wasser zeigte keinerlei Gushing (Abb.30).



**Abb.30:** Beeinflussung des Gushings durch Weizen-Malz, welches mit unterschiedlichen Transformanten bzw. mit dem *F.graminearum* Wild Typ infiziert wurde. Als negative Kontrolle wurden unbehandelte ungeöffnete Flaschen mit karbonisiertem Wasser verwendet sowie zur Kontrolle nicht infiziertes Weizenmalz. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 4 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilige Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Überschäumvolumen zwischen FgTK und dem *F. graminearum* Wild Typ FgWT. Die Unterschiede zwischen FgWT und FgFP sowie zwischen FgWT und FgΔhyd5 waren nicht signifikant. Unterschiede zwischen FgWT, FgFP, FgTK und FgΔhyd5 gegenüber Kontrolle und Negativkontrolle waren signifikant. Der Unterschied zwischen FgTK und FgΔhyd5 war signifikant.

### 3.8.2 Gushing bei Gerstenmalz

Die Gerste wurde dreimal in Malzkästen mit je 600g Geste gemälzt. 600 g Getreide wurden mit 180ml  $5 \times 10^4$  Konidiensuspension pro ml der *F.graminearum* Transformanten FgTK, FgFP und FgΔhyd5 und des Wild Typs infiziert. Als Kontrolle wurde Getreide vermälzt, welches mit 180 ml Wasser behandelt worden war. Das Mälzen wurde durchgeführt wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Das Malz wurde anschließend getrocknet und gedarrt. Das Grünmalz wurde nach dem in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Schema hergestellt. Nachdem das Malz gedarrt und getrocknet war, wurde es zu Grobschrot gemahlen und für einen modifizierten Carlsberg-Test benutzt. Der modifizierte Carlsberg-Test wurde nach MEBACK (Pfenninger 1996) durchgeführt. Für die negative Kontrolle für den modifizierten Carlsberg-Test wurden unbehandelte, ungeöffnete Flaschen mit karbonisiertem Wasser verwendet. Das Mälzen, das Darren und der Gushing-Test wurden für jeden Stamm und die Kontrolle dreimal unabhängig wiederholt. Beim Gushing-Test mit dem Gerstenmalz konnte kein signifikanter



Unterschied zwischen dem Gushing des mit FgWT infizierten Malzes ( $24,12 \pm 23,05 \text{ ml}$ ), dem Gushing des mit Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Malzes ( $8,5 \pm 7,66 \text{ ml}$ ) und des mit FgTK infizierten Malzes ( $26,12 \pm 24,83 \text{ ml}$ ) festgestellt werden. Das Malz, das mit der Transformante FgFP infiziert worden war, zeigte dagegen signifikant mehr Gushing ( $57,75 \pm 54,37 \text{ ml}$ ) als das Malz, das mit dem *F. graminearum*-Wild Typ infiziert worden war. Alle infizierten Malze wiesen signifikant mehr Gushing auf als nicht infiziertes Malz. Das als Negativkontrolle benutzte Wasser führte zu keinerlei Gushing (Abb.31).

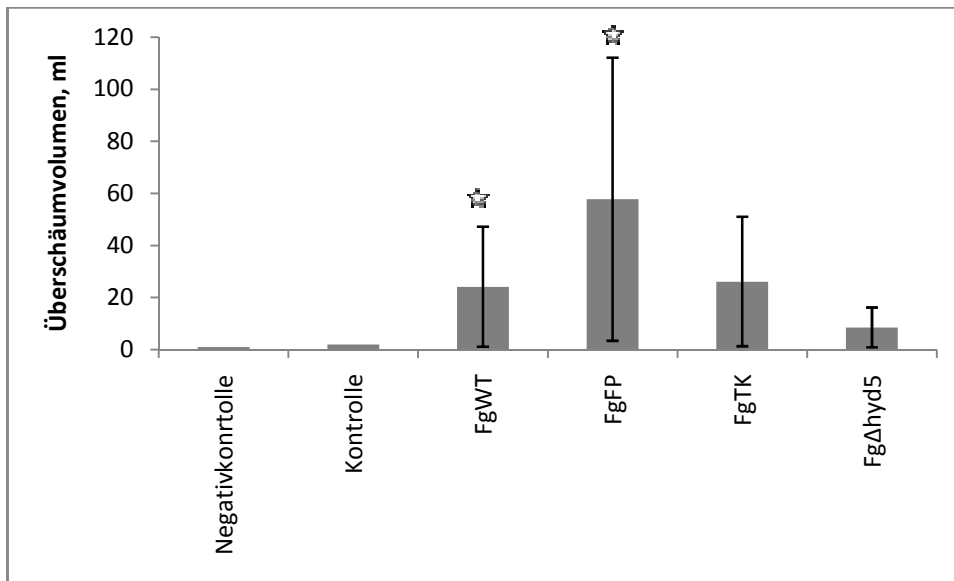


Abb.31: Beeinflussung des Gushing durch mit unterschiedlichen *F. graminearum*-Transformanten bzw. mit dem *F. graminearum* Wild Typ infiziertes Gerstenmalz. Als negative Kontrolle wurden unbehandelte ungeöffnete Flaschen mit karbonisiertem Wasser verwendet sowie nicht infiziertes Gerstenmalz. Die Balken zeigen die jeweiligen Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit je 4 Messungen. Die Fehlerbalken zeigen die jeweilig Standardabweichung. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede im Überschäumvolumen zwischen FgFP und dem *F. graminearum* Wild Typ FgWT. Die Unterschiede zwischen FgWT und FgTK sowie zwischen FgWT und Fg $\Delta$ hyd5 waren nicht signifikant. Unterschiede zwischen FgWT, FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5 gegenüber Kontrolle und Negativkontrolle waren signifikant.

### 3.9 Tabellarischer Überblick über die Unterschiede zwischen *F. graminearum* Transformanten-Stämmen und dem Wildtyp.

Tabelle 12: Überblick über die Unterschiede zwischen *F. graminearum* Transformanten-Stämmen und dem Wildtyp

Untersuchung	Stämme				
	FgWT	FgTK	FgFP	Fg $\Delta$ hyd5	
Morphologie der Kolonien und der Hyphen	FgWT		+	+	+
	FgTK	+		-	-
	FgFP	+	-		-
	Fg $\Delta$ hyd5	+	-	-	
Hyphendurchmesser	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	Fg $\Delta$ hyd5
			-	+	-

## Ergebnisse

	FgTK	-		+	-
	FgFP	+	+		+
	FgΔhyd5	-	-	+	
Biomasseproduktion	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	-	-
	FgTK	-		-	-
	FgFP	-	-		
	FgΔhyd5	-	-	-	
Hydrophobizität der Kolonieoberfläche	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	+
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		+
	FgΔhyd5	+	+	+	
Überwindung der Wasseroberflächenspannung	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	-	-
	FgTK	-		-	-
	FgFP	-	-		
	FgΔhyd5	-	-	-	
Konidienbildung	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	+
	FgTK	+		+	-
	FgFP	+	+		+
	FgΔhyd5	+	-	+	
Konidienlänge	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	+	+
	FgTK	-		+	+
	FgFP	+	+		+
	FgΔhyd5	+	+	+	
Zahl der Zellen pro Konidie	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	+	+
	FgTK	-		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	+	+	-	
Auskeimungspotenzial der Konidien	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	-	-
	FgTK	-		-	+
	FgFP	-	-		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Bildung der Perithezien	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	+	+
	FgTK	-		+	+
	FgFP	+	+		+
	FgΔhyd5	+	+	+	
Wachstum der Stämme auf Inulin*	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Wachstum der Stämme auf Raffinose*	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Wachstum der Stämme auf Salicin*	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Wachstum der Stämme auf Sucrose*		FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5

## Ergebnisse

	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Wachstum der Stämme auf Glucose*	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Wachstum der Stämme auf Glycerol*	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	-	
Wachstum der Stämme auf Natriumnitrat *	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	+	+	
Wachstum der Stämme auf Ammoniumchlorid *	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	-	-
	FgTK	-		-	-
	FgFP	-	-		-
	FgΔhyd5	-	-	-	
Wachstum der Stämme auf Ammoniumnitrat *	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	-
	FgTK	+		+	-
	FgFP	+	+		-
	FgΔhyd5	-	-	-	
Gushing bei Weizen-Malz	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	-	-
	FgTK	+		+	+
	FgFP	-	+		+
	FgΔhyd5	-	+	+	
Gushing bei Gerste-Malz	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	+	-
	FgTK	-		-	-
	FgFP	+	-		+
	FgΔhyd5	-	-	+	
Blattinfektion von Gerste	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		-	-	+
	FgTK	-		-	+
	FgFP	-	-		+
	FgΔhyd5	+	+	+	
Blattinfektion von Weizen	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	+
	FgTK	+		-	+
	FgFP	+	-		+
	FgΔhyd5	+	+	+	
Keimlinge Infektion von Gerste	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	+
	FgTK	+		-	-
	FgFP	+	-		-
	FgΔhyd5	+	-	-	
Keimlinge Infektion von Weizen	FgWT	FgWT	FgTK	FgFP	FgΔhyd5
	FgWT		+	+	+
	FgTK	+		+	-

## Ergebnisse

---

FgFP	+	+			+
FgΔhyd5	+	-	+		

**+= Signifikanter Unterschied, - = kein signifikanter Unterschied, \* = Es wurden statistische Unterschiede zwischen Transformanten nach drei Tagen Wachstum untersucht**

### **3.10 Entwicklung und Anwendung eines neuen Verfahrens zum schnellen Nachweis der spezifischen Genexpression in *F. graminearum***

Die *Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification* (RT-LAMP) ist eine relativ neue Methode, die den Nachweis von Gen-Expression in Viren und in Protozoen *in situ* ermöglicht. In dieser Arbeit wird erstmalig die Verwendung dieser Methode für den Nachweis einer spezifischen Genexpression in einem pilzlichen Organismus (*F. graminearum*) beschrieben. Der Nachweis gelang sowohl *in vivo* als auch *in planta*. Die beschriebene Methode wurde als Vorabveröffentlichung von Teilen der vorliegenden Arbeit publiziert (Minenko et al. 2014)

#### **3.10.1 Primer-Entwicklung**

Die Primer für die *Ef1 $\alpha$*  Gene wurden so auf die chromosomale Sequenz gelegt, dass die Primer Ef1-ID22-LoopF und -B3 das im Gen vorhandene Intron überbrückten (Abb.32). So wurde gewährleistet, dass nur die cDNA und keine gDNA durch die Primer erkannt wird. Als die positive Kontrolle zu den RT-LAMP und LAMP-Reaktionen wurde ein House Keeping Gen,  $\beta$ -Tubulin, gewählt, da dieses kein Intron besitzt und somit sowohl mit gDNA als auch mit cDNA eine Reaktion ergeben sollte. Die Primer aus dem Set  $\beta$ Tub-ID175 binden sich sowohl an die cDNA als auch an die gDNA (Abb.33). Die Primer wurden mithilfe des Primer Explorer V4-Software-Tools ausgewählt.

## Ergebnisse

```

CACCTTAACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACTGTGAGTACC
CACCTTAACGTCGTCGTCATCGGCCACGTCGACTCTGGCAAGTCGACCACT-----
*****
EF1-ID22-F3
ACCGCATCCCAACCCCGCCGACACTTGGCGGGGTAGTTTCAAATTTCCAATGTGCTGACA
-----

TACTTTGATAGACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCGGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCG
-----ACCGGTCACCTTGATCTACCAGTGCGGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCG
*****
EF1-ID22-FIP, - F2
AGAAGTTCGAGAAGGTTGGTCTCATTTTCCCTCGATCGCGCGCCCTTCCCTTTCGAAATA
AGAAGTTCGAGAAG-----
*****

TCATTCGAATCGCCCTCACACGACGACTCGATACGCGCCTGTTACCCCGCTCGAGGTCAA
-----

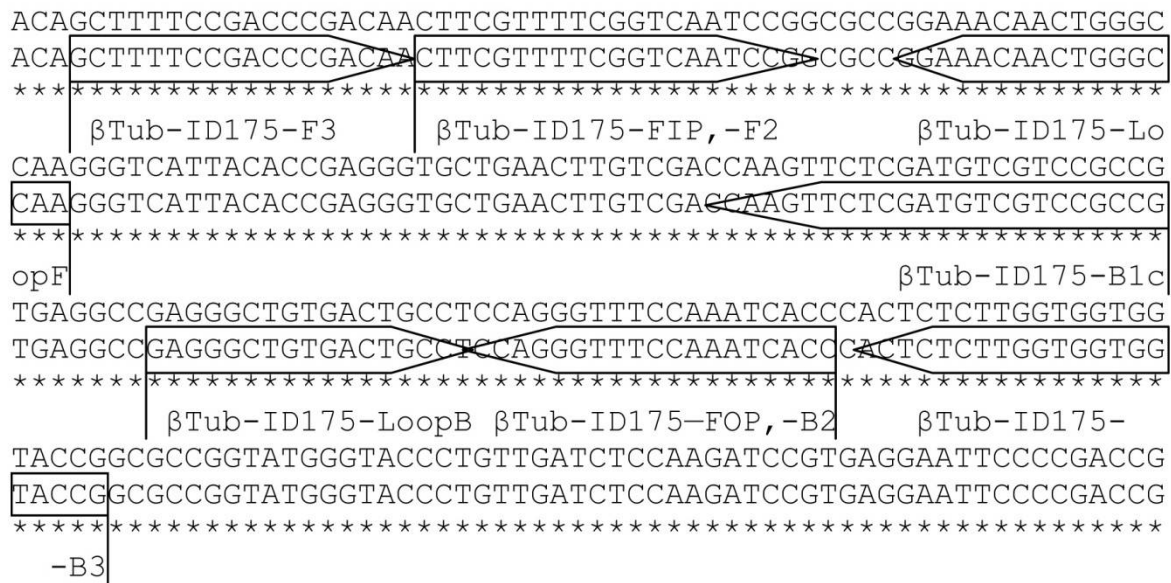
AAATTTTGCGGCTTTGTCGTAATTTTTTCCCGGTGGGGCTCATACCCCGCCACTCGAGC
-----

GACAGGCGTCTGCCCTCTTCCACAAACCATTCCCTGGGCGCTCATCATCACGTGTCAAC
-----

CAGTCACTAACCACCTGTCAATAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAC
-----GAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCCTTCAAGTAC
*****
EF1-ID22-LoopF EF1-ID22-F1c EF1-ID22
GCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCC
GCCTGGGTTCTTGACAAGCTCAAAGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATTGATATCGCC
*****
-LoopB EF1-ID22-B1c
CTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTGTCACCACTG
CTCTGGAAGTTCGAGACTCCTCGCTACTATGTCACCGTCATTG-----
*****
EF1-ID22BIP,-B2
CTGTCATCACATTCTCATACTAACATGGCTATCAGACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCAT
-----ACGCTCCCGGTCACCGTGATTTTCAT
*****
EF1-ID22-B3
CAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAG
CAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAG
*****

```

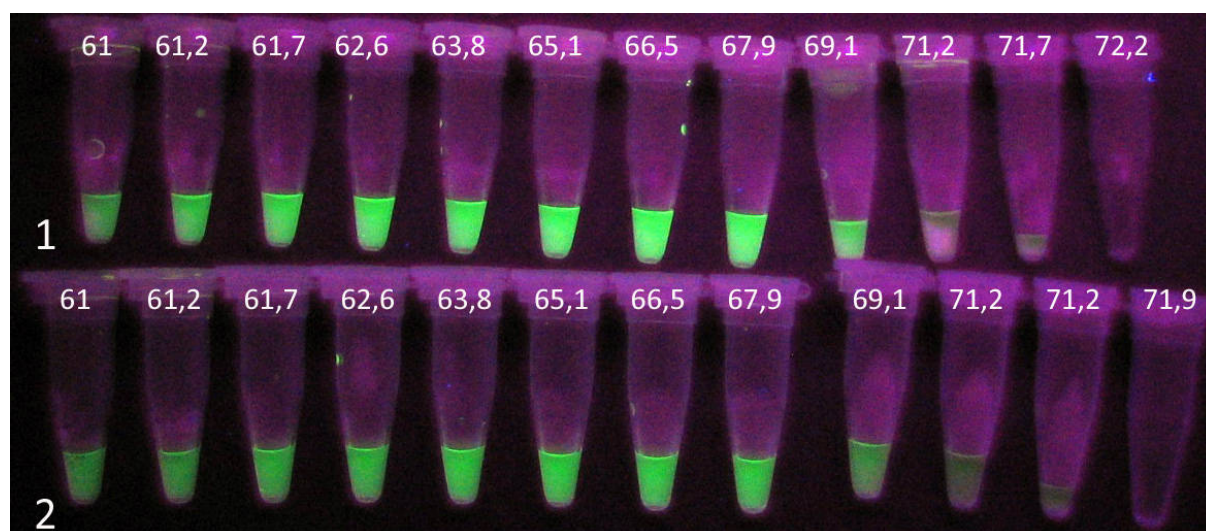
**Abb.32: Anordnung der Oligonukleotide.** Der EF1-ID22-LoopF-Primer überbrückt das Intron. Chromosomale Sequenz von *F. graminearum* (NCBI reference sequence: NT\_086558.3 nt 193949-194697) (obere Reihe) und cDNA Sequenz des *Ef1 $\alpha$* -Gens von *F. graminearum* (NCBI reference sequence: XM\_388987.1, nt 21-327) (untere Reihe). Die Pfeile illustrieren die Länge und Richtung des jeweiligen Oligonukleotids. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler- und cDNA-Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler- und cDNA-Sequenz.



**Abb.33: Anordnung der Oligonukleotide des  $\beta$ Tub-ID175 Primer Sets im der Sequenz des  $Ef1\alpha$ -Gens von *F. graminearum* Chromosom 4-(NCBI reference sequence: CM000577.1 nt 52023-52204) (obere Reihe) und Nukleotid-Sequenz des  $Ef1\alpha$ -Gens von *F. graminearum* ohne Introns (NCBI reference sequence: AY303689.1, nt 553-779) (untere Reihe). Die Pfeile illustrieren die Länge und Richtung des jeweiligen Oligonukleotids. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler- und cDNA-Sequenz. --- = Keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler- und cDNA-Sequenz.**

### 3.10.2 Überprüfung der Primer auf Kreuzreaktionen und Erkennung von gDNA, cDNA und mRNA

Zunächst wurde das Primer-Set  $\beta$ Tub-ID175 durch konventionelle LAMP auf die optimale Anlagerungstemperatur hingetestet. Für die Prüfung des  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets wurde die gDNA (100 $\mu$ g/ $\mu$ l) von *F. graminearum* TMW 4.0157 benutzt. Die LAMP-Reaktion zeigte, dass die optimale Anlagerungstemperatur für das  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set bei 68°C lag (vgl. Abb.34.2). Das Primer-Set EF1-ID22 konnte nur mit der cDNA getestet werden, weshalb diese aus dem Myzelium von *F. graminearum* TMW 4.0157 extrahiert wurde, wie es in den Kapiteln 2.3.8 und 2.3.10 beschrieben wurde. Anschließend wurde eine LAMP mit ansteigender Inkubationstemperatur durchgeführt, um die optimale Anlagerungstemperatur zu ermitteln und um sicherzustellen, dass dieses Primer-Set funktional ist. Die optimale Reaktionstemperatur für das EF1-ID22 Primer-Set lag, genau wie bei dem  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set, bei 68°C (vgl. Abb.34.1).



**Abb.34:** 1. Konventionelle LAMP-Reaktion bei ansteigender Inkubationstemperatur (°C) mit Calcein, dem  $\beta$ Tub-ID175Primer-Set und der gDNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) des *F. graminearum*-Wild Typs als Template. 2. Konventionelle LAMP-Reaktion bei ansteigender Inkubationstemperatur (°C) mit Calcein, dem EF1-ID22 Primer-Set und der cDNA (1 $\mu$ g/ $\mu$ l) des *F. graminearum*-Wild Typs als Template. Die LAMP-Reaktion wurde für 20min bei einem Temperaturgradienten zwischen 61 °C und 71,9 °C in 25  $\mu$ l Reaktionsmix durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden alle zwei Primer-Sets auf die Reaktion mit gDNA getestet. Diese konventionelle LAMP-Reaktion wurde mit 10 $\mu$ g/ $\mu$ l (Endkonzentration) gDNA von *F. graminearum* TMW 4.157 durchgeführt. Die Reaktion zeigte, dass sich das EF1-ID22 Primer-Set nicht an die gDNA binden konnte und daher in der LAMP-Reaktion zu keinem positiven Signal führte. Das  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set erzeugte dagegen unter den selben Bedingungen ein positives Signal in der LAMP-Reaktion. Zwei RT-LAMP-Reaktionen wurden mit gDNA als Template und mit beiden Primer-Sets durchgeführt. Die RT-LAMP-Reaktion mit dem  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set und der gDNA führte zu einem positiven Signal, während dagegen die gleiche Reaktion mit dem EF1-ID22 Primer-Set kein Signal lieferte (vgl. Tabelle 13). Es wurde festgestellt, dass sich in der LAMP und in der RT-LAMP die  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets an die gDNA binden, die EF1-ID22 Primer-Sets dagegen nicht.

Um die RT-LAMP für den Nachweis der mRNA der Pilze anwenden zu können, wurde die mRNA aus dem Myzelium von *F. graminearum* TMW 4.157 (gewachsen auf MM-Agar) isoliert und mit DNase (Promega GmbH; Mannheim, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Diese mRNA wurde in einer RT-LAMP-Reaktion mit den EF1-ID22 bzw.  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets eingesetzt wie in Kapitel 2.3.12 beschrieben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 68°C zeigte die RT-LAMP, dass beide Primer-Sets die mRNA erkennen und ein positives Signal bei der Reaktion ergeben. Als Kontrolle



wurden konventionelle LAMPs mit den gleichen Primer-Sets und mit der mit DNase behandelten mRNA aus *F. graminearum* TMW 4.0157 durchgeführt. Die beiden Primer-Sets waren nicht in der Lage, sich an die mRNA zu binden, weshalb keine der beiden konventionellen LAMP-Reaktionen mit der mRNA zu einem positiven Signalführte (vgl. Tabelle 13).

Um die Vorbereitung der Proben zu beschleunigen, wurde im nächsten Schritt zur RT-LAMP ein mRNA Extrakt zugesetzt, der keiner zusätzlichen DNase-Behandlung unterzogen wurde. Dabei waren die RT-LAMP-Reaktion sowie die Bedingungen identisch mit denen der oben beschriebenen Reaktion. Die RT-LAMP-Reaktion mit der nicht mit DNase vorbehandelten mRNA ergab dabei ein positives Signal mit beiden eingesetzten Primersets, d.h. sowohl mit dem Primerset  $\beta$ Tub-ID175 als auch mit dem Primerset EF1-ID22. Dabei amplifiziert das Primerset  $\beta$ Tub-ID175 wegen des fehlenden Intron-Bridging sowohl gDNA als auch cDNA Templates. Die konventionelle LAMP-Reaktion mit der unbehandelten mRNA führte dagegen zu keinem positiven Signal mit dem EF1-ID22 Primer-Set, dafür aber mit dem  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set. Unter den Bedingungen der konventionellen LAMP kommt es zu keiner Bereitstellung von cDNA templates, so dass nur von der vorhandenen gDNA amplifiziert werden kann. Dabei binden die  $\beta$ Tub-ID175 Primer an die vorhandene gDNA (vgl. Tabelle 13). Da das EF1-ID22 Primer-Set wegen des Intron-Bridging jedoch nicht an die gDNA in der Probe binden kann, erfolgt hier keine Amplifikation während der konventionellen LAMP-Reaktion. Dies zeigt, dass Primersets, die mit Intron-Bridging konstruiert wurden, selektiv cDNA templates erkennen und amplifizieren und dass vorhandene gDNA dabei von solchen Primern ignoriert wird. Auf eine aufwändige DNase Behandlung von Proben im Rahmen der Probenvorbereitung kann also bei Verwendung von Intron-Bridging Primern wie EF1-ID22 verzichtet werden. Kommen jedoch Primer in der RT-LAMP zum Einsatz, die nicht auf diese Weise konstruiert wurden, so ist eine DNase Behandlung der Proben unbedingt erforderlich, um die Amplifikation von genomischen Templates zu verhindern.

Um Zeit zu sparen, wurde der Schritt der mRNA-Isolation ausgelassen. Das Myzelium wurde zum einen direkt (ohne jegliche Behandlung,  $\sim 1\text{mm}^3$ ) und zum anderen nach einfachem Zellaufschluss (0,1 g Myzelium mit 1ml Wasser und 3-5 Glasperlen 1min lang gevorgetext) eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen blieben dabei gleich. Die RT-LAMP-Reaktionen mit den EF1-ID22 und den  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets waren positiv. Als

Kontrolle wurden auch konventionelle LAMPs mit den gleichen Primer-Sets und mit dem Myzelium des *F. graminearum* (unbehandelt sowie mit Wasser und Glasperlenbehandelt) durchgeführt. Da die Ef1-ID22-LoopF und -B3-Primer sich nicht an die gDNA binden konnten, ergab auch die konventionelle LAMP kein positives Signal. Während alle Primer des  $\beta$ Tub-ID175Sets die gDNA erkennen konnten, ergaben diese in der konventionellen LAMP ein positives Signal (vgl. Tabelle 13).

Die Überprüfung der Primer ergab, dass die EF1-ID22 Primer-Sets keine Kreuzreaktionen mit gDNA zeigten. Dieses Primer-Set bindet sich nur an isolierte cDNA oder an diejenige cDNA, die während der Reverse-Transkription-LAMP entsteht. Das als positive Kontrolle ausgewählte  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets erkannte in beiden LAMP- und RT-LAMP-Reaktionen sowohl die gDNA als auch die cDNA. Für die Durchführung der RT-LAMP-Reaktion war für die Untersuchung von Reinkulturen keine vorherige Extraktion der mRNA aus dem Myzelium von *F. graminearum* notwendig.

### **3.10.3 Überprüfung der Sensibilität der RT-LAMP im Vergleich zur konventionellen RT-PCR**

Da die RT-PCR eine weit verbreitete und gängige Methode ist und da aus der Literatur bekannt ist, dass die LAMP-Reaktion in aller Regel sensibler ist als die PCR, wurde in dieser Arbeit die Sensivität der RT-LAMP überprüft. Die mRNA wurde aus dem Myzel von *F. graminearum* TMW 4.0157 isoliert (2.3.8) und entweder für die *in vitro* cDNA-Produktion verwendet, die dann isoliert und in die RT-PCR eingesetzt wurde (2.3.10) oder direkt in die RT-LAMP eingesetzt. Für die RT-LAMP und die RT-PCR wurden folgende mRNA-Konzentrationen: 6, 3, 1,5, 0,75, 0,37, 0,18, 0,9,  $6 \times 10^{-2}$ ,  $6 \times 10^{-3}$ ,  $6 \times 10^{-4}$ ,  $6 \times 10^{-5}$  und  $6 \times 10^{-6}$  ng/Reaktion und EF1-ID22-F3/EF1-ID22-B3 Primerset für RT-PCR benutzt. Die Ergebnisse zeigten, dass die RT-LAMP tatsächlich deutlich sensibler war als die RT-PCR. So führte die RT-LAMP zu einem positiven Signal bei einer mRNA-Konzentration von  $6 \times 10^{-4}$  ng/Reaktion, während die RT-PCR nur bis 0,9 ng/Reaktion zu einem Signal führte.

## Ergebnisse

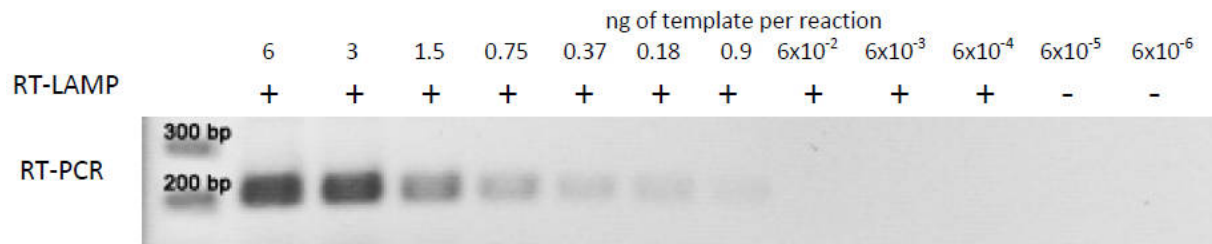


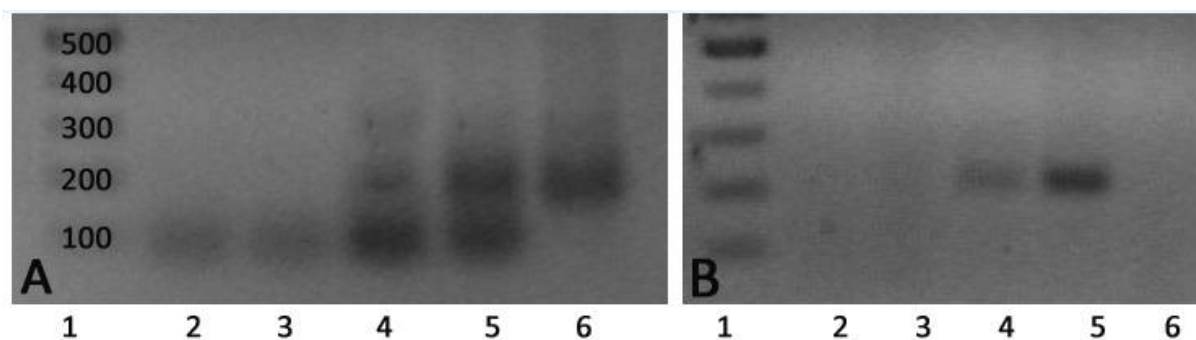
Abb.35: Vergleich der Sensitivität von RT-LAMP und RT-PCR. Als Template wurde aus dem Myzel von *F. graminearum* TMW 4.0157 isolierte mRNA bzw. daraus hergestellte cDNA verwendet. Für die RT-PCR wurden äußeren Primer EF1-ID22-F3/EF1-ID22-B3 aus dem EF1-ID22 Primerset verwendet. Theoretische Größe des PCR-Produktes = 218bp.

### 3.10.4 Untersuchung von infiziertem Pflanzenmaterial mit Hilfe der RT-LAMP

Da die RT-LAMP bei *F. graminearum* TMW4.0157 tatsächlich einen schnelleren Nachweis der Gen-Expression *in vivo* ermöglichte, wurde angenommen, dass die Methode auch für die Untersuchung von infizierten Pflanzen einsetzbar sein könnte.

Gerste und Weizen wurden daher wie in Kapitel 2.5.9.2 beschrieben mit *F. graminearum* TMW 4.0157, infiziert. Nach 10 Tagen Wachstum wurde die mRNA der kompletten infizierten Pflanzen isoliert (2.3.9) und mit DNase verdaut. Als Kontrolle wurden 10 Tage alte nicht infizierte Gerste- und Weizenpflanzen verwendet. Für die RT-LAMP-Reaktionen wurde die mit DNase behandelte mRNA sowohl aus infizierten als auch aus nicht infizierten Gerste- bzw. Weizenpflanzen verwendet (2.3.12); die Inkubationsbedingungen für die RT-LAMP Reaktionen blieben gleich: 20 min bei 68°C. Diese Untersuchung ergab, dass die RT-LAMP bei der mit DNase behandelten isolierten mRNA aus infizierten Gerste- und Weizenpflanzen mit beiden Primer-Sets (EF1-ID22 und  $\beta$ Tub-ID175) zu positiven Signalen führte. Dagegen entstand kein positives Signal während der RT-LAMP mit der mit DNase behandelten mRNA aus gesunden Gerste- und Weizenpflanzen. Folglich kann man mit Hilfe der RT-LAMP die Gen-Expression von *F. graminearum* in Gerste und Weizen nachgewiesen werden, wenn als Template isolierte, mit DNase behandelte mRNA benutzt wird. Die RT-LAMP mit isolierter mRNA ohne DNase-Behandlung führte zu denselben Reaktionsergebnissen: Die RT-LAMP mit mRNA aus infizierten Gersten- und Weizenpflanzen sowie mit beiden Primer-Sets (EF1-ID22 und  $\beta$ Tub-ID175) führte zu positiven Signalen. Dagegen entstand kein positives Signal während der RT-LAMP mit der mit DNase behandelten mRNA aus gesunden Gerste- und Weizenpflanzen. Als Kontrolle wurde die RT-LAMP mit gDNA durchgeführt, die aus infizierten und nicht-infizierten Pflanzen isoliert worden war. Die RT-LAMP mit

dem EF1-ID22 Primer-Set und mit gDNA aus infizierten und gesunden Gersten- und Weizenpflanzenergab kein positives Signal, während die RT-LAMP mit dem  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set und mit gDNA aus infizierten Weizen- und Gerstenpflanzen zu einem positiven Signal führte. Die RT-LAMP mit dem  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Set und gDNA aus gesunden Pflanzen führte in keinem Fall zu einem positiven Signal (vgl. Tabelle 13). Als positive Kontrolle wurden konventionelle LAMP-Reaktionen sowie reverse-transkription PCR mit aus infizierten und gesunden Gersten- und Weizenpflanzenhergestellter cDNA sowie mit cDNA aus *F. graminearum* Myzel durchgeführt. Die RT-PCR und die RT-LAMP führten zu denselben Ergebnissen. In gesunden Pflanzen gelang weder der Nachweis der Expression des *EF1 $\alpha$* -Gens mit Hilfe des EF1-ID22 Primer-Sets noch der des  $\beta$ Tubulins unter Verwendung des  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets. Dagegen war der Nachweis der Genexpression in infizierten Gersten- und Weizenpflanzen mit dem entwickelten System möglich (vgl. Abb.36; Tabelle 13.)



**Abb.36:** 1% Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Amplifikaten, die unter Verwendung von cDNA aus *F. graminearum* TMW 4.0157 bzw. aus mit *F. graminearum* infizierten Gersten- und Weizenpflanzen erhalten wurden. A: reverse-transkription-PCR mit den Primern EF1-ID22-F3/EF1-ID22-B3 (Größe 218bp). B: reverse-transkription-PCR mit den Primern  $\beta$ Tub-ID175-F3/ $\beta$ Tub-ID175-B3. Spur 1 Gene Ruler™ 100bp Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland). Spur 2: cDNA von nicht infiziertem Weizen. Spur 3: cDNA von nicht infizierter Gerste. Spur 4: cDNA von mit *F. graminearum* TMW 4.0157 infiziertem Weizen. Spur 5: cDNA von mit *F. graminearum* TMW 4.0157 infizierter Gerste. Spur 6: cDNA aus *F. graminearum*-Myzelium. Die Bande in Höhe von 100bp wurde von in der Reaktion nicht verwendeten Oligonukleotiden verursacht.

Um bei der Untersuchung die Probenvorbereitung zu vereinfachen, wurden Stückchen (~2mm<sup>2</sup>, jeweils von unterschiedlichen Pflanzenteilen) von infizierten und gesunden Gersten- und Weizenpflanzen direkt in den RT-LAMP Master Mix mit den Primer-Sets EF1-ID22 bzw.  $\beta$ Tub-ID175 zugegeben und 20min lang bei 68°C inkubiert. Keine der Reaktionen führte zu einem positiven Signal. Es wurde deshalb vermutet, dass bei der Reaktion nicht genügend mRNA aus den Zellen extrahiert wird. Daher wurden die

Pflanzenteile (1g) in 1ml Wasser mit 3-4 Glaskuglen 1min lang gevortext. 5µl dieses Pflanzenextrakts wurden dann während der RT-LAMP als Template zugegeben. Keine der durchgeführten Reaktionen mit infizierten oder gesunden Gersten- und Weizenpflanzen führte jedoch zu einem positiven Signal (vgl. Tabelle 13). Es war demnach nicht möglich, ohne die vorherige Isolation von mRNA aus infizierten Gersten- und Weizenpflanzen die Gen-Expression in *F. graminearum* nachzuweisen.

**Tabelle 13: Einfluss der Probenbehandlung auf die Ergebnisse der reverse-transcription-LAMP Reaktion und der konventionellen LAMP-Reaktionen mit den Primer-Sets EF1-ID22,  $\beta$ Tub-ID175 und Hyd5-ID1**

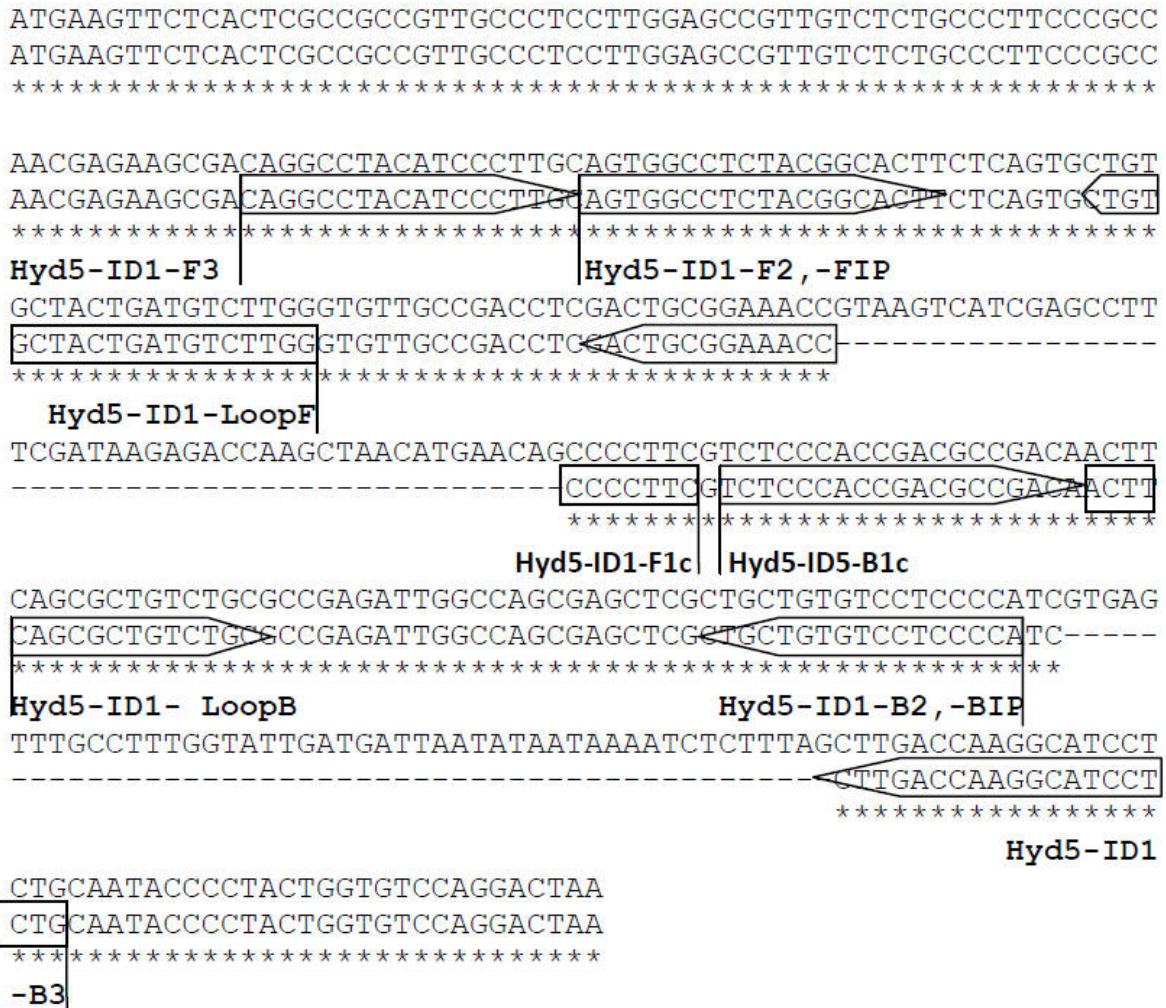
		Probenbehandlung										
		Isolierte mRNA, ohne DNase	Isolierte mRNA, DNase Behandlung	Isolierte gDNA, RNAase Behandlung	cDNA	Zugabe von unbehandelte Probe	Probe behandelt mit Glas Kugeln	Wasser statt Probe	pHyd5			
<b>RT-LAMP</b>	<b>Primer Set</b>	<b>EF1-ID22</b>	Nicht infizierte Gerste	-	-	-	-	-	-	-	/	
			Infizierte Gerste	+	+	-	+	-	-	-	/	
			Nicht infizierter Weizen	-	-	-	-	-	-	-	/	
			Infizierter Weizen	+	+	-	+	-	-	-	/	
			Myzelium	+	+	-	+	+	+	-	/	
		<b><math>\beta</math>Tub-ID175</b>	Nicht infizierte Gerste	-	-	-	-	-	-	-	/	
			Infizierte Gerste	+	+	+	+	-	-	-	/	
			Nicht infizierter Weizen	-	-	-	-	-	-	-	/	
			Infizierter Weizen	+	+	+	+	-	-	-	/	
			Myzelium	+	+	+	+	+	+	-	/	
		<b>Hyd5-ID1</b>	Nicht infizierte Gerste	-	-	-	-	-	-	-	/	
			Infizierte Gerste	+	+	-	+	-	-	-	/	
			Nicht infizierter Weizen	-	-	-	-	-	-	-	/	
			Infizierter Weizen	+	+	-	+	-	-	-	/	
			Myzelium	-	-	-	-	-	-	-	/	
	pHyd5		/	/	/	/	/	/	/	+		
	<b>LAMP</b>	<b>Primer Set</b>	<b>EF1-ID22</b>	Myzelium	-	-	-	+	-	-	-	/
				<b><math>\beta</math>Tub-ID175</b>	Myzelium	+	-	+	+	+	+	-
<b>Hyd5-ID1</b>					Myzelium	-	-	-	-	-	-	-
			pHyd5	/	/	/	/	/	/	/	+	

Mit der neu entwickelten reverse transkription LAMP war es möglich, die Genexpression in *F. graminearum* in vivo ohne vorherige mRNA Isolation direkt im Myzel nachzuweisen. Ebenso war es mit der Methode möglich, die Genexpression in *F. graminearum* auch in planta nachzuweisen. Dazu war jedoch die vorherige Extraktion von mRNA-Extraktion notwendig, die dann allerdings ohne vorheriges Umschreiben in cDNA direkt in die RT-LAMP eingesetzt werden konnte.

### **3.10.5 Anwendung der neu entwickelten RT-LAMP für den Nachweis der *hyd5* Gen-Expression**

Da es eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war, die Expression des *fghyd5*-Gens zu untersuchen, wurde die neue Methode der RT-LAMP für diesen Nachweis herangezogen. Als erstes wurde ein neues Primer-Set ausgewählt, bei dem der Hyd5-ID1-F1c-Primer das im 5'-Bereich der Gensequenz befindliche von zwei Introns überbrückte, sodass dieses Primer-Set nur die cDNA des Gens erkennen sollte und nicht seine genomische Sequenz.

## Ergebnisse



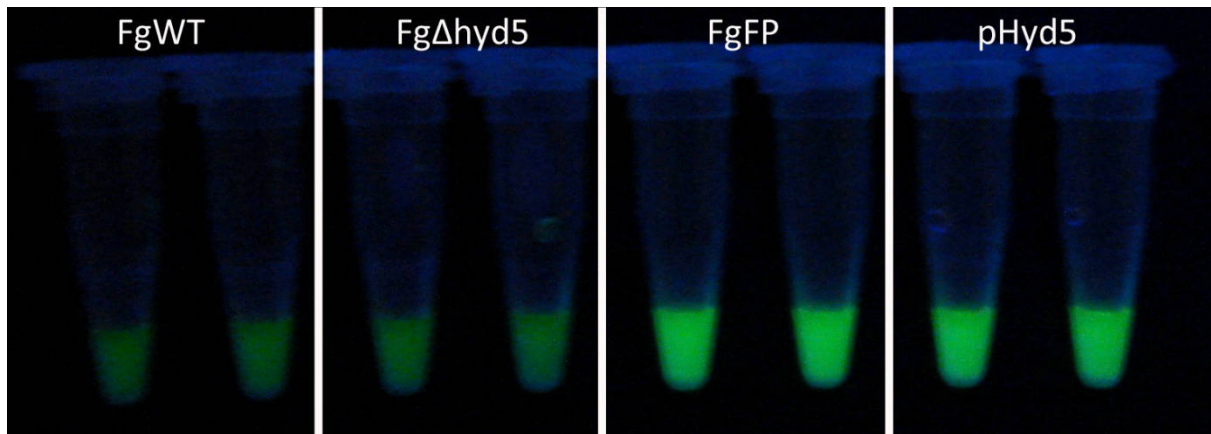
**Abb.37: Anordnung der Oligonukleotide des Hyd5-ID1-Primer-Sets. Reverse Komplement der chromosomalen Sequenz des *Fghyd5*-Gens (NCBI reference sequence: NT\_086558.3 nt14496 - 14105) (obere Reihe) und cDNA-Sequenz des *Fghyd5*-Gens (NCBI reference sequence: XP\_382007.1) (untere Reihe). Die Pfeile illustrieren die Länge und Richtung der Oligonukleotide. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler- und cDNA-Sequenz. --- = Keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler- und cDNA-Sequenz.**

Für die Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur für das Hyd5-ID1 Primer-Set, wurde eine konventionelle LAMP-Reaktion mit Calcein und gDNA (10ng/μl, Endkonzentration) aus der Transformante FgFP durchgeführt, da in diesem Klon das *hyd5*-Gen ohne Introns vorliegt (Abb.5). Die LAMP mit Calcein wurde wie bei Denschlag *et al.*(2012) beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich, dass wie bei den Primer-Sets EF1-ID22 und βTub-ID175 die optimale Inkubationstemperatur für die LAMP-Reaktion bei 68°C lag. Die Reaktion war nach 20min durch hellgrüne Fluoreszenz nachweisbar.

Die Primer wurden zuerst auf etwaige Kreuzreaktionen mit der gDNA in der konventionellen LAMP mit Calcein getestet. Die LAMP mit Calcein wurde wie bei Denschlag *et al.*(2012) beschrieben durchgeführt. Die LAMP-Reaktionen wurden mit der



gDNA aus den Transformantenstämmen FgWT, Fg $\Delta$ hyd5 und FgFP durchgeführt. Durch die LAMP-Reaktion mit der gDNA aus der Fg $\Delta$ hyd5-Transformanten werden mögliche Kreuzreaktionen mit der mRNA gezeigt, da diese Deletionsmutante keine *hyd5*-mRNA bilden kann. gDNA aus dem FgFP wurde als positive Kontrolle für die LAMP benutzt, da im Genom dieser Transformanten die *hyd5* Gen-Sequenz ohne Introns vorliegt. Die LAMP-Reaktionen mit gDNA aus dem Stamm FgWT und Fg $\Delta$ hyd5 führten zu keinen positiven Signalen.



**Abb.38:** Konventionelle LAMP-Reaktion mit Calcein, dem Hyd5-ID1 Primer-Set und gDNA aus dem *F. graminearum* Wild Typ Stamm TMW 4.0157 (FgWT), den Transformanten Fg $\Delta$ hyd5 und FgFP sowie mit dem Vektor pHyd5 (10 $\mu$ g/ $\mu$ l) als Template. Die LAMP-Reaktion wurde 25min lang bei 68°C in 25  $\mu$ l des Reaktionsmixes inkubiert. Die stärkste Fluoreszenz und somit g/cDNA-Amplifikation wurde bei den Reaktionen mit dem FgFP und dem pHyd5 beobachtet.

In Kapitel 3.4 wurde gezeigt, dass im Myzelium von *F. graminearum* nach Wachstum auf komplexen und definierten Medien kein Hydrophobin FgHyd5p gebildet wurde. Dies wurde mittels RT-LAMP überprüft (vgl. Tabelle 13). Tatsächlich führte die RT-LAMP mit dem Myzelium (1mm<sup>2</sup>, drei Tage lang auf MM-Agar gewachsen) als Template und mit dem Hyd5-ID1 Primer-Set zu keinem positiven Signal. Als positive Kontrolle wurden die EF1-ID22 und  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets verwendet. Die Reaktionen mit EF1-ID22 bzw.  $\beta$ Tub-ID175 und Myzelium als Template führten zu positiven Signalen. Es wurden auch RT-LAMP mit isolierter und anschließend mit DNase verdauter mRNA bzw. mit unbehandelter mRNA aus auf ME-Agar gewachsenem *F. graminearum*-Wild Typ-Myzelium als Template mit dem Hyd5-ID1 Primer-Set durchgeführt. Diese RT-LAMP-Reaktionen führten jedoch zu keinem positiven Signal. Als positive Kontrolle wurden wiederum die RT-LAMP Reaktionen mit den gleichen Templates auch mit den EF1-ID22 und  $\beta$ Tub-ID175 Primer-Sets unter denselben Reaktionsbedingungen durchgeführt. Alle Kontrollreaktionen führten zu positiven Signalen (vgl. Tabelle 13). Als negative

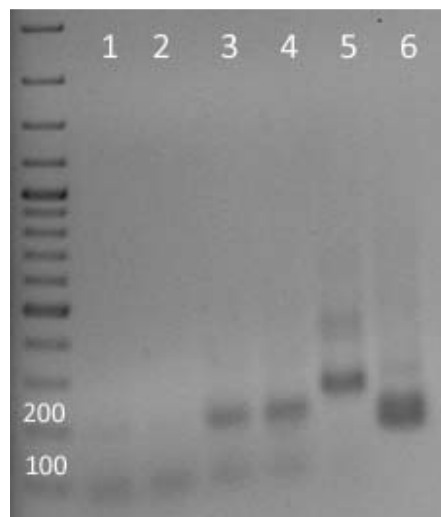
Kontrolle wurden RT-LAMP mit isolierter und mit DNase verdauter mRNA sowie mit un behandelter mRNA aus der Transformanten Fg $\Delta$ hyd5 durchgeführt. Diese Transformante ist eine *hyd5*-Gen Deletionsmutante und produziert somit keine *hyd5*-mRNA. Die Wachstumsbedingungen für diese Transformante waren identisch mit denjenigen des *F. graminearum* Wild Typ Stammes. Weder die RT-LAMP Reaktionen mit dem Hyd5-ID1 Primer-Set noch die mit der von der DNase verdauten mRNA noch die Reaktion mit der un behandelten mRNA aus der Transformante Fg $\Delta$ hyd5 ergaben hier ein positives Signal. Somit wurde bestätigt, dass im Myzelium, das auf komplexen Medien wächst, keine *hyd5*-mRNA exprimiert wird.

Mit Hilfe des Reporterstammes Fg $\Delta$ hyd5 konnte im vorhergehenden Kapitel (3.6.3) gezeigt werden, dass während der Infektion durch *F. graminearum* der für die Expression des Fg $\Delta$ hyd5-Gens zuständige Promoter aktiviert wird, was im Wild Typ des Pilzes eine Bildung des HydrophobinsFgHyd5p zur Folge hat. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls durch eine RT-LAMP überprüft. Da die RT-LAMP mit direkter Zugabe von infiziertem Pflanzenmaterial nicht funktioniert hatte (vgl. Kapitel 3.10.4, Tabelle 13), wurde zuerst mRNA aus mit dem *F. graminearum* Wild Typ FgWT oder mit dem Fg $\Delta$ hyd5 Stamm infizierten Gersten- oder Weizenpflanzen isoliert (2.5.9.2 und 2.3.9). Diese mRNA wurde in RT-LAMP-Reaktionen mit den Primer-Sets EF1-ID22,  $\beta$ Tub-ID175 undHyd5-ID1 getestet. Die RT-LAMP-Reaktionen mit allen drei Primer-Sets zeigten jeweils immer dann positive Signale, wenn mit dem FgWT-Stamm infizierte Gersten- und Weizenpflanzen getestet wurden. Dagegen gab es in der Reaktion mit dem Hyd5-ID1-Primer kein positives Signal bei Gerste und Weizen, wenn diese mit dem Fg $\Delta$ hyd5 infiziert waren. Gesunde Gersten- und Weizenpflanzen zeigten in keiner der Reaktionen ein positives Signal (vgl. Tabelle 14).

**Tabelle 14: Ergebnisse der RT-LAMP Reaktionen mit mRNA aus mit dem *F. graminearum* Wild Typ FgWT bzw. Fg $\Delta$ hyd5-Stamm infizierten sowie aus gesunden Gersten- (G) und Weizenpflanzen (W).**

	RT-LAMP					
	G-FgWT	G-Fg $\Delta$ hyd5	G-Gesund	W-FgWT	W-Fg $\Delta$ hyd5	W-Gesund
Hyd5-ID1	+	-	-	+	-	-
EF1-ID22	+	+	-	+	+	-
$\beta$ Tub-ID175	+	+	-	+	+	-

Als Kontrolle wurde eine klassische Reverse-transkription-PCR mit den Primern Hyd5-ID1-F3 und Hyd5-ID1-B3 durchgeführt. Als Template wurde cDNA aus *F. graminearum* TMW 4.0157 bzw. aus mit *F. graminearum* infizierten Gersten- und Weizenpflanzen verwendet. Als positive Kontrolle wurde Vektor-DNA pHyd5 (enthält *hyd5*-Sequenz ohne Introns) benutzt. Dank dieser RT-PCR wurde bestätigt, dass das *hyd5*-Gen in infizierten Gerste und Weizen exprimiert wird. Die RT-PCR ergab ein negatives Signal in der Reaktion mit cDNA aus gesunden Gersten- und Weizenpflanzen und ein positives Signal in den Reaktionen mit cDNA aus infizierten Gersten- und Weizenpflanzen. Auch mit gDNA von *F. graminearum* TMW 4.0157 und der Vektor DNA pHyd5 wurde ein positives Signal in dieser RT-PCR erhalten, da die Primer ID1-F3 und Hyd5-ID1-B3 kein Intron-Bridging enthalten (vgl. Abb.39)

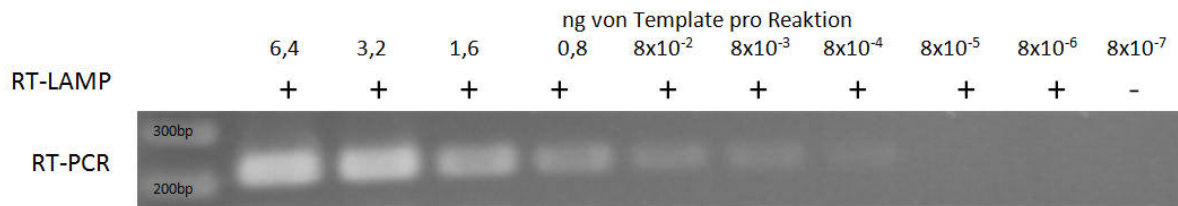


**Abb.39:** 1% Agarose-Gel mit aufgetragenen PCR-Amplifikaten, die unter Verwendung von cDNA aus *F. graminearum* TMW 4.0157 bzw. aus mit *F. graminearum* infizierten Gersten- und Weizenpflanzen erhalten wurden. Reverse-transkription-PCR mit den Primern Hyd5-ID1-F3 und Hyd5-ID1-B3 (theoretische Größe = 197bp). Ladder: Gene Ruler™ 100bp Plus DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc., Schwerte, Deutschland). Folgende Templates wurden verwendet. Spur 1: cDNA von nicht infiziertem Weizen. Spur 2: cDNA von nicht infizierter Gerste. Spur 3: cDNA von mit *F. graminearum* TMW 4.0157 infiziertem Weizen. Spur 4: cDNA von mit *F. graminearum* TMW 4.0157 infizierter Gerste. Spur 5: gDNA aus Myzel von *F. graminearum* TMW 4.0157 (theoretische Größe = 292pb). Spur 6: DNA von pHyd5 Vektor (enthält *hyd5*-Sequenz ohne Introns).

Die Sensitivität der RT-LAMP mit dem Hyd5-ID1 Primerset wurde im Vergleich zur konventionellen RT-PCR überprüft. Die mRNA wurde aus mit *F. graminearum* TMW 4.0157 infizierter Gerste isoliert (2.3.9) und entweder für die *in vitro* cDNA-Produktion verwendet, die dann isoliert und in die RT-PCR eingesetzt wurde (2.3.10) oder direkt in die RT-LAMP eingesetzt. Für die RT-LAMP und die RT-PCR wurden folgende mRNA-Konzentrationen benutzt: 6,4; 3,2; 1,6; 0,8;  $8 \times 10^{-2}$ ;  $8 \times 10^{-3}$ ;  $8 \times 10^{-4}$ ;  $8 \times 10^{-5}$ ;  $8 \times 10^{-6}$  ng/Reaktion. Die Ergebnisse zeigten, dass die RT-LAMP tatsächlich deutlich sensibler

## Ergebnisse

war als die RT-PCR. So führte die RT-LAMP zu einem positiven Signal bei einer mRNA-Konzentration von  $8 \times 10^{-6}$  ng/Reaktion, während die RT-PCR nur bis  $8 \times 10^{-4}$  ng/Reaktion zu einem Signal führte.



**Abb.40: Vergleich der Sensitivität von RT-LAMP und RT-PCR während der Nutzung des Hyd5-ID1 Primersets. Für RT-PCR wurden die Primer Hyd5-ID1-F3 und Hyd5-ID1-B3 benutzt. Als Templates wurde mRNA aus mit *F. graminearum* TMW 4.0157 infizierter Gerste verwendet.**

Die Ergebnisse zeigen, dass das *hyd5*-Gen tatsächlich im Verlauf der Infektion von Gerste und Weizen und nicht in dem auf komplexen Medien wachsenden Myzelium exprimiert wird. Des Weiteren ist festzustellen, dass die reverse transkription LAMP zum Nachweis der Genexpression von *F. graminearum* *in vivo* und *in planta* verwendet werden kann.

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Klasse II Hydrophobins FgHyd5p auf die Morphologie, das Wachstum und die Virulenz von *F. graminearum* untersucht.

Mit Hilfe von drei Transformantentypen, unter anderem auch einer *hyd5*-Gen-Deletionsmutanten und eines sGFP-Reporter-Stammes, wurden Hinweise darauf gefunden, dass FgHyd5p verschiedene Funktionen im Lebenszyklus von *F. graminearum* haben könnte. Im Rahmen der Arbeiten konnte weder einen Einfluss von FgHyd5p auf die Kolonie-Morphologie noch auf die Hyphen-Morphologie oder Biomasse-Produktion von *F. graminearum* festgestellt werden. Demgegenüber scheint es jedoch die Hydrophobizität der Hyphen positiv zu beeinflussen. Die in der vorliegenden Arbeit aus dem Vergleich von *hyd5*-Deletionsmutante und Wildtyp erhaltenen Daten lassen den Schluss zu, dass die Fähigkeit zur Bildung des Hydrophobins FgHyd5p mit einer größeren durchschnittlichen Sporenlänge und einer höheren Zellzahl pro Sporepositiv korreliert ist. Dies würde auch den beobachteten Anstieg der Sporenzahl in der Deletionmutante erklären, die auf diese Weise die beobachtete Verringerung der Zellzahl pro Konidie ausgleichen könnte. Die Keimfähigkeit der Sporen blieb durch den Knockout des Gens unbeeinflusst. Die Hypothese, nach der FgHyd5p in den ruhenden und auskeimenden Sporen produziert wird, wurde durch die vorliegenden Ergebnisse nicht gestützt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Kohlen- und Stickstoffquellendie Produktion von FgHyd5p offenbar nicht beeinflussen. Ebenso hatte der pH-Wert weder einen stimulierenden noch hemmenden Einfluss auf die FgHyd5p-Produktion. Die durch Infektionsversuche an Gerste und Weizen erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass FgHyd5p eine mögliche Rolle als Virulenzfaktor von *F. graminearum* spielt, der zusammen mit anderen Faktoren die Pathogenität des Pilzes bestimmt. Die hier erhaltenen Ergebnisse zur GFP-Induktion bei Wachstum der Deletionsmutante auf hydrophoben Oberflächen lassen dabei vermuten, dass FgHyd5p eine Funktion bei der Anheftung der Hyphen an wasserabweisende Oberflächen haben könnte. Da auch die Oberfläche von Getreideblättern hydrophob ist, wäre hier ein Zusammenhang mit dem Infektionsmechanismus von *F. graminearum* naheliegend.

#### **4.1 Entwicklung von Transformanten für die Untersuchung der Rolle des *hyd5* Gens in *F. graminearum***

Die Mutationsanalyse der vorhergesagten Gene mittels gezielter Mutagenese ist in filamentösen Pilzen dennoch schwieriger als z.B. bei der *S. cerevisiae* (Michielse et al. 2005). Für eine gezielte Mutagenese in Pilzen benötigt man „gene disruption cassettes“, die sehr lange (bis zu 1000bp) Regionen enthalten, die die homologe DNA flankieren, damit eine Integration durch doppeltes *cross over* gelingen kann (Michielse et al. 2005). Solche langen Konstrukte führen nur in 0,5-30% der Fälle zu einer homologen Rekombination (Asch & Kinsey 1990; Hynes 1996). In dieser Arbeit wurden für die gezielte homologe Transformation jeweils die als Promoter-Region und Terminator-Region bezeichneten flankierenden Regionen ausgewählt. Bis heute ist die genaue Länge und Lokalisation des *hyd5*-Promoters im Genom von *F. graminearum* nicht bekannt. Kumar et al. (2010) konnten zeigen, dass in den von ihnen untersuchten Pilzgenomen 73 verschiedene als „conserved elements“ bezeichnete Sequenzen in Promoterbereichen gefunden werden können. Die Autoren berechneten, dass solche Elemente in einer Entfernung von bis zu 600 bp vor dem Start-Codon liegen können (Kumar et al. 2010). Für die vorliegende Arbeit wurde ein Bereich von 900 bp vor der *hyd5*-Gen Sequenz in *F. graminearum* auf die Anwesenheit solcher konservierten Elemente untersucht. In diesem Bereich wurden 15 solcher Elemente gefunden (siehe Abb.41), weshalb als Promoter-Region für die homologe Rekombination in *F. graminearum* ein Bereich von 879 bp upstream der kodierenden *hyd5*-Gensequenz gewählt wurde. Als Terminatorbereich wurde ein Bereich von 1026 bp Downstream des *hyd5*-Gens gewählt. Durch diese relativ großen Promoter- und Terminatorbereiche wurde sichergestellt, dass die *Fusarium*-Transformation zielgerichtet und homolog sein würde.

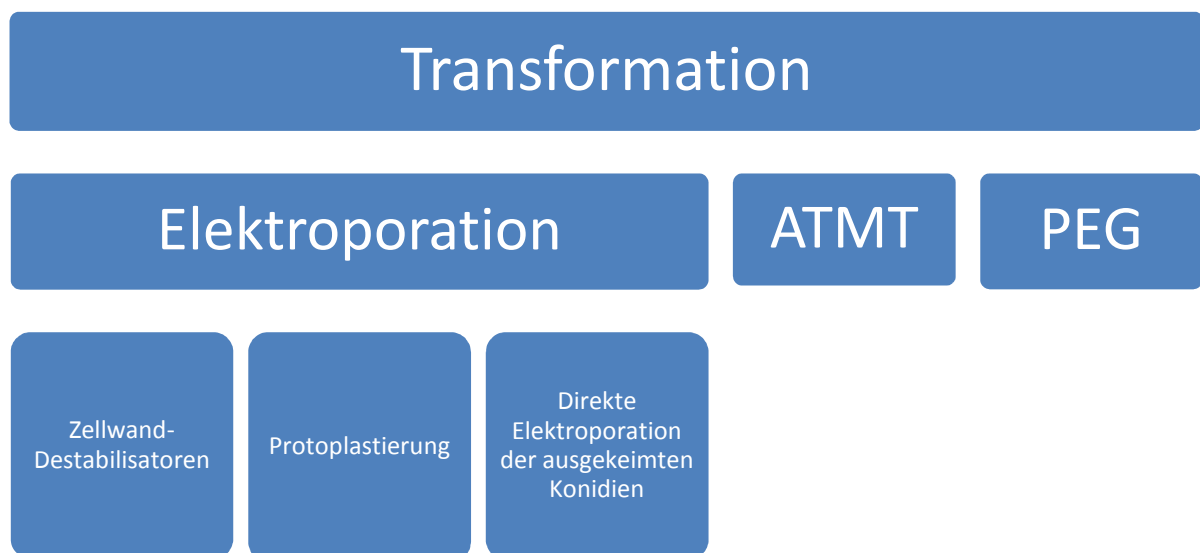
TTCATGGAATCTTCGCAAGAGTACCCATAAGGAGATTTTCTTGATTCTGGGGCATTGGATC**CATGA**TCAGCGAT  
AAGCGACCTCGCGAAAATCATGATATAGAGTCAAGTTGCCCTGTACGGAAGGATTAGTCCGCACCTTTAAGACA  
GCCACTTACATCTTTTCTCAACAAATAACTTAGTGTCTGGGGTTGGAACAAGTAATCTGCAGGTACAGTGTGAT  
GTATGGATAGGCTCAGATGAGCTGAGAGACAAGCAGAAACAGGAACAAAGCGGACATCCCGGGACGATATT  
ATGACGATCAAGCAGTACCTTTTCAGCGAATCAACCAACTCAATGTGACATTCCAGCAAACAATGACATCGGCC  
CAGCAGCAGCAGTCCCAAATTAGTCCTTAACAAAGTCCACTA**TAATTG**GATGAAACGT**CGACAGCT**CATATAAC  
TTGCTGTGGCGATTTTCGGCAGTCTGGCATCCCTTTTCAGCGATAC**CTCCGACGACC**CAAC**CAATTA**AAAGGTTCA  
ATTAGCTTGATCGTTCGAAACGCGTTAAT**GCGTTGCTAT****CCCTGT****TCCGGCTGG**CGTACCTCGTTGTT**GCGACG**  
**CTACAACAGTTTTCGAGGCTCCATTTAAGCTGCGATATAGACCGGGATGGTAGGTTTCAAAA****CGTCAA**CGGCT  
TTAACATGATTTCTA**TCATTG**TTGAGTGGCAATAGG**TCATTG**GAGAGATGACGACAAGAAATTGCTTATGCTCAT  
CTTATT**AAAAA**TGGACTTGTGTG**GACGGCG**GAGTTGTATAAATACAGAGGCGTTGTGACCGGAAATCACTTTTG  
AAATCCTCATTACATCCTCAAAGCACATCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCCTAAACCAATCACTCTAT  
TCAT**ATG**

**Abb.41: Vorhergesagter Promoterbereich für das *hyd5* Gen in *F. graminearum*. Die konservierten Bereiche sind gelb markiert. **ATG** = Startkodon für den kodierenden Bereich.**

In allen drei genetischen Konstrukten wurde der Hyd5 Terminator hinter der Hygromycinresistenzkassette inklusive Ttrpc Terminator kloniert um eine homologe Rekombination zu ermöglichen. Obwohl die HygB-Resistenzkassette eine Länge von 3,9Kbp aufweist (Covert et al. 2001), wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf einen zusätzlichen Terminator hinter dem *hyd5-sgfp* Leserahmen verzichtet, um die das T-DNA Konstrukt so klein wie möglich zu halten. Nach Gelvin (2003) hat die Größe von T-DNA Konstrukten einen deutlichen Einfluss auf die resultierende Transformationsrate, wo diese mit steigender Konstruktgröße abnimmt. Mehrere andere Autoren verzichteten ebenfalls auf Terminatoren in unmittelbarer Umgebung der Leserahmen. So verzichteten Schmid-Heydt et al. (2009) analog zu der vorliegenden Arbeit auf einen Terminator unmittelbar hinter dem *zsgfp*-Leseramen auf den in dem genannten Produkt ebenfalls unmittelbar der Leserahmen für das *hygB*-Gen folgt. Abwesenheit eines speziellen sGFP-Terminators sowie das Vorliegen einer mehrere Tausend Basenpaare langen HygB-Resistenzkassette hinter dem *sgfp* Gens hatte in diesem Falle keinen Einfluss auf die Expression von sGFP in *Penicillium nordicum* (Schmid-Heydt et al. 2009). Freitag et al. (2001) untersuchte in seinen Arbeiten explizit die Frage, ob die Ab- oder Anwesenheit des *nos*-Terminators direkt nach dem *egfp*-Gen einen Einfluss auf die *egfp* Expression hat. Es konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit des *nos*-Terminators die Expression des *egfp* in *Neurospora crassa* nicht beeinflusst.

In allen drei genetischen Konstrukten sollte ein Fluoreszenz-Protein integriert werden. Heutzutage ist das GFP (*green fluorescent protein*) das bekannteste Fluoreszenz-Protein. Es wurde 1992 durch Prasher et al. aus cDNA geklont (Prasher et al. 1992). Der Wild-Typ des GFP Proteins aus der Qualle *Aequora victoria* führt in vielen Pilzen zu keiner messbaren Fluoreszenz, da das Gen nichteffizient translatiert wird (Cormack 1998; Fernández-Abalos et al. 1998). Deswegen wurde ein sGFP mit optimierter „Codon Usage“ für Hefe (Cormack et al. 1997) und filamentöse Pilze entwickelt (Cormack 1998). Diese Sequenz wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit für die Entwicklung der Reporter-Stämme ausgewählt.

Für die Entwicklung der *Fusarium*-Transformanten sind nicht nur homologe flankierende Regionen und die richtigen GFP-Sequenzen wichtig, sondern auch ein stabiles und effizientes Transformationssystem. Für die genetische Transformation von Pilzen sind, wie in Abb.42 schematisch dargestellt, mehrere Systeme bekannt. Es existieren drei Richtungen bei der Pilz-Transformation: die ATMT (de Groot et al. 1998; Bundock & Hooykaas 1996), die PEG-Transformation (Maier et al. 2005) und die Elektroporation (Richey et al. 1989). Die Elektroporation kann wiederum in drei Sub-Methoden einteilt werden, die sich hinsichtlich des Transformationsziels unterscheiden. Entweder werden nach der Destabilisierung der Zellwand die Zellen elektroporiert (Ruiz-Díez 2002), oder es werden Protoplasten oder keimende Sporenelektroporiert (Richey et al. 1989; Sanchez & Aguirre 1996).



**Abb.42: Pilz-Transformationsmethoden.**



Alle drei Methoden wurden in dieser Arbeit für die Transformation des *F. graminearum* Stammes TMW 4.0157 (CBS 136009) angewendet. Dagegen war der Verwendung der Stämme TMW 4.0154, TMW 4.0148 und TMW 4.0133 mit keiner der Methoden erfolgreich. Es wurde auch nicht mit dem Genom-sequenzierten Stamm *F. graminearum* PH1 gearbeitet, da er in vorherigen Untersuchungen eine deutliche Hygromycin B Resistenz gezeigt hatte (L. Niessen, pers. Komm.). Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche war lediglich die *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated-Transformation mit extrem niedrigen Transformationsraten und nur bei dem Stamm TMW 4.0157 erfolgreich. Für die niedrigen Transformationsraten während der ATMT können verschiedene mögliche Gründe genannt werden. So weist jeder Pilzstamm insofern eigene Besonderheiten auf, als er ein bestimmtes Transformationsmaterial bevorzugt. Bei manchen Pilzstämmen erhält man mehr Transformanten, wenn die Protoplasten transformiert werden, bei anderen Stämmen dagegen muss man dafür die intakten Zellen transformieren. Das Alter der Kultur, die AS-Konzentration sowie die Co-Kultivationsbedingungen spielen ebenfalls eine Rolle (Michielse et al. 2005). Außerdem beeinflusst die Größe des Plasmids und des Inserts die Transformationsrate. Es ist möglich, ein Insert mit einer Größe zwischen 40 und 200 kb in der Pflanze mittels ATMT zu transformieren, dabei ist aber wichtig, dass die *vir*-Gene überexprimiert werden (Gelvin 2003). Vermutlich haben zu den niedrigen Transformationsraten bei der durchgeführten *F. graminearum*-Transformation mehrere der oben beschriebenen Gründe beigetragen, die nur im Zusammenspiel diese Wirkung erzielt haben.

Im Verlauf der hier durchgeführten ATMT entstanden vier FgFP-, sieben FgTK- und eine Fg $\Delta$ hyd5-Transformante. Leider konnte nach mehreren Versuchen nur eine Fg $\Delta$ hyd5-Transformante hergestellt werden. Deswegen war es nicht möglich, eine zweite unabhängige Transformante zu untersuchen, um mögliche spontan auftretende Phänotypen auszuschließen. Da für die *Fusarium* Transformation zwei sehr große homologe Sequenzen benutzt wurden, ist davon auszugehen, dass die T-DNA mittels homologer Rekombination zwischen Promoter und Terminator Bereich des *hyd5* Gens aufgenommen wurde. Da die ATMT eine viel höhere Rate der Integration von einzelnen Kopien der T-DNA in die Chromosomen der Pilze zeigt (Fanga et al. 2004; Permyakova et al. 2009; Zhong et al. 2007) und die PCR-Analyse mittels Transfer-DNA flankierenden Primern gezeigt haben, dass das Insert in der richtigen Position inseriert war, wurde auf weitere Untersuchungen, wie Southern Blot oder qPCR, verzichtet. Daher kann trotz der

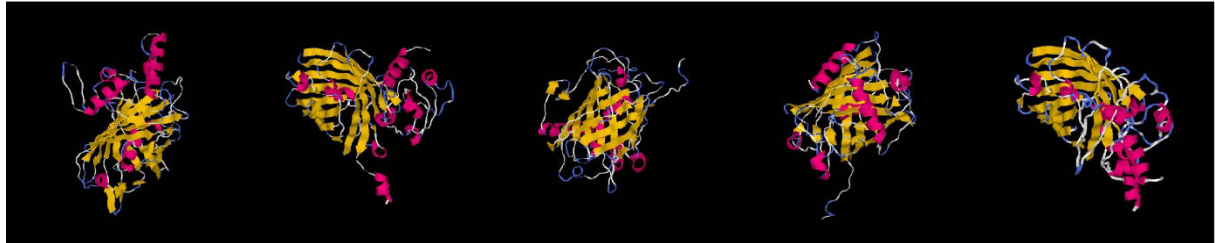
vorliegenden PCR-Ergebnisse das Vorhandensein einer zusätzlichen ektopischen Insertion der T-DNA im Genom der untersuchten Transformante nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde je eine Transformante mit der richtigen Sequenz für die im Folgenden diskutierten Untersuchungen verwendet.

## 4.2 Vergleich der Morphologie von Transformanten und *F. graminearum*

### Wild Typ

Die Hydrophobin-Deletionsmutanten von Asco- und Basidiomyceten wiesen in früheren Untersuchungen Unterschiede hinsichtlich der Koloniemorphologie auf. Die beschriebenen Unterschiede reichen dabei von der kompletten Abwesenheit des Luftmyzels bis zur vollkommenen Übereinstimmung zwischen den Transformanten und dem Wild Typ (Whiteford & Spanu 2001; Fuchs *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Izumitsu *et al.* 2010; Mosbach *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte weder eine Beeinflussung der Kolonie- noch der Hyphen-Morphologie oder der Biomasse-Produktion durch die Deletion des *hyd5*-Gens festgestellt werden. Ähnliche Ergebnisse konnten auch für die gezielte Mutagenese in Klasse I Hydrophobin-Genen bei Ascomyceten wie *hcf1* und *hcf2* in *Cladosporium fulvum* (Whiteford & Spanu 2001), oder *bchpb1* in *Botrytis cinerea* (Izumitsu *et al.* 2010) festgehalten werden. Auch bei diesen Untersuchungen ergaben sich keine Unterschiede in der Morphologie der Kolonien zwischen den Wild Typ Stämmen und den *knock-out* Mutanten. Auch bei *F. verticillioides* konnte in Transformanten, in denen eines der fünf Hydrophobin-Gene *fvhyd1-fvhyd5* durch *knock-out* deletiert worden war, im Vergleich zum *F. verticillioides* Wild Typ keine Veränderung in der Morphologie der Kolonien und Hyphen festgestellt werden (Fuchs *et al.* 2004). Interessanterweise zeigte jedoch die Transformante FgFP (FgHyd5p-sGFP Fusionsprotein) eine Veränderung in der Hyphen- und Kolonie-Morphologie gegenüber dem Wild Typ. Der Stamm bildete deutlich weniger Luftmyzel als der Wild Typ. Mikroskopisch waren auch die Hyphen breiter und stärker gekrümmt. Ähnlich wie bei den Fusionsproteinen des DsRed2-Tetramers (Campbell *et al.* 2002) ergaben die *in silico* untersuchten (<http://swissmodel.expasy.org/>) vier Faltungsvarianten des FgHyd5p-sGFP-Fusionsproteins kein funktionsfähiges Fusionsprotein. Ob dies jedoch zu den beobachteten Veränderungen der Morphologie in Stamm FgFP führte, kann anhand der

Daten nicht abschließend beurteilt werden. Möglicherweise führt die Fehlfaltung des Fusionsproteins (Abb.43) zu einer Situation, in der die Proteinmaschinerie der Pilzzelle mehr damit beschäftigt ist, die fehlgefalteten Proteine wiederabzubauen, als eine normale Proteinproduktion durchzuführen. Dies hat möglicherweise die beobachteten morphologischen Abweichungen zur Folge.



**Abb.43: Theoretische 3D-Modelle des Fusionsproteins FgHyd5-sGFP. Gelb: Sequenz des sGFP, rosa: Sequenz des FgHyd5p.**

Zusammenfassend gibt es keine Hinweise darauf, dass FgHyd5 einen Einfluss auf die Morphologie der Kolonie und der Hyphen haben könnte.

Der erste Schritt bei der Luftmyzel-Bildung ist der Austritt der individuellen Hyphe aus dem feuchten Substrat in die Luft. Als eine wichtige Funktion der Hydrophobin-Sekretion wurde die Senkung der Oberflächenspannung des Substratwassers postuliert, die den Pilzhypen ein Durchdringen der Grenzfläche Wasser/Luft und damit der Bildung von Luftmyzel erst ermöglicht (Wösten 2001). Gereinigte Hydrophobine der Klassen I und II wie das HFB1 und das HFBII von *T.reesei* oder das SC3 und das SC4 von *S. commune* sind in der Lage, die Wasser-Oberflächenspannung deutlich zu senken (Askolin *et al.* 2005; Askolin *et al.* 2006). Die Untersuchung der drei in der vorliegenden Arbeit hergestellten Transformanten ergab jedoch, dass die vorgenommenen Veränderungen (*knock out*, Fusion mit *sgfp* sowie translationelle Kopplung) keinen Einfluss auf die Fähigkeit der Hyphen haben, die Wasser/Luft Grenzfläche zu durchdringen. Dagegen konnte bei der Untersuchung der Hydrophobizität der Kolonieoberfläche eine deutliche Senkung der Hydrophobizität bei allen Transformanten beobachtet werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen führte weder die Deletion jedes einzelnen Hydrophobin Gens (*fvhyd1-5*) in *F. verticillioides* noch die doppelte Deletion (*fvhyd1* gleichzeitig mit *fvhyd2*) zu einer Veränderung bzgl. der wasserabweisenden Eigenschaften der Hyphen (Fuchs *et al.* 2004). Schlussfolgernd hat das Hydrophobin FgHyd5p selber keine unmittelbare Wirkung auf die Senkung der Wasser-Oberflächenspannung. Es trägt aber anscheinend zu den Wasser-abweisenden

Eigenschaften bei, die bei Agarkulturen von *F. graminearum* beobachtet werden. Wahrscheinlich spielt in diesem Prozess nicht nur das FgHyd5p, sondern auch eines der vier anderen Hydrophobine eine Rolle.

### **4.3 Vergleich der Sporen des *F. graminearum* Wild Typs und der Transformanten**

Hydrophobine beeinflussen die Sporulation der Pilze. Ascolin *et al.* konnten zeigen, dass der Stamm  $\Delta hfb2$  von *T.reesei*, der eine Deletion des *hfb2* Gens trägt, eine um 50% verringerte Konidienbildung zeigte als der entsprechende Wild Typ Stamm (Ascolin *et al.* 2005). Auch die Deletion des MPG1-Hydrophobinsin *M. grisea* hatte einen ähnlich starken Effekt auf die Sporulation (Talbot *et al.* 1996). Bei der Untersuchung der *hyd5*-Mutanten wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, dass zwei Transformanten (FgFP und Fg $\Delta$ hyd5) signifikant mehr Konidien produzierten als der Wild Typ und dass die Konidien der Transformanten FgFP und Fg $\Delta$ hyd5 signifikant kürzer waren und gleichzeitig weniger Zellen enthielten als die Konidien des FgWT. Gleichzeitig war jedoch bezüglich der Fitness der Konidien kein Unterschied zwischen den Transformanten und dem Wild Typ erkennbar. Aus diesen Erkenntnissen kann geschlossen werden, dass das *hyd5* Gen in *F. graminearum* einen Einfluss auf die Konidien-morphologie und -anzahl besitzt ohne jedoch die Keimfähigkeit der Konidien zu beeinflussen. Vermutlich gleicht der Pilz die signifikante Abnahme der Zellzahl pro Konidie bei gleicher Keimfähigkeit durch eine Erhöhung der Konidienzahl aus, um so sein reproduktives Potenzial unverändert bei zu behalten.

Hydrophobine der Klassen I und II sind oft in Sporen zu finden (Kershaw *et al.* 1998). Viterbo und Chet (2006) fanden heraus, dass das Hydrophobin TasHyd1 in sehr jungen Hyphen und auskeimenden Sporen von *T.reesei* exprimiert wird. In etwas älteren Hyphen sinkt das Level an TasHyd1 sehr schnell ab. Die Hydrophobine der Klasse II, wie z.B. das Hcf-6 in *C. fulvum* und das Cryparin in *C. parasitica*, haben das gleiche Expressionsprofil wie TasHyd1 von *T.reesei* (Kazmierczak *et al.* 2005; Nielsen *et al.* 2001). Bei *F. verticillioides* wurde eine erhöhte Konzentration von des Hydrophobins Hyd2 im basalen Teil der Konidiophoren und in den Kontaktstellen zwischen einzelnen kettenförmigen Mikrokonidien festgestellt (Fuchs *et al.* 2004). Da alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Transformanten in ihren Genomen das sGFP unter der Kontrolle des *hyd5*-Promoters hatten, wurden die Sporen der drei Transformanten

(FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5) auf ihre Fluoreszenz hin untersucht. Bei allen drei Transformanten wurden etwas stärker leuchtende Septen gefunden. Bei den Transformanten FgFP und der Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 ließ sich eine starke hellgrüne Fluoreszenz in den Fußzellen mancher Konidien beobachten. Vermutlich handelt es sich um Autofluoreszenz, da im Falle einer Ansammlung von Fghyd5p im Bereich der Konidiensepten oder in der Fuß- oder Kopf-Zelle die Fluoreszenz dort nur bei den Transformanten mit Fusionsprotein zu sehen sein sollte, während bei der Deletionsmutante und bei der translationelle Kopplung der Transformanten das sGFP gleichmäßig in den Zellen der Sporen verteilt sein sollte, die grün fluoresziert hätten.

#### **4.4 Wachstum und Aktivierung des *hyd5* Gen-Promoters der**

##### ***F. graminearum*-Stämme auf unterschiedlichen Medien**

Es ist bekannt, dass unterschiedliche Kohlenstoff- und Stickstoffquellen sowie physikochemische Faktoren wie der pH-Wert bei manchen Pilzen zur Hemmung oder auch zur Überexpression der Hydrophobine führen. Bei dem Pilz *T. reesei* wurde das *dashfb1*-Gen (Hydrophobin-Klasse II) auf einem Medium mit Glukose oder Sorbit verstärkt exprimiert. Dagegen hemmten Laktose und komplexe Polysaccharide, wie z.B. Zellulose, die Expression des *hfb1*-Gens (Nakari-Setälä et al. 1997). Gleichzeitig aktivierten Sorbitol, Cellulose und Laktose die Expression der Hydrophobin Gene *hfb2* und *hfb3* *T. reesei* (Hydrophobin -Klasse II) (Askolin et al. 2005). Bei *T. asperellum* wurde bei Stickstoff-Mangel das *Tashyd1*-Gen nicht exprimiert (Viterbo & Chet 2006). Beim Pilz *C. fulvum* hatten auch verschiedene C- und N-Quellen Auswirkungen auf die Expression von Hydrophobin-Genen. So führte ein Mangel an Kohlenstoffquellen bei *C. fulvum* zu verstärkter Expression der für Hydrophobine der Klasse I kodierenden Gene *hcf1*, *hcf2*, *hcf3* und *hcf4*. Zudem führte ein gleichzeitiger Mangel an Kohlenstoff und Stickstoff zu einer stärkeren Expression aller vier für Hydrophobine der Klasse I kodierenden Gene sowie des *hcf5*-Gens für ein Hydrophobin der Klasse II (Segers et al. 1999). Stickstoff hat im *C. fulvum* keinen Einfluss auf die Expression des *hcf6*-Gens (Nielsen et al. 2001). Expressionsanalysen bei *M. grisea* zeigten, dass Kohlenstoffquellen dort keinen Einfluss auf die Expression des *mhp1*-Gens (Klasse II) hatten (Kazmierczak et al. 2005). Im Gegensatz dazu wurde das *mpg1*-Gen (Klasse I) unter N-Mangel stärker exprimiert als bei normaler Stickstoff-Versorgung (Talbot et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von sGFP-Reporterstämmen (FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5) Hinweise

darauf gefunden, dass Kohlenstoffquellen wie Raffinose, Salizin, Saccharose, Glukose und Glycerin sowie Stickstoffquellen wie Natriumnitrat, Ammoniumchlorid und Ammoniumnitrat weder die Produktion des FgHyd5p im *F. graminearum* noch das Wachstum des Pilzes beeinflussen. Ebenso wenig haben komplexe und definierte Medien oder Zellextrakte aus Gerste und Weizen einen Einfluss auf die Produktion des FgHyd5p. Um diese Daten zu unterschützen wären weitere, von Transformanten unabhängige Untersuchungen, z.B. auf der Ebene der Transkription von großem Interesse. Derartige Untersuchungen hätten jedoch den (zeitlichen) Rahmen der vorliegenden Arbeit überschritten. Ein lediglich minimaler Einfluss eines pH6 auf das Wachstum der *hyd5*-Gen Deletionsmutante konnte festgestellt werden. pH 4-5 und pH7-8 zeigten dagegen keinen Einfluss auf das Wachstum oder die *hyd5* Gen-Promoter-Aktivierung. Tetlow und Farrar (1993) haben gezeigt, dass das apoplastische pH Level bei Gerste mit gesundem Gewebe bei pH5,6-6,6 liegt und bei Gerste mit krankem Gewebe bei pH7,3. Das hier festgestellte schwache Wachstum der Deletionsmutante bei einem pH-Wert, wie er im gesunden Gerstengewebe vorliegt, könnte hier auch eine Erklärung für die festgestellte reduzierte Infektiosität des Stammes darstellen.

#### **4.5 Aktivierung des *hyd5*-Gen Promoters auf wasserabweisenden Oberflächen**

Um zu überprüfen, ob der Kontakt mit dem Trägermaterial bzw. mit einer hydrophoben Oberfläche den *hyd5*-GenPromoter beeinflusst, wurden die Transformanten FgFP, FgTK und Fg $\Delta$ hyd5, die auch als sGFP-Reporterstämme dienen, verwendet. Das Myzel der Transformanten wurde auf einer hydrophoben Oberfläche (Polystyrol) zum Wachstum gebracht, um den Einfluss des Kontaktes zur Wasser abweisenden Oberfläche (WAO) auf den *hyd5*-GenPromoter zu untersuchen. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass der Promoter, der für die Regulation der Expression des *F. graminearum*-Hydrophobins FgHyd5p (Klasse II) verantwortlich ist, nur in denjenigen Hyphen aktiviert wird, die direkten Kontakt mit der WAO haben. Bezüglich Morphologie und Anhaften der Hyphen konnte kein Unterschied zwischen den Transformanten- und den Wild Typ-Stämmen festgestellt werden. Es kann demnach der Schluss gezogen werden, dass das Hydrophobin FgHyd5p als Mediator zwischen der hydrophilen Zelloberfläche und der hydrophoben Substratoberfläche, wie z.B. einer Blattoberfläche, dienen könnte. Es

könnten aber auch die anderen vier Hydrophobine des *F. graminearum* diese Funktion übernehmen, da kein Unterschied zwischen dem Myzel der *knock-out* Transformanten und dem des Wild Typs in Bezug auf die Anheftung an die WAO festgestellt werden konnte. Wie das FgHyd5p von *F. graminearum*, so sind auch die Hydrophobine von anderen Pilzen bei der Anheftung an hydrophobe Oberflächen beteiligt (Wösten 2001). So wurde beispielsweise für das SC3-Hydrophobin von *S. commune* beobachtet, dass es sich an der Grenzfläche von Zellwand und einer Teflonoberfläche anreichert, wo das Protein die Anheftung der Hyphen an die extrem hydrophobe Oberfläche ermöglicht (Wösten et al. 1994). Zudem sind auch HFBI und HFBIII als Hydrophobine der Klasse II in *T. reesei* in der Lage, sich an silanisierendes Glas und Teflon anzuheften (Linder et al. 2002). Auch für die gut erforschten Hydrophobine MPG1 (*M. grisea*) und DewA (*A. fumigatus*) sind solche Anheftungsfähigkeiten beschrieben worden, wobei diese von der Orientierung der amphiphilen Moleküle abhängig sind (Schmoll et al. 2010; Talbot et al. 1996).

#### **4.6 Vergleich der Virulenz der Transformanten und des *F. graminearum* Wild Typs**

Die meisten der erforschten Hydrophobine spielen eine Rolle bei der Pathogenese der sie bildenden Pilze. Die Expression des *TasHyd1*, eines hydrophobin-ähnlichen Gens im *T. asperellum*, konnte innerhalb der ersten fünf Tage nach der Wurzelinfektion nachgewiesen werden (Viterbo & Chet 2006). Auch die beiden für *M. grisea* erforschten Hydrophobine spielten eine wichtige Rolle bei der Infektion von Reispflanzen. Talbot et al. (1993;1996) konnten zeigen, dass das MPGI-Hydrophobin sowohl für die infektionsbezogene Entwicklung der Hyphen von *M. grisea* notwendig ist als auch für die Appresorien-Entwicklung während der Pathogenese des Pilzes. Ein anderes Hydrophobin-Gen von *M. grisea*, das *mhpl*, wurde während der Infektion stark exprimiert (Kim et al. 2005). Auch bei dem Insektenpathogen *Metarhizium anisopliae* spielen Hydrophobine eine wichtige Rolle bei der Besiedelung ihres Substrates (Leger et al. 1998). In welchem Ausmaß das CU (Hydrophobin von *O. novo-ulmi*) zur Ulmenkrankheit (*Dutch elm disease*) beiträgt, ist bis heute nicht genau definiert worden. Im Jahr 1996 wurde mit Hilfe eine *cu*-Deletionsmutante nachgewiesen, dass bezüglich

der Pathogenität keinen Unterschied zwischen der Transformanten und dem Wild Typ bestand. Daher wurde im Jahre 1997 postuliert, dass das Hydrophobin CU die Gesundheit der befallenen Bäume während der Infektion nicht beeinträchtigt. Im Jahr 2000 wurde allerdings doch eine Korrelation zwischen dem CU und der Pathogenese von *O. novo-ulmige* funden (Bowden *et al.* 1996; Temple *et al.* 1997; Temple & Horgen 2000). Es gibt aber auch Hydrophobine, die keine Auswirkung auf die Virulenz der Pilze haben. So wirkte sich z.B. bei Tomaten keines der drei Hydrophobine BhpI-III von *B. cinerea* auf die Pathogenität des Pilzes aus (Mosbach *et al.* 2011). Obwohl während der Invasion der Pflanze das HCf-6, ein Hydrophobin von *C. fulvum* durch den Pilzsekretiert wurde (Whiteford *et al.* 2004), hat das andere durch den selben Pilz gebildete HydrophobinHCf1, keinerlei Auswirkungen auf die Pathogenese (Spanu 1998). Weder das Hydrophobin VDH1 von *V. dahliae* noch das Cryparin von *C. parasitica* waren jeweils für die Pathogenität der betreffenden Pilze notwendig (Kazmierczak *et al.* 2005; Klimes & Dobinson 2006). Im Gegensatz zu *F. verticillioides*, dessen fünf verschiedene Hydrophobine keinen Einfluss auf die Pathogenität hatten (Fuchs *et al.* 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Unterschied bzgl. der Pathogenität der FgHyd5p-Delationsmutante und des *F. graminearum* Wild Typs festgestellt. Die Infektion der Gersten- und Weizenkeimlinge mit den drei Transformanten und dem *F. graminearum* Wild Typ zeigte, dass mit dem Fg $\Delta$ hyd5 Transformant infizierten Pflanzen signifikant länger waren als diejenigen Pflanzen, die mit dem Wild Typ infiziert worden waren. Außerdem waren sowohl beider Gerste als auch beim Weizen die Blätter der mit dem Fg $\Delta$ hyd5 Transformant infizierten Pflanzen signifikant gesünder als die Blätter der mit dem Wild Typ infizierten Pflanzen. Die Pflanzen, die mit zwei anderen Transformanten (FgFP und FgTK) infiziert waren, waren nicht signifikant länger, als diejenigen Pflanzen, die mit dem Wild Typ infiziert worden waren. Interessanterweise zeigten die Gerstenblätter, die mit FgFP, FgWT oder FgTK infiziert waren weniger stark ausgeprägte Symptome eines *F. graminearum* Befalls im Vergleich der unterschiedlichen Behandlungen. Andererseits zeigten die Weizenblätter, die mit den beiden Transformanten FgFP und FgTK infiziert waren eine etwas höhere Fitness als diejenigen, die mit dem Wild Typ infiziert wurden. Ihre Fitness war jedoch geringer als die von Weizen, der mit der Delationsmutante infiziert worden war. Diese Unterschiede konnten durch die vorliegenden Daten nicht eindeutig erklärt werden, es kann vermutet werden, dass die benutzte Weizensorte weniger resistent gegenüber *F. graminearum*



war als die eingesetzten Gerstesorten. Eine explizite Betrachtung der Sortenunterschiede würde jedoch den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen. Die Abwesenheit eines Unterschiedes in der Fitness von Gerstenblättern, die mit FgWT, FgFP oder FgTK behandelt wurden sowie das Vorliegen eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Behandlungen mit FgFP und FgTK einerseits und der Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 andererseits könnten darauf hinweisen, dass die Transformanten funktionsfähiges FgHyd5p Protein produzieren können. Daraus lässt sich insgesamt schließen, dass FgHyd5p einer der Virulenzfaktoren von *F. graminearum* sein könnte und damit einen wichtigen Faktor bei der Pathogenese des Pilzes an Getreide darstellt. Dass es allerdings nicht der einzige Faktor bei der Pathogenese ist zeigt sich daran, dass alle infizierten Gersten- und Weizenpflanzen signifikant weniger gesund waren als die nicht infizierten Pflanzen.

Wie oben beschrieben, werden manche Hydrophobine während der Infektion produziert. Cuomo *et al.* (2007) suchten in den für das Genom von *F. graminearum* ausgewiesenen „*predicted secreted proteins*“ nach solchen Sequenzen, die Ähnlichkeiten mit Sequenzen typischer pilzlicher Virulenzfaktoren hatten. Die Suche erstreckte sich insbesondere auf Regionen mit höherer SNP-Dichte (*single-nucleotide polymorphism*). Neben anderen Homologen zu den vermeintlichen Virulenzfaktoren wurde dabei auch eine Hydrophobinsequenz (FG01831=Fghyd5) gefunden. Die Hypothese von der Rolle des Hydrophobins als Virulenzfaktor wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von *hyd5-sgfp*-Reporterstämmen unterstützt, denn es wurden Hinweise darauf gefunden, dass FgHyd5p während der Infektion von Gerste und Weizen in den *F. graminearum* Transformanten produziert wird. Durch eine konfokale Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die in Historesin eingebetteten Schnitte von infizierten Pflanzenteilen untersucht. In den Phloem- und Xylem-Gefäßen sowie im Parenchym der mit den Transformanten FgFP und Fg $\Delta$ hyd5 infizierten Gerste war eine deutliche sGFP-Fluoreszenz zu sehen. Dies entspricht der Erwartung, da sich der Pilz in den ersten zwei Wochen vertikal und danach horizontal über die Gefäße verbreitet (Guenther & Trail 2005). Das Ergebnis bestätigt außerdem die bioinformatischen Untersuchungen von Cuomo *et al.* (2007).

#### 4.7 Hydrophobin als Auslöser von oxidativem Stress

Die erste pflanzliche Immunantwort nach der Pflanzen-Pathogen-Erkennung ist die Bildung von ROS und der damit in der Pflanze ausgelöste Oxidative Stress (OS) (Dixon & Harrison 1994). Eine Besiedelung durch pflanzenpathogene Pilze wie *Phytophthora megasperma*, *Verticillium dahliae* und *C. fulvum* verursachen bei den Wirtspflanzen OS (Davis *et al.* 1993; Vera-Estrella *et al.* 1992; Lindner *et al.* 1988). Auch *F. graminearum* ist in der Lage, bei Gerste und Weizen während der Ähreninfektion OS zu verursachen (Golkari *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2005). Da die hier vorliegenden Ergebnissen weisen darauf hin, dass das Hydrophobin 5 von *F. graminearum* einer der Virulenzfaktoren bei der Infektion ist und auch manche andere Zellwandkomponenten von Pilzen zur Produktion von ROS führen können (Wojtaszek 1997), wurde vermutet, dass das FgHyd5p ein Auslöser für OS in Gerste- und Weizenblättern sein kann. Laut dieser Hypothese sollte der Kontakt mit den *hyd5*-Deletionsmutanten von *F. graminearum* (Fg $\Delta$ hyd5) zu einer geringeren ROS-Produktion führen als mit Komponenten des Wild Typs. Um die Reaktion von Gersten- und Weizenblättern auf den Kontakt mit entsprechenden Konidienextrakten zu testen, wurde eine Luminol<sub>012</sub>-Analyse Konidienextrakten und Konidiensuspensionen des *F. graminearum* Wild Typs bzw. der *hyd5*-Deletionsmutante durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass auch nach dreimaliger Wiederholung der Versuche kein Unterschied in der ROS-(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Bildung festgestellt werden. Es wurde daher vermutet, dass die Hydrophobin-Konzentration in der Konidiensuspension nicht hoch genug war (in vorherigen Konidienuntersuchungen konnte keine FgHyd5p-Expression nachgewiesen werden). Deshalb wurde für die Reaktion ein lyophilisiertes Hydrophobin 5 von *F. culmorum* (unbestimmte Konzentration) sowie als negative Kontrolle ein lyophilisierter Zellüberstand von *Pichia pastoris* verwendet. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bildenden Reaktionen wurden in der L<sub>012</sub>-Analyse durch das FcHyd5p- und das *P. pastoris*-Zellüberstand-Lyophilisat gehemmt. Wahrscheinlich befinden sich in den Lyophilisat von *P. pastoris* Stoffe, die Peroxidasen hemmen und dadurch die Reaktion insgesamt. Es gibt drei mögliche Gründe dafür, dass sich die ROS-Produktion bei dem Wild Typ und der Deletionsmutante nicht unterschied: 1. In dieser Arbeit konnte keine Hydrophobin-Produktion in den Konidien nachgewiesen werden. Aufgrund der Abwesenheit von Hydrophobin 5 in den Konidien blieb das Ausmaß der ROS-Produktion in den Gersten- und Weizenblättern gleich. 2. Hydrophobine sind

oberflächenaktive Proteine, die hydrophobe und hydrophile Bereiche haben (Wessels 2000). Diese hydrophob-hydrophilen Bereiche sind in der Lage, den Kontakt zwischen Rezeptor und Auslöser zu verhindern. Somit kann das Hydrophobin nicht als guter Auslöser dienen. 3. Die Messung wurde innerhalb von zwei Stunden durchgeführt, es könnte demnach sein, dass das Hydrophobin erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion als Elicitor teilnimmt, z.B. während der Invasion oder der Appresorien-Bildung. Wenn dies der Fall ist, hat die Messung in den ersten zwei Stunden einen eventuellen Unterschied bei der ROS-Bildung nicht detektieren können.

### 4.8 Gushing

Ein bekanntes und vieldiskutiertes Phänomen in der Brauindustrie ist das Gushing des Bieres. Als Gushing wird das spontane Überschäumen von karbonisierten Getränken, wie z.B. Bier, Sekt oder Saftschorle (Burkert 2006; Christian *et al.* 2011) bezeichnet. Seit 1965 ist bekannt, dass ein Grund für das Auftreten von Gushing die Verwendung von Malz sein kann, welches aus mit *Fusarium* ssp. infiziertem Getreide hergestellt wurde (Gjertsen *et al.* 1965). Während der Infektion produzieren *Fusarium*-Arten eine Reihe von Metaboliten, die die normale Korn-Proteolyse stören und somit die Qualität des Malzes und des Bieres beeinträchtigen können (Harris *et al.* 1999; Oliveira *et al.* 2012; Oliveira *et al.* 2013). Die Hydrophobine, die auch während der Infektion produziert werden, können primäres Gushing verursachen. Es wurde nachgewiesen, dass Hydrophobine von *F. poae* und des *F. culmorum* Gushing in Bier verursachen (Haikara *et al.* 2005; Sarlin *et al.* 2005; Zapf *et al.* 2006).

Der Vergleich der AS-Sequenz des Hydrophobin 5 von *F. culmorum* (NCBI: ABE27986.1) mit dem vorhergesagten Protein von *F. graminearum* (NCBI: XM\_382007.1, predicted protein sequence) zeigt nur eine 54%-ige Ähnlichkeit zwischen den beiden Proteinen, wenn die Proteinsequenz zusammen mit dem Sekretionspeptid verglichen wird (Zapf *et al.* 2006). Die durch *F. culmorum* und *F. graminearum* sekretierten Hyd5p Proteine sind dagegen 100 % homolog. Da Zapf *et al.* bereits zeigen konnten, dass FcHyd5p Gushing auslöst, wurde vermutet, dass auch das homologe FgHyd5p aus *F. graminearum* eine ähnliche Wirkung haben sollte (Zapf *et al.* 2006). Ein modifizierter Carlsberg-Test mit dem Malz von mit dem *F. graminearum* Wild Typ bzw. der *F. graminearum-hyd5*-Deletionsmutante infizierten Geste- und Weizenpflanzen zeigte keinen signifikanten Unterschied im Gushing-Volumen von karbonisiertem Wasser. Während der

Durchführung des modifizierten Carlsberg-Tests fiel jedoch auf, dass in denjenigen Flaschen, die mit dem FgTK-infizierten Malz behandelt worden waren, ein sehr geringes Gushing-Volumen aufwies. Ein möglicher Grund dafür könnte der niedrige Infektionsgrad der Gerste durch den FgTK-Stamm während des Mälzens sein. Während des Mälzens war deutlich zu erkennen, dass der Befall der Weizenkörner mit FgTK geringer war als der Befall der Körner mit anderen Stämmen. In früheren Arbeiten war die Wirkung von Hydrophobinen auf das Gushing mittels direkter Zugabe von in Wasser gelösten Hydrophobinen gezeigt worden. Dagegen wurde bei dem oben beschriebenen Experiment das gesamte infizierte Korn verwendet (Lutterschmid *et al.* 2010; Lutterschmid *et al.* 2011). Dies führt zu einer Senkung der FgHyd5p-Konzentration im gesamten Volumen und zur Zugabe von anderen, sekundären, Gushing-Faktoren, die die Reinheit des Experiments beeinträchtigt haben könnten. Andererseits ist Folgendes bekannt: Wenn das Malz in Gushingstests wie dem Donhauser-oder dem Carlsberg-Test positiv reagiert, heißt dies nicht, dass auch ein daraus hergestelltes Bierzwangsläufig überschäumen wird (Christian *et al.* 2011). Aus diesen Gründen konnte eine Auswirkung einer Deletion des *fghyd5*-Gens auf das Gushing nicht belegt werden.

#### **4.9 Vergleich der Transformanten mit dem *F. graminearum* Wild Typ sowie die Frage nach der Funktionalität der FgTK Transformante**

Um die Funktion des Hydrophobins FgHyd5p im Lebenszyklus von *F. graminearum* zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit drei *F. graminearum* Transformanten hergestellt: bei der knock-out Mutante (Fg $\Delta$ hyd5) wurde das *hyd5* Gen durch das für sGFP kodierende *sgfp*-Gen ersetzt, so dass anstelle des Hydrophobins das fluoreszierende Protein unter der Kontrolle des *hyd5* Promoters produziert wurde. Zwei weitere Transformanten des *F. graminearum* Wild Typs enthielten ein vollständiges *hyd5*-Gen, waren aber zusätzlich mit einer sGFP Reporterfunktion ausgestattet. FgFP enthielt schließlich als zweiter Mutantentyp ein gentechnisches Konstrukt, das zur Bildung eines FgHyd5p-sGFP Fusionsproteins führt. Da Hydrophobin 5 ein stark oberflächenaktives Protein ist und sowohl hydrophobe als auch hydrophile Teile besitzt, wurde bereits bei der Konstruktion vermutet, dass die Funktionen von FgHyd5p und/oder des sGFP in einem FgHyd5p-sGFP-Fusionsprotein infolge einer Fehlfaltung

beeinträchtigt sein könnten. Es wurde deshalb eine weitere Transformante (FgTK) hergestellt, in der das *hyd5*-Gen und das *sgfp*-Gen so auf einer bicistronischen mRNA kodiert sind, so dass beide Gene unter der Kontrolle des *hyd5*-Promoters exprimiert werden. Durch die Konstruktion sollten jedoch beide Proteine getrennt voneinander synthetisiert werden, so dass der Erhalt der Funktionalität beider Proteine angenommen werden kann. Es gibt Hinweise darauf, dass kernkodierte polycistronische mRNA auch in Eukaryoten translatiert werden kann (Chanfreau et al. 1998; Chung et al. 2003; Minet et al. 1979; Petfalski et al. 1998). Eine Translation dicistronischer mRNA in Eukaryoten ohne den Einbau der IRES-(Blumenthal 2004) oder 2A-Protein-Sequenzen (Unkles et al. 2014) im genetischen Konstrukt ist nur dann möglich, wenn ein Eukaryont dank "*context-dependent leaky scanning mechanism*" polycistronische mRNA ablesen kann (Wall et al. 2005). Bis heute ist es nicht bekannt, ob dieser Mechanismus bei *F. graminearum* vorkommt. Für den Fall, dass dieser Mechanismus in dem Pilz existieren sollte, würde sich die Transformante FgTK in unterschiedlichen Experimenten so verhalten, wie der *F. graminearum* Wildtyp. Tatsächlich zeigte diese Transformante keinen Unterschied zum Wildtyp in der Morphologie der Kolonie sowie in der Hyphenbreite, der Konidienlänge und -zahl, in der Perithezienbildung, in der Vitalität der Sporen sowie in der Biomasseproduktion (Überblick über die Ergebnisse in tabellarischen Form: siehe Tabelle 12). Es gab auch keine Unterschiede im Überwinden der Oberflächenspannung von Wasser, der Infektiosität und des Hervorrufens von Gushing in Bier. In allen untersuchten Parametern verhält sich diese Transformante wie der Wildtyp, was darauf hindeutet, dass das *hyd5*-Gen von der dicistronischen mRNA richtig translatiert worden sein könnte. Das Auftreten einer Fluoreszenz der Hyphen bei Wachstum auf einer wasserabweisenden Oberfläche deutet darauf hin, dass auch das zweite Gen des bicistronischen mRNA Konstruktes richtig translatiert wird. Andererseits zeigt die FgTK Transformante hydrophobe Hyphen und eine gegenüber den Wildtyp abgeschwächte Virulenz gegenüber Getreidepflanzen. Diese Fähigkeiten zeigte auch die Delationsmutante. Vermutlich wird in beiden Fällen zu wenig Hydrophobin 5 produziert, um eine mit dem Wildtyp vergleichbare Hydrophobizität und Virulenz zu erreichen. Es wurde daher vermutet, dass in dem Fall von FgTK ein "*context-dependent leaky scanning mechanism*" vorliegt, aber Hydrophobin 5 und sGFP werden jeweils in kleineren Konzentration produziert, was für die Unterschiede zwischen den Transformanten verantwortlich sein könnte. Weitere Untersuchungen

(z.B. Northern Blot) könnten hier ggf. klären, ob in *F. graminearum* einen "context-dependent leaky scanning mechanism" existiert. Diese weiterführenden Untersuchungen konnten jedoch aus Zeitgründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Interessanterweise verhält sich die FgFP Transformante ähnlicher wie die Deletionsmutante als wie der Wildtyp. So hat diese Transformante hydrophilere Hyphen und bildet ähnlich viele Konidien und Perithezien wie die Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5. Die Zellzahl pro Konidie ist, ähnlich wie bei Fg $\Delta$ hyd5. Gegenüber dem Wildtyp erhöht. FgFP besitzt jedoch im Gegensatz zur Deletionsmutante Fg $\Delta$ hyd5 keine veränderte Virulenz. Möglicherweise führt eine Fehlfaltung des Fusionsproteins zu einer Situation, in der die Proteinmaschinerie der Pilzzelle mehr damit beschäftigt ist, die fehlgefalteten Proteine wieder abzubauen, als eine normale Proteinproduktion durchzuführen. Dies hat möglicherweise die beobachteten Abweichungen zur Folge. Als einzige Transformanteruft FgFP verstärktes Gushing im Beer hervor. Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass die infizierten Getreidekörner einen stärkeren Befall durch FgFP gezeigt haben, was zu einer Erhöhung des Gushing Volumens in den Analysen geführt haben könnte.

### **4.10 Entwicklung einer reverse transcription loop-mediated isothermal**

#### **amplification Methode für die Untersuchung der Genexpression in Pilzen**

Die *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) ist eine relativ neue Methode, die eine Synthese von größeren DNA-Mengen in kürzester Zeit und bei gleichbleibender Temperatur erlaubt (Notomi et al. 2000). Im Verlauf der letzten 13 Jahre wurden mehrere Anwendungen für diese Methode entwickelt, unter anderem die Amplifikation von mRNA nach *in vitro* reverser Transkription in cDNA, die anschließend als Amplifikations-Template eingesetzt wurde (Niessen et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, bei der mRNA nach Isolation aus Pilzen oder infizierten Pflanzen ohne vorherige *in vitro* Umschreibung in cDNA direkt als Amplifikationstemplate in eine LAMP eingesetzt wurde. Das Verfahren wurde als *Reverse-Transkription Loop-Mediated Isothermal Amplification* (RT-LAMP) im Rahmen einer Vorabpublikation von Ergebnissen der vorliegenden Arbeit veröffentlicht (Minenko et al., 2014). Die RT-LAMP konnte darüber hinaus auch für den Nachweis der

Gen-Expression direkt im Myzel einer Reinkultur von *F. graminearum* ohne vorherige mRNA Extraktion angewendet werden. Durch eine Kombination der LAMP-Reaktion und der reversen Transkription von mRNA in einer einzigen Reaktion sowie durch die Nutzung von hoch aktiver *Bst2.0*-Polymerase sowie aufgrund der Möglichkeit, das Myzel ohne jegliche Präparation direkt dem Reaktionsmix zuzugeben, konnte die Gen-Expression inklusive der Proben-Vorbereitung mit der entwickelten Methode innerhalb von nur 40 Minuten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur klassischen Reverse Transkription PCR (RT-PCR) oder einem Microarray benötigt man für die RT-LAMP keine teuren RNA-Präparations Kits, da keine mRNA-Isolierung nötig ist, wenn mit dem Myzel von Reinkulturen gearbeitet wird (Espy *et al.* 2006; Rosa *et al.* 2006). Dank des einfachen Handlings und der viel schnelleren Durchführung des Experiments sinken auch die Personalkosten: So benötigt beispielsweise ein real-time PCR Assay in einem real-time PCR Gerät wie etwa dem LightCycler (LightCycler Strep-A, Roche Diagnostics Corporation) 1,9 Vollzeitäquivalente, während man für die RT-LAMP nur 0,01 braucht (Espy *et al.* 2006). Deswegen kann die hier beschriebene neue Anwendung der RT-LAMP für wichtige Vorversuche in der Expressionsanalyse pilzlicher Gene eingesetzt werden, um schnell und kostengünstig die tatsächliche Dauer der Gen-Expressionen zu erfahren. Solche Vorversuche zur genauen Definition des Zeitraums, in dem die Expression der untersuchten Gene stattfindet, sollten immer dann durchgeführt werden, wenn die Zahl der mit einer klassischen Gen-Expressionsanalyse zu untersuchenden Proben aus Kostengründen möglichst gering gehalten werden soll. Die RT-LAMP kann auch in Studien benutzt werden, in denen die Wirkung unterschiedlicher ökologischer Faktoren auf die An- oder Abwesenheit sekundärer Metabolite, z.B. von Mykotoxinen, auf der Ebene der mRNA untersucht werden soll, wie von Schmidt-Heydt *et al.* (2011) dargestellt. Die neu entwickelte RT-LAMP kann auch verwendet werden, um schnell die Anwesenheit von mRNA im Myzelium festzustellen und dabei auf komplizierte, teure und zeitaufwendige Methoden zu verzichten. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe der neu entwickelten RT-LAMP die Expression des *hyd5*-Gens im Myzel des *F. graminearum* untersucht. Durch die RT-LAMP wurde bestätigt, dass in Myzel nach Wachstum in Malz-Extrakt-Medium keine Expression des *hyd5*-Gens stattfindet. Eine Expression dieses Gens konnte mit der Methode jedoch während bei der Infektion von Gerste oder Weizen detektiert werden. Durch diese Experimente konnte bestätigt werden, dass das *hyd5*-Gen für die Infektion von Getreidepflanzen bedeutsam ist. Darüber hinaus zeigten diese

Experimente, dass die hier entwickelte RT-LAMP Methode auch bei anderen als den in der Publikation von Minenko et al. (2014) verwendeten Housekeeping-Genen angewendet werden kann. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass es mit Hilfe der RT-LAMP auch möglich ist, nach mRNA-Extraktion aus infizierten Pflanzendie Expression der *F. graminearum*-Genenachzuweisen. Somit wurde mit der RT-LAMP eine neue, äußerst schnelle, präzise und kostengünstige Methode entwickelt, welche den spezifischen Nachweis der Gen-Expression im Myzel und in infizierten Pflanzen erlaubt.



## Zusammenfassung

### 5.1 English Summary

Hydrophobins are a group of small secreted proteins ubiquitously found in filamentous fungi. Some hydrophobins were shown to have functions in fungal development, while others seem to lack known function. Hydrophobins play an important role in plant colonisation, formation of microsclerotia and conidia. The hydrophobins are also virulence factors and they are able to influence the pathogenesis of fungi. Bioinformational analysis showed that *F. graminearum* harbours five different hydrophobin genes. Four of them code for class I and one for class II hydrophobins. The hydrophobin 5 class II from *F. graminearum* is a homologue to the hydrophobin 5 from *F. culmorum*. Cellular functions of FgHyd5p are still unknown. FgHyd5p, the *F. graminearum* homologue to FcHyd5p (*F. culmorum*), is a small secreted protein typified by the presence of 8 cysteine residues at conserved positions. FgHyd5p is characterized by formation of low stability aggregates and solubility in organic solvents. The aim of the study was to investigate the influence of Hydrophobin 5 on the morphology, growing and virulence of *F. graminearum*.

The results obtained do not support the hypothesis according to which FgHyd5p has an effect on the morphology of *F. graminearum* since no differences in colony morphology and growth rate, hyphal length and diameter or biomass production occurred between any of the transformants and the *F. graminearum* wild type. Knockout of the *fghyd5* gene appears to cause a reduction of spore length and an increase in spore numbers. The results obtained after using an *F. graminearum* reporter strain expressing sGFP under the control of the *Phyd5* promoter suggest that FcHyd5p was not expressed in media with different carbon (raffinose, salicin, sucrose, glycose and glycerin) or nitrogen (sodium nitrate, ammonium chloride and ammonium nitrate) sources, respectively. Moreover, results did not suggest any pH dependent *fghyd5* gene expression. FgHyd5p appears to have an effect on the hydrophobicity of hyphae resulting in an easy wettable phenotype of transformants. It was shown that FgHyd5p is produced on the surfaces of hyphae and probably leads to the adhesion of mycelia to hydrophobic surfaces. Results of studies also indicate that FgHyd5p appears to have an effect on the virulence of *F. graminearum*. Wheat and barley plants infected with spores from an Fg $\Delta$ hyd5 knockout strain at EC 0-9 were significantly longer in EC 12 as compared to plants that were

infected with the *F. graminearum* parent strain. Using the *F. graminearum* sGFP reporter strain and histological analysis first evidence was provided that the gene is expressed during plant infection and may thus play a role as a virulence factor during the infection of cereals.

A novel application for reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) was developed which enables rapid, accurate and inexpensive analysis of gene expression directly in pure culture mycelia and in infected plant tissue after mRNA isolation. Our results demonstrate that RT-LAMP facilitates the direct amplification of mRNA of *F. graminearum* extracted from pure fungal mycelia and from infected plants without previous *in vitro* transcription to cDNA. The RT-LAMP can thus be applied to detect the expression of genes in *F. graminearum* from hyphae and infected plant materials. This method can be applied in experiments quickly without careful mRNA extraction and following cDNA synthesis. Due to inclusion of two reactions, the LAMP reaction and the reverse transcription of mRNA in one assay as well as the use of the highly active *Bst* 2.0 DNA polymerase, gene expression can be detected within 40 min. Compared to real-time PCR and microarrays, RT-LAMP needs no expensive equipment and a minimum of pre and post experimental handling. We propose to use RT-LAMP as a faster, less expensive and highly accurate method for the qualitative expression analysis of fungal genes in pure cultures and infected plants.

### 5.2 Deutsche Zusammenfassung

*Fusarium* spp. ist ein Fadenpilz, der zu den echten Pilzen (Eumycetes) gehört. Die meisten Repräsentanten dieser weltweit verbreiteten Gattung sind harmlose Saprotroph, Manche Arten, wie z.B. *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. verticillioides* sind wichtige Pflanzen-Pathogene. *F. graminearum* befällt für die Lebensmittelindustrie relevante Getreidesorten, wie Weizen und Gerste und verursacht FHB. Um die Pflanzen zu befallen besitzt der Pilz eine Reihe von Virulenzfaktoren: Mykotoxine, G-Proteingekoppelte Rezeptoren, Kutinasen und Lipasen. Ein möglicher Virulenz Faktor von *F. graminearum* könnten Hydrophobine sein. Die natürlichen Funktionen des Klasse II Hydrophobins FgHyd5p im Hinblick auf den Phänotyp von *F. graminearum*, die physiologischen und morphologischen Eigenschaften des Pilzes sowie auf sein Potential zur Auslösung von Gushing in Bier sind bisher nicht bekannt.

Hydrophobine sind eine Gruppe von kleinen, nur aus Fadenpilzen sekretierbaren Proteinen. Manche Hydrophobine haben lebenswichtige Funktionen innerhalb des Lebenszyklus des Pilzes. Die Hydrophobine spielen auch eine wichtige Rolle bei der Kolonisation des Wirtes, bei der Bildung von Fruchtkörper, Mikrosclerotia und Konidien. Die Hydrophobine sind Virulenzfaktoren und somit bewirken sie die Pathogenese. Unterschiedliche Nahrungsquellen, wie z.B. Kohlenstoff und Stickstoff, beeinflussen die Produktion der Hydrophobine in den Pilzen. Aber es gibt Pilze, bei denen die Funktion der Hydrophobine bis heute ungeklärt ist. Es wurde bioinformatisch nachgewiesen, dass das *F. graminearum* fünf Hydrophobin-Gene im Genom hat. Vier Gene kodieren das Hydrophobin der Klasse I und eines das Hydrophobin der Klasse II. Das Hydrophobin 5 der Klasse II des *F. graminearum* ist ein Homolog zu dem *F. culmorum*-Hydrophobin 5, welches in der Lage ist, Gushing zu verursachen. Die Funktionen des Hydrophobin 5 des *F. graminearum* (FgHyd5p) sind noch nicht erforscht. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des FgHyd5-Proteins auf die Morphologie, das Wachstum und die Virulenz von des *F. graminearum* zu untersuchen. Durch die Herstellung von drei Transformanten, unter anderem auch eines *hyd5*-Gen-Deletionsmutanten und eines sGFP - Reporter-Stammes, wurden Hinweise erarbeitet, dass das FgHyd5 verschiedene Funktionen im Lebenszyklus des *F. graminearum* hat. Zwar hat das FgHyd5p weder einen Einfluss auf die Kolonie noch auf die Hyphen-Morphologie oder Biomasse-Produktion, aber es trägt anscheinend zur Hydrophobizität

der Hyphen bei. Die Hyphen des *hyd5*-Gen-Deletionsmutanten erwiesen sich hydrophiler als die Hyphen es *F. graminearum* Wild Typs. Aus den erhaltenen Daten kann abgeleitet werden, dass das FgHyd5p zum Anstieg der Sporenzahl, zur Verkürzung der Sporen und zur Senkung der Zellzahl pro Konidien führt. Die Keimfähigkeit der Konidien bleibt jedoch unbeeinflusst. Die Untersuchungen des Reporter-Stammes, durch den GFP unter der Kontrolle des *hyd5*-Gen-Promoters produziert wird, unterstützen nicht die Hypothese, nach der FgHyd5p in den ruhenden und auskeimenden Sporen produziert wird. Darüber hinaus wird die Produktion des FgHyd5p anscheinend nicht durch Raffinose, Salizin, Saccharose, Glukose, Glycerin, Natriumnitrat, Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat stimuliert. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der pH-Wert ebenso wenig einen stimulierenden oder hemmenden Einfluss auf die FgHyd5p-Produktion hat. Manche Hydrophobine tragen zur Anheftung der Hyphen an wasserabweisende Oberflächen (WAO) bei. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das FgHyd5p in denjenigen Hyphen produziert wird, die im Kontakt mit der WAO wachsen. Schlussfolgernd konnte festgestellt werden, dass das FgHyd5p wahrscheinlich eine Funktion bei der Anheftung der Hyphen an die WAO hat. Die Ergebnisse zweier unterschiedlicher Infektionsveruche auf Gerste und Weizen (Blatt- und Keimlingsinfektion) deuten darauf hin, dass das FgHyd5p einer der Virulenzfaktoren des *F. graminearum* sein könnte und einen Einfluss auf die Pathogenität des Pilzes haben könnte. Experimente, die mit einem sGFP-Reporter-Stamm durchgeführt wurden, fördern die Hypothese, nach der FgHyd5p während der Infektion von Gerste und Weizen produziert wird.

Da das *F. graminearum* vier Hydrophobin Gene besitzt, wäre es von wissenschaftlichem Interesse, vier der anderen Hydrophobine aus den Chromosomen zu eliminieren und so doppelte *knock out*-Transformanten herzustellen, um die genauen Funktionen und das Zusammenwirken vier anderer Hydrophobine zu erforschen. Da Hydrophobine nicht der einzige Faktor beim Gushing sind, wäre es auch sinnvoll, Gerste und Weizen mit den *F. graminearum*-Hydrophobin-Transformanten zu infizieren und aus ihren Körnern Malz herzustellen, um dieses zu brauen und zu untersuchen, in welchem Maße das infizierte Malz auch ohne Hydrophobine das Gushing beeinflusst.

Es wurde eine neue Anwendung für eine Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) für die Pilze entwickelt. Diese Methode erlaubt nach der RNA Isolation eine schnellere, exakte und billige Analyse von Genexpression

direkt im Mycelium des Pilzes und in infiziertem pflanzlichen Gewebe. Außerdem ermöglicht sie eine direkte mRNA-Amplifikation ohne vorherige Umschreibung der mRNA auf die cDNA. Die RT -LAMP kann angewendet werden, um eine Gen-Expression im *F. graminearum* bei Hyphen und infiziertem Pflanzenmaterial nachzuweisen. Dieses Verfahren kann nicht nur in Experimenten wie von Schmidt-Heydt et al. (2011) angewendet werden, sondern immer dann, wenn aus Zeitgründen auf eine sorgfältige mRNA-Extraktion und eine folgende cDNA -Synthese verzichtet werden soll. Durch den gleichzeitige Ablauf von zwei Reaktionen in einer einzigen Analyse, der LAMP-Reaktion und der reverse Transkription der mRNA, sowie durch die Verwendung der hochaktiven Bst 2.0 DNA-Polymerase kann die Genexpression innerhalb von 40min nachgewiesen werden. Im Vergleich zu real-time PCR und Microarrays braucht man für die RT-LAMP keine teure Ausrüstung und nur ein Minimum am Pre-und Post experimentellem Umgang. Wir schlagen vor, die RT -LAMP als schnellere, preiswertere und sehr genaue Methode zur qualitativen Analyse der Expression von Pilzgenen in Reinkulturen und infizierten Pflanzen zu verwenden.

## Literaturverzeichnis

- Andrew, J. et al., 1996. The stoned locus of *Drosophila melanogaster* produces a dicistronic transcript and encodes two distinct polypeptides. *Genetics*, 143, pp.1699–1711.
- Andrie, R.M., Martinez, J.P. & Ciuffetti, L.M., 2005. Development of ToxA and ToxB promoter-driven fluorescent protein expression vectors for use in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 97(5), pp.1152–1161.
- Aoki, T. & O'Donnell, K., 1999a. Morphological and molecular characterization of *Fusarium pseudograminearum* sp. nov., formerly recognized as the Group 1 population of *F. graminearum*. *Mycologia*, 91(4), pp.597–609.
- Aoki, T. & O'Donnell, K., 1999b. Morphological characterization of *Gibberella coronicola* sp. nov., obtained through mating experiments of *Fusarium pseudograminearum*. *Mycoscience*, 40, pp.443–453.
- Asch, D.K. & Kinsey, J.A., 1990. Relationship of vector insert size to homologous integration during transformation of *Neurospora crassa* with the cloned am (GDH) gene. *Molecular and general genetics*, 221(1), pp.37–43.
- Askolin, S. et al., 2006. Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. *Biomacromolecules*, 7(4), pp.1295–301.
- Askolin, S. et al., 2005. The *Trichoderma reesei* hydrophobin genes *hfb1* and *hfb2* have diverse functions in fungal development. *FEMS microbiology letters*, 253(2), pp.281–8.
- Ausubel, F.M. et al., 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: J. Wiley.
- Babaeizad, V. et al., 2009. Over-expression of the cell death regulator BAX inhibitor-1 in barley confers reduced or enhanced susceptibility to distinct fungal pathogens. *Theoretical and applied genetics*. 118(3), pp.455–63.
- Bae, Y.S. & Knudsen, G.R., 2000. Cotransformation of *Trichoderma harzianum* with beta-glucuronidase and green fluorescent protein genes provides a useful tool for monitoring fungal growth and activity in natural soils. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), pp.810–5.
- Bayry, J. et al., 2012. Hydrophobins-unique fungal proteins. *PLoS pathogens*, 8(5), p.e1002700.
- Bell-Pedersen, D., Dunlap, J.C. & Loros, J.J., 1992. The *Neurospora circadian* clock-controlled gene, *ccg-2*, is allelic to *eas* and encodes a fungal hydrophobin required

- for formation of the conidial rodlet layer. *Genes & Development*, 6(12a), pp.2382–2394.
- Bidochka, M.J. et al., 1995. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. *Mycological Research*, 99(4), pp.403–406.
- Bidochka, M.J., Koning, J.D.E. & Leger, R.J.S.T., 2001. Analysis of a genomic clone of hydrophobin ( ssg A ) from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiological research* , 105(March), pp.360–364.
- Blumenthal, T., 1998. Gene clusters and polycistronic transcription in eukaryotes. *Bioessays*, 20(6), pp.480–487.
- Blumenthal, T., 2004. Operons in eukaryotes. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, 3(3), pp.199–211.
- Boller, T., 1995. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual review of Plant Physiology and plant mollecular biology*, 46, pp.189–214.
- Bottalico, A., 1998. Fusarium disease of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80, pp.85–103.
- Bourett, T.M. et al., 2002. Reef coral fluorescent proteins for visualizing fungal pathogens. *Fungal Genetics and Biology*, 37(3), pp.211–220.
- Bowden, C.G. et al., 1996. Lack of association between Cerato-ulmin production and Virulence in *Ophiostoma novo-ulmi*. *Molecular plant-microbe interactions* , 9(7), pp.556–564.
- Brand, A., 1995. GFP in Drosophila. *Trends in Genetics*, 11(8), pp.324–325.
- Brasier, C.M., Kirk, S. a. & Tegli, S., 1995. Naturally occurring non cerato-ulmin producing mutants of *Ophiostoma novo-ulmi* are pathogenic but lack aerial mycelium. *Mycological Research*, 99(4), pp.436–440.
- Bundock, P. & Hooykaas, P.J., 1996. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), pp.15272–5.
- Burgess, A. et al., 2010. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2 / PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , 107, pp. 12564–12569.
- Burkert, B., 2006. Untersuchungen zu den strukturchemischen Ursachen von Primärem Gushing. Dissertation. TUM. 1-186

- Campbell, R.E. et al., 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(12), pp.7877–82.
- Carpenter, C.E. et al., 1992. Effect of a virus on accumulation of a tissue-specific cell-surface protein of the fungus *Cryphonectria (Endothia) parasitica*. *Molecular plant-microbe interactions*, 4(6), pp.55–61.
- Cavinder, B. et al., 2012. Sexual development and ascospore discharge in *Fusarium graminearum*. *Journal of visualized experiments*, (61), pp.1–5.
- Chanfreau, G. et al., 1998. Processing of a dicistronic small nucleolar RNA precursor by the RNA endonuclease Rnt1. *The EMBO journal*, 17(13), pp.3726–37.
- Chang, D.C. et al., 2006. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *The journal of the American Medical Association*, 296(8), pp.953–63.
- Chiu, W. et al., 1996. Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current biology*, 6(3), pp.325–30.
- Christian, M. et al., 2011. Novel perspectives in gushing analysis: a review. *Journal of the institute of brewing*, 117(3), pp.295–313.
- Chung, K.-R., Daub, M.E. & Ehrenshaft, M., 2003. Expression of the cercosporin toxin resistance gene (CRG1) as a dicistronic mRNA in the filamentous fungus *Cercospora nicotianae*. *Current genetics*, 43(6), pp.415–424.
- Colhoun, J., Taylor, G.S. & Tomlinson, R., 1968. *Fusarium* diseases of cereals. *Transactions of the British Mycological Society*, 51(3-4), pp.397–404.
- Cormack, B., 1998. Green fluorescent protein as a reporter of transcription and protein localization in fungi. *Current opinion in microbiology*, 1(4), pp.406–10.
- Cormack, B.P. et al., 1997. Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology*, 143, pp.303–11.
- Cormack, B.P., Valdivia, R.H. & Falkow, S., 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1 Spec No), pp.33–8.
- Covert, S.F. et al., 2001. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research*, 105(March), pp.259–264.
- Cubitt, A. et al., 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Techniques*, 20(November), pp.448–455.
- Cuomo, C. a et al., 2007. The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization. *Science (New York, N.Y.)*, 317(5843), pp.1400–2.



- Davis, D. et al., 1993. Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. *Phytochemistry*, 32(3), pp.607–611.
- Denschlag, C., Vogel, R.F. & Niessen, L., 2012. Hyd5 gene-based detection of the major gushing-inducing *Fusarium* spp. in a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International journal of food microbiology*, 156(3), pp.189–96.
- Dignani, M.C. & Anaissie, E., 2004. Human fusariosis. *Clinical microbiology and infection*, 10 Suppl 1, pp.67–75.
- Ding, S. et al., 2009. Transducin beta-like gene FTL1 is essential for pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Eukaryotic cell*, 8(6), pp.867–76.
- Dirr, F. et al., 2010. AfMkk2 is required for cell wall integrity signaling, adhesion, and full virulence of the human pathogen *Aspergillus fumigatus*. *International journal of medical microbiology*, 300(7), pp.496–502.
- Divon, H.H. & Fluhr, R., 2007. Nutrition acquisition strategies during fungal infection of plants. *FEMS microbiology letters*, 266(1), pp.65–74.
- Dixon, R.A. & Harrison, M.J., 1994. Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology*, 32, pp.479–501.
- Donofrio, N.M. et al., 2006. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Fungal genetics and biology*, 43(9), pp.605–17.
- Dyer, P.S., 2002. Hydrophobins in the lichen symbiosis. *New Phytologist*, 154(1), pp.1–4.
- Espy, M. et al., 2006. Real-Time PCR in clinical microbiology : applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(1), pp.166–243.
- Fanga, W. et al., 2004. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection markes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(1), pp.18–24.
- Fernández-Abalos, J.M. et al., 1998. Plant-adapted green fluorescent protein is a versatile vital reporter for gene expression, protein localization and mitosis in the filamentous fungus, *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology*, 27(1), pp.121–30.
- Fuchs, U., Czymbek, K.J. & Sweigard, J. a, 2004. Five hydrophobin genes in *Fusarium verticillioides* include two required for microconidial chain formation. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 41(9), pp.852–64.
- Gale, L.R. et al., 2005. Chromosome complement of the fungal plant pathogen *Fusarium graminearum* based on genetic and physical mapping and cytological observations. *Genetics*, 171(3), pp.985–1001.

- Garbe, L.A., Schwarz, P. & Ehmer, A., 2009. Beer gushing. In C. W. Bamforth, I. . Russell, & G. Stewart, eds. *Handbook of alcoholic beverages series, beer a Quality perspective*. Elsevier Ltd., pp. 185–212.
- García-Ríos, M. et al., 1997. Cloning of a polycistronic cDNA from tomato encoding gamma-glutamyl kinase and gamma-glutamyl phosphate reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(15), pp.8249–54.
- Gavet, O. & Pines, J., 2010. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Developmental cell*, 18(4), pp.533–43.
- Gelvin, S.B., 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “Gene-Jockeying” tool. *Microbiology and Molecular biology Reviews*, 67(16).
- Gerlach, W. et al., 1982. *The genus Fusarium – a pictorial Atlas*, Berlin Dahlem.
- Gjertsen, P., 1967. Gushing in beer; its nature, cause and prevention. *Brewers Digest*, 42(5), pp.80–84.
- Gjertsen, P., Trolle, B. & Andersen, K., 1963. Wealthered barley as a contributory of gushing in beer. *Proceedings of the European Brewery Convention*, pp.320–341.
- Gjertsen, P., Trolle, B. & Anderson, K., 1965. Studies on gushing caused by microorganisms, especially *Fusarium spec.* *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Stockholm*, pp.428–438.
- Golkari, S. et al., 2007. Microarray analysis of *Fusarium graminearum*-induced wheat genes: identification of organ-specific and differentially expressed genes. *Plant biotechnology journal*, 5(1), pp.38–49.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. & Boller, T., 1999. A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 18(3), pp.277–84.
- Goswami, R., Kistler, H. & Corby, 2004. Pathogen profile heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular microbiology*, 5(6), pp.515–525.
- Gray, T.A., Saitoh, S. & Nicholls, R.D., 1999. An imprinted, mammalian bicistronic transcript encodes two independent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(May), pp.5616–5621.
- De Groot, M.J.A. et al., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. *Nature Biotechnology*, 16, pp.839–842.
- Guenther, J.C. & Trail, F., 2005. The development and differentiation of *Gibberella zeae* (anamorph: *Fusarium graminearum*) during colonization of wheat. *Mycologia*, 97(1), pp.229–37.

- Gutiérrez, S.P. et al., 2013. Protein body formation in stable transgenic tobacco expressing elastin-like polypeptide and hydrophobin fusion proteins. *BMC biotechnology*, 13, p.40.
- Gutleb, A.C., Morrison, E. & Murk, A.J., 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 11(3-4), pp.309–20.
- Haas, J., Park, E.C. & Seed, B., 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current biology : CB*, 6(3), pp.315–24.
- Haikara, A. et al., 2005. Method for determining a gushing factor for a beverage. Patent EP 1071949
- Hanahan, D., 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), pp.557–580.
- Hansen, G. & Chilton, M.D., 1999. Lessons in gene transfer to plants by a gifted microbe. *Current topics in microbiology and immunology*, 240, pp.21–57.
- Harris, L.J. et al., 1981. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on Maize. , 83(10).
- Haseloff, J. & Amos, B., 1995. GFP in plants. *Science*, 11(8), pp.328–329.
- Hood, E.E. et al., 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of bacteriology*, 168(3), pp.1291–301.
- Hooykaas PJJ., Roobol, C & Schilperoort RA, 1979. Regulation of the Transfer of TI Plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of general microbiology* 4, pp. 99–109.
- Hou, Z. et al., 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (MGV1) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Molecular plant-microbe interactions* , 15(11), pp.1119–27.
- Hynes, M.J., 1996. Genetic transformation of filamentous fungi. *Journal of Genetics*, 75(3), pp.297–311.
- Izumitsu, K. et al., 2010. Class I hydrophobin BcHpb1 is important for adhesion but not for later infection of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Plant Pathology*, 76(4), pp.254–260.
- Jenczmionka, N.J. et al., 2003. Mating, conidiation and pathogenicity of *Fusarium graminearum*, the main causal agent of the head-blight disease of wheat, are regulated by the MAP kinase *gpmk1*. *Current genetics*, 43(2), pp.87–95.

- Kanamori, Y. et al., 2010. A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. *The Journal of biological chemistry*, 285(47), pp.36933–44.
- Kazmierczak, P. et al., 2005. A Hydrophobin of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, is required for stromal pustule eruption. *Eukaryotic cell*, 4(5), pp.931–936.
- Kershaw, M.J., Wakley, G. & Talbot, N.J., 1998. Complementation of the mpg1 mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *The EMBO journal*, 17(14), pp.3838–49.
- Kim, S. et al., 2005. MHP1, a *Magnaporthe grisea* hydrophobin gene, is required for fungal development and plant colonization. *Molecular microbiology*, 57(5), pp.1224–37.
- Klimes, A. & Dobinson, K.F., 2006. A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal genetics and biology B*, 43(4), pp.283–94.
- Komari, T., Halperin, W. & Nester, E.W., 1986. Physical and functional map of supervirulent *Agrobacterium tumefaciens* tumor-inducing plasmid pTiBo542. *Journal of bacteriology*, 166(1), pp.88–94.
- Kozak, M., 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*, 299(1-2), pp.1–34.
- Kumar, L. et al., 2010. Systematic discovery of regulatory motifs in *Fusarium graminearum* by comparing four *Fusarium* genomes. *BMC genomics*, 11, p.208.
- Kwan, a H.Y. et al., 2006. Structural basis for rodlet assembly in fungal hydrophobins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), pp.3621–6.
- Lasztity, R. & Wöller, L., 1974. Toxinerzeugung von *Fusarium*arten und ihr Vorkommen in Landwirtschaftlichen Produkten. *Chemical engineering*, 19(4), pp.249–262.
- Latge, J.-P. et al., 1986. Ultrastructure and chemical composition of the ballistospore wall of *Conidiobolus obscurus*. *Experimental Mycology*, 10, pp.99–113.
- Laugé, R. & De Wit, P.J., 1998. Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal genetics and biology*, 24(3), pp.285–97.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. & Ludwig, R.A., 1991. A DNA transformation-competent Arabidopsis genomic library in *Agrobacterium*. *Nature Biotechnology*, 9, pp.963–967.

- Lee, S., 1991. Expression of growth/differentiation factor 1 in the nervous system: conservation of a bicistronic structure. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress, Stockholm*, 88(May), pp.4250–4254.
- Leger, R.J.S., Joshi, L. & Roberts, D., 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. *Applied and environmental microbiology*, 62(2), pp.709–713.
- Lienemann, M. et al., 2013. Structure-function relationships in hydrophobins: probing the role of charged side chains. *Applied and environmental microbiology*, 79(18), pp.5533–8.
- Linder, M., Szilvay, G.R. & So, H., 2002. Surface adhesion of fusion proteins containing the hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei*. *VTT Biotechnology*, 11, pp.2257–2266.
- Linder, M.B., 2009. Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 14(5), pp.356–363.
- Linder, M.B. et al., 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS microbiology reviews*, 29(5), pp.877–96.
- Lindner, W.A., Hoffmann, C. & Grisebach, H., 1988. Rapid elicitor-induced chemiluminescence suspension cultures. *Phytochemistry*, 27(8), pp.2501–2503.
- Lorang, J.M. et al., 2001. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Fungal biology*, 67(5), pp.1987–1994.
- Lugones, L.G., Wosten, H.A.B. & Wessels, J.G.H., 1998. A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology*, 144, pp.2345–2353.
- Lugones, L.G. et al., 1999. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus*. *Mycological Research*, 103(5), pp.635–640.
- Lutterschmid, G. et al., 2011. Heterologous expression of surface-active proteins from barley and filamentous fungi in *Pichia pastoris* and characterization of their contribution to beer gushing. *International journal of food microbiology*, 147(1), pp.17–25.
- Lutterschmid, G. et al., 2010. Induction of gushing with recombinant class II hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* and the impact of hop compounds on its gushing potential. *Journal of the institute of brewing*, 116(4), pp.339–347.
- Lysøe, E., Seong, K.-Y. & Kistler, H.C., 2011. The transcriptome of *Fusarium graminearum* during the infection of wheat. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(9), pp.995–1000.

- Mankel A, et al., 2000. A hydrophobin accumulated in the Hartig' net of ectomycorrhiza formed between *Tricholoma terreum* and its compatible host tree is missing in an incompatible association. *Journal of applied botany* 74, pp. 95–99.
- Mankel, A. et al., 2002. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. *Applied and environmental microbiology*, 68(3), pp.1408–1413.
- Maor, R. et al., 1998. Use of green fluorescent protein (GFP) for studying development and fungal-plant interaction in *Cochliobolus heterostrophus*. *Mycological Research*, 102(4), pp.491–496.
- Markell, S.G., 2003. Fusarium Head Blight inoculum: species prevalence and *Gibberella zeae* spore type. *Plant disease*, 87(7), pp.814–820.
- Matthews, K.R., Tschudi, C. & Ullu, E., 1994. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. *Genes & Development*, 8(4), pp.491–501.
- Michielse, C.B. et al., 2005. Agrobacterium-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Current genetics*, 48(1), pp.1–17.
- Mikus, M. et al., 2009. Differential regulation and posttranslational processing of the class II hydrophobin genes from the biocontrol fungus *Hypocrea atroviridis*. *Applied and environmental microbiology*, 75(10), pp.3222–9.
- Miller D. & Greenhalgh R., 1985. Nutrient effects on the biosynthesis of trichothecenes and other metabolites by *Fusarium graminearum*. *Mycologia*, 77(1), pp.130–136.
- Minenko, E., Vogel, R.F. & Niessen, L., 2014. Application of one-step reverse transcription loop mediated isothermal amplification (reverse transcription LAMP) for rapid detection of fungal gene expression in pure culture mycelia and in planta. *Mycoscience*, 55, pp.425–430.
- Minet, M. et al., 1979. Organization and expression of a two-gene cluster in the arginine biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & general genetics*, 168(3), pp.299–308.
- Mosbach, A. et al., 2011. Lack of evidence for a role of hydrophobins in conferring surface hydrophobicity to conidia and hyphae of *Botrytis cinerea*. *BMC microbiology*, 11(1), p.10.
- Müller, E. & Loeffler, W., 1992. *Mykologie - Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner*, Stuttgart: Thieme Verlag.
- Muñoz, G. et al., 1997. Hydrophobin gene *srh1*, expressed during sporulation of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Current genetics*, 32(3), pp.225–30.

- Nahalkova, J. & Fatehi, J., 2003. Red fluorescent protein (DsRed2) as a novel reporter in *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters*, 225(2), pp.305–309.
- Nakari-Setälä, T. et al., 1997. Differential expression of the vegetative and spore-bound hydrophobins of *Trichoderma reesei*-cloning and characterization of the hfb2 gene. *European journal of biochemistry*, 248(2), pp.415–23.
- Nelson, P.E., Toussoun, T. & Marasas, W.F.O., 1983. *Fusarium species, an illustrated manual for identification*, The Pennsylvania State University Press.
- Nganje, W.E. et al., 2002. Estimating the economic impact of a crop disease: the case of Fusarium Head Blight in the wheat and barley. *2002 National Fusarium Head Blight Forum Proceedings*, 275, pp.275–281.
- Nielsen, P.S. et al., 2001. HCf-6, a novel class II hydrophobin from *Cladosporium fulvum*. *Microbiological research*, 156(1), pp.59–63.
- Niessen, L. et al., 2013. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology*, 36(2), pp.191–206.
- Niessen, L. & Vogel, R.F., 2010. Detection of *Fusarium graminearum* DNA using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *International journal of food microbiology*, 140(2-3), pp.183–91.
- Notomi, T. et al., 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), p.E63.
- O'Donnell, K. et al., 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. *Fungal genetics and biology*, 52, pp.20–31.
- Oliveira, P.M. et al., 2012. Fundamental study on the influence of Fusarium infection on quality and ultrastructure of barley malt. *International journal of food microbiology*, 156(1), pp.32–43.
- Oliveira, P.M., Waters, D.M. & Arendt, E.K., 2013. The impact of *Fusarium culmorum* infection on the protein fractions of raw barley and malted grains. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(5), pp.2053–65.
- Paananen, A. et al., 2003. Structural hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. *Biochemistry*, 42(18), pp.5253–8.
- Paris, S. et al., 2003. Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology*, 69(3), pp.1581–1588.
- Parry, D.W., McLeod, L. & Jenkinson, P., 1993. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals - a review. *Plant pathology*, 44, pp.207–238.

- Permyakova, N. V., Shumnyi, V.K. & Deineko, E. V., 2009. Agrobacterium-mediated transformation of plants: Transfer of vector DNA fragments in the plant genome. *Russian Journal of Genetics*, 45(3), pp.266–275.
- Pfenninger H, 1996. *Brautechnische Analysenmethoden*. Selbstverlag der MEBAK, Freising.
- Petfalski, E., Dandekar, T. & Henry, Y., 1998. Processing of the precursors to small nucleolar RNAs and rRNAs requires common components. *Molecular and cellular biology*, 18(3), pp.1181–1189.
- Pines, J., 1995. GFP in mammalian cells. *Trends in genetics : TIG*, 11(8), pp.326–7.
- Prasher, D.C. et al., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111, pp.229–233.
- Pritsch, C. et al., 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 13(2), pp.159–69.
- Rammert, M. & Pahl, H., 1992. Entlastung der Flasche Maßnahmen zur Verminderung des Aufschäumens bei der Abfüllung von CO<sub>2</sub>-haltiger Getränke, Teil 1. *Getränkeindustrie*, 12, pp.999–1001.
- Ribichich, K.F. et al., 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant disease*, 84(7), pp.794–802.
- Richards, O.W., 1959. *Effective use and proper care of the microtome*, New York: Spencer.
- Richey, M. et al., 1989. Transformation of filamentous fungi with plasmid DNA by electroporation. *Physiological Plant Pathology*, 79, pp.844–847.
- Rosa, G.J.M., Leon, N. De & Rosa, A.J.M., 2006. Review of microarray experimental design strategies for genetical genomics studies. *Physiological genomics*, 28, pp.15–23.
- Ruiz-Díez, B., 2002. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *Journal of applied microbiology*, 92(2), pp.189–95.
- Ruzin, S.E., 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*, New York: Oxford University Press, Inc.
- Sachs, A.B., Sarnow, P. & Hentze, M.W., 1997. Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, 89(6), pp.831–8.
- Sahu, K.K., Hazama, Y. & Ishihara, K.N., 2006. Gushing in canned beer: the effect of ultrasonic vibration. *Journal of colloid and interface science*, 302(1), pp.356–62.



- Sanchez, O. & Aguirre, J., 1996. Efficient transformation of *Aspergillus nidulans* by electroporation of germinated conidia. *Fungal genetics Newsletter*, 48, pp.48–51.
- Sarlin, T. et al., 2005. Fungal hydrophobins as predictors of the gushing activity of Malt. *Journal of the institute of brewing*, 111(2), pp.105–111.
- Sarlin, T. et al., 2012. Identification and characterization of gushing-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. *Journal of basic microbiology*, 52(2), pp.184–94.
- Sarver, B. a J. et al., 2011. Novel *Fusarium* head blight pathogens from Nepal and Louisiana revealed by multilocus genealogical concordance. *Fungal genetics and biology*, 48(12), pp.1096–107.
- Scherm, B. et al., 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. *Molecular plant pathology*, 14(4), pp.323–341.
- Scherrer, S. et al., 2000. Interfacial self-assembly of fungal hydrophobins of the lichen-forming ascomycetes *Xanthoria parietina* and *X. ectaneoides*. *Fungal genetics and biology*, 30(1), pp.81–93.
- Scherrer, S., Haisch, A. & Honegger, R., 2002. Characterization and expression of XPH1, the hydrophobin gene of the lichen-forming ascomycete *Xanthoria parietina*. *New Phytologist*, 154(1), pp.175–184.
- Schmidt-Heydt, M. et al., 2011. Modelling the relationship between environmental factors, transcriptional genes and deoxynivalenol mycotoxin production by strains of two *Fusarium* species. *Journal of the Royal Society*, 8(54), pp.117–26.
- Schmidt-Heydt, M., Schunck, T. & Geisen, R., 2009. Expression of a *gfp* gene in *Penicillium nordicum* under control of the promoter of the ochratoxin A polyketide synthase gene. *International journal of food microbiology*, 133(1-2), pp.161–6.
- Schmoll, M. et al., 2010. Recombinant production of an *Aspergillus nidulans* class I hydrophobin (DewA) in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is promoter-dependent. *Applied microbiology and biotechnology*, 88(1), pp.95–103.
- Schuren, F.H. & Wessels, J.G., 1990. Two genes specifically expressed in fruiting dikaryons of *Schizophyllum commune*: homologies with a gene not regulated by mating-type genes. *Gene*, 90(2), pp.199–205.
- Segers, G.C. et al., 1999. Isolation and characterisation of five different hydrophobin-encoding cDNAs from the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Molecular & general genetics*, 261(4-5), pp.644–52.
- Seidl-Seiboth, V. et al., 2011. Novel hydrophobins from *Trichoderma* define a new hydrophobin subclass: protein properties, evolution, regulation and processing. *Journal of molecular evolution*, 72(4), pp.339–51.

- Sharman, M., Gilbert, J. & Chelkowski, J., 1991. A survey of the occurrence of the mycotoxin moniliformin in cereal samples from sources worldwide. *Food additives and contaminants*, 8(4), pp.459–66.
- Shen, W. & Forde, G.B., 1989. Efficient transformation of *Agrobacterium* spp. by high voltage electroporation. *Nucleic acids research*, 17(20), p.8385.
- Shokribousjein, Z. et al., 2011. Hydrophobins beer foaming and gushing. *Cerevisia*, 35(4), pp.85–101.
- Sloan, J., Kinghorn, J.R. & Unkles, S.E., 1999. The two subunits of human molybdopterin synthase: evidence for a bicistronic messenger RNA with overlapping reading frames. *Nucleic acids research*, 27(3), pp.854–8.
- Snoeijers, S.S. et al., 2000. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 106, pp.493–506.
- Somma, S.A. et al., 2014. Phylogenetic analyses of *Fusarium graminearum* strains from cereals in Italy, and characterisation of their molecular and chemical chemotypes. *Crop and Pasture Science*, 65(1), pp. 52-60.
- Sorin, C. et al., 2001. Cloning and expression analysis of a new hydrophobin cDNA from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus*. *Current Genetics*, 39(5-6), pp.335–339.
- Spanu, P., 1998. Deletion of HCF-1, a hydrophobin gene of *Cladosporium fulvum*, does not affect pathogenicity on tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 52, pp.323–334.
- Spanu, P., 1997. HCF-1, a hydrophobin from the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Gene*, 193(1), pp.89–96.
- Spellig, T., Bottin, a & Kahmann, R., 1996. Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Molecular & general genetics*, 252(5), pp.503–9.
- Stack, R.W., 2003. History of *Fusarium* head blight with emphasis on North America. In W. R. Leonard, K. J.; Bushnell & Book, eds. *Fusarium head blight of wheat and barley*. Department of Plant Pathology, North Dakota State University, Fargo, p. 34.
- Sternberg, C. et al., 1999. Distribution of bacterial growth activity in flow-chamber biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), pp.4108–17.
- Strausbaugh, C.A. & Maloy, O.C., 1986. *Fusarium* scab of irrigated wheat in Central Washington. *Plant disease*, 70, pp.1104–1106.
- Stübner, M. et al., 2010. Heterologous expression of the hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* in *Pichia pastoris* and evaluation of its surface activity and

- contribution to gushing of carbonated beverages. *International journal of food microbiology*, 141(1-2), pp.110–5.
- Stübner, M.R., 2011. Hydrophobins and Fungispumins – surface active fungal proteins with a role in foam stability of carbonated beverages and fungus- plant interaction. Dissertattion. TUM.
- Sung, J. & Cook, R.J., 1981. Effect of water potential on reproduction and sport germination by *Fusarium roseum* “Graminearum”, “Culmorum”, and “Avenaceum.” *Phytopathology*, 71, pp.499–504.
- Tagu, D. et al., 2001. Immunolocalization of hydrophobin HYDPT-1 from the ectomycorrhizal basidiomycete *Pisolithus tinctorius* during colonization of *Eucalyptus globulus* roots. *New Phytologist*, 149(1), pp.127–135.
- Talbot, N.J. et al., 1996. MPG1 Encodes a fungal hydrophobin involved in surface interactions during infection-related development of *Magnaporthe grisea*. *The Plant cell*, 8(6), pp.985–999.
- Talbot, N.J., Ebbole, D.J. & Hamer, J.E., 1993. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant cell*, 5(11), pp.1575–90.
- Temple, B. et al., 1997. Cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the causal agents of Dutch elm disease, is a parasitic fitness factor. *Fungal genetics and biology*, 22(1), pp.39–53.
- Temple, B. & Horgen, P.A., 2000. Biological roles for cerato-ulmin, a hydrophobin secreted by the elm pathogens , *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*. *Mycologia*, 92(1), pp.1–9.
- Templeton, M.D., Rikkerink, E.H. & Beever, R.E., 1994. Small, cysteine-rich proteins and recognition in fungal-plant interactions. *Molecular plant-microbe interactions*, 7, pp.320–325.
- Tetlow, I.J. & Farrar, J.F., 1993. Apoplastic sugar concentration and pH in barleyleaves infected with brown rust. , 44(262), pp.929–936.
- Thau, N. et al., 1994. Rodletless mutants of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and immunity*, 62(10), pp.4380–8.
- Tookey, H.L. et al., 1972. Toxic effects of a butenolide mycotoxin and of *Fusarium tricinctum* cultures in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 160(11), pp.1522–6.
- Torkkeli, M. et al., 2002. Aggregation and self-assembly of hydrophobins from *Trichoderma reesei*: low-resolution structural models. *Biophysical journal*, 83(4), pp.2240–7.

- Trembley, M.L., Ringli, C. & Honegger, R., 2002a. Differential expression of hydrophobins DGh1, DGH2 and DGH3 and immunolocalization of DGH1 in strata of the lichenized basidiocarp of *Dictyonema glabratum*. *New Phytologist*, pp.185–195.
- Trembley, M.L., Ringli, C. & Honegger, R., 2002b. Hydrophobins DGH1, DGH2, and DGH3 in the lichen-forming basidiomycete *Dictyonema glabratum*. *Fungal genetics and biology*, 35(3), pp.247–59.
- Tschanz, A.A.T. et al., 2012. The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 68(2), pp.327–340.
- Unkles, S.E. et al., 2014. Synthetic biology tools for bioprospecting of natural products in eukaryotes. *Chemistry & biology*, 21(4), pp.502–8.
- Urban, M. et al., 2003. The *Fusarium graminearum* MAP1 gene is essential for pathogenicity and development of perithecia. *Molecular plant pathology*, 4(5), pp.347–359.
- Vanden, W. et al., 1997. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surfaces. *BioTechniques*, 23, pp.686–690.
- Vera-Estrella, R., Blumwald, E. & Higgins, V.J., 1992. Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells: evidence for the involvement of active oxygen species. *Plant physiology*, 99(3), pp.1208–15.
- Viterbo, A.D.A. & Chet, I., 2006. TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum*, is involved in plant root colonization. *Molecular plant pathology*, 7, pp.249–258.
- De Vocht, M.L. D.E. et al., 1998. Structural characterization of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. *Biophysical journal*, 74(4), pp.2059–68.
- De Vocht, M.L.D.E. et al., 2002. Self-assembly of the hydrophobin SC3 proceeds via two structural intermediates. *Protein Science*, pp.1199–1205.
- Voigt, C. a, Schäfer, W. & Salomon, S., 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 42(3), pp.364–75.
- De Vries, O.M. et al., 1999. Identification and characterization of a tri-partite hydrophobin from *Claviceps fusiformis*. A novel type of class II hydrophobin. *European journal of biochemistry*, 262(2), pp.377–85.
- De Vries, O.M. et al., 1993. Insoluble hydrophobin complexes in the walls of *Schizophyllum commune* and other filamentous fungi. *Archives of microbiology*, 159, pp.330–335.

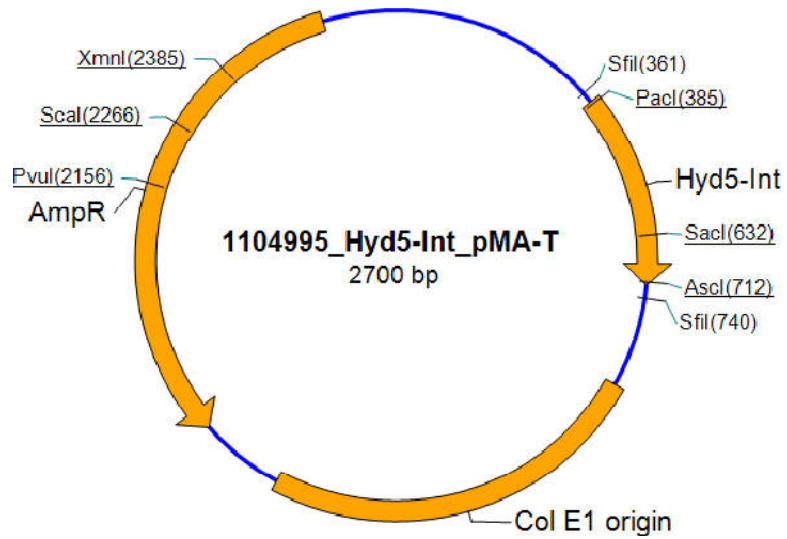
- Wagener, J. et al., 2008. The putative alpha-1,2-mannosyltransferase AfMnt1 of the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus* is required for cell wall stability and full virulence. *Eukaryotic cell*, 7(10), pp.1661–73.
- Wall, A.A., Phillips, M.A. & Kelly, L.E., 2005. Effective translation of the second cistron in two *Drosophila* dicistronic transcripts is determined by the absence of in-frame AUG codons in the first cistron. *The Journal of biological chemistry*, 280(30), pp.27670–8.
- Walter, F., 1980. *Das Mikrotom, Leitfaden der Präparationstechnik und des Mikrotomschneidens* 2nd ed., Ernst Leitz Wetzlar: Schmitt, Wolfgang.
- Walter, S., Nicholson, P. & Doohan, F.M., 2010. Action and reaction of host and pathogen during *Fusarium* head blight disease. *The New phytologist*, 185(1), pp.54–66.
- Wang, H., Qi, M. & Cutler, a J., 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic acids research*, 21(17), pp.4153–4..
- Wanjiru, W.M., Zhensheng, K. & Buchenauer, H., 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat heads. *European journal of plant Pathology*, 108, pp.803–810.
- Wessels, J.G.H., 1994. Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annual Review of Phytopathology*, 32, pp.413–437.
- Wessels, J.G.H., 2000. Hydrophobins, unique fungal proteins. *Mycologist*, 14(4), pp.153–159.
- Van Wetter, M. A, Wösten, H. A. & Wessels, J.G., 2000. SC3 and SC4 hydrophobins have distinct roles in formation of aerial structures in dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Molecular microbiology*, 36(1), pp.201–10.
- Whiteford, J.R. et al., 2004. Stage-specific cellular localisation of two hydrophobins during plant infection by the pathogenic fungus *Cladosporium fulvum*. *Fungal genetics and biology*, 41(6), pp.624–34.
- Whiteford, J.R. & Spanu, P.D., 2002. Hydrophobins and the interactions between fungi and plants. *Molecular plant pathology*, 3(5), pp.391–400.
- Whiteford, J.R. & Spanu, P.D., 2001. The hydrophobin Hcf-1 of *Cladosporium fulvum* is required for efficient water-mediated dispersal of conidia. *Fungal genetics and biology*, 32(3), pp.159–68.
- Wojtaszek, P., 1997. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *The Biochemical journal*, 322,, pp.681–92.
- Wösten, B., 2001. Hudrophobins: multipurpose proteins. *Annual review of microbiology*, 55, pp.625–46.

- Wösten, H. A. et al., 1999. How a fungus escapes the water to grow into the air. *Current biology*, 9(2), pp.85–8.
- Wösten, H.A. et al., 1995. Interfacial self-assembly of a *Schizophyllum commune* hydrophobin into an insoluble amphipathic protein membrane depends on surface hydrophobicity. *Colloids and Surfaces*, 5, pp.189–195.
- Wösten, H. A., Schuren, F.H. & Wessels, J.G., 1994. Interfacial self-assembly of a hydrophobin into an amphipathic protein membrane mediates fungal attachment to hydrophobic surfaces. *The EMBO journal*, 13(24), pp.5848–54.
- Wosten, H.A., De Vries, O. & Wessels, J., 1993. Interfacial self-assembly of a fungal hydrophobin into a hydrophobic rodlet layer. *The Plant cell*, 5(11), pp.1567–1574.
- Yli-Mattila, T., 2010. Ecology and evolution of toxigenic *Fusarium* species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), pp.7–18.
- Zapf, M.W. et al., 2006. Cloning of wheat LTP1500 and two *Fusarium culmorum* hydrophobins in *Saccharomyces cerevisiae* and assessment of their gushing inducing potential in experimental wort fermentation. *Journal of the institute of brewing*, 112(3), pp.237–245.
- Zapf, M.W., 2006. Blasenstabilisierung in Bier. Dissertation. TUM
- Zhong, Y.H. et al., 2007. Agrobacterium-mediated transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(6), pp.1348–1354.
- Zhou, W., Kolb, F.L. & Riechers, D.E., 2005. Identification of proteins induced or upregulated by *Fusarium* head blight infection in the spikes of hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). *Genome*, 48(5), pp.770–80.
- Zupan, J. et al., 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 23(1), pp.11–28.

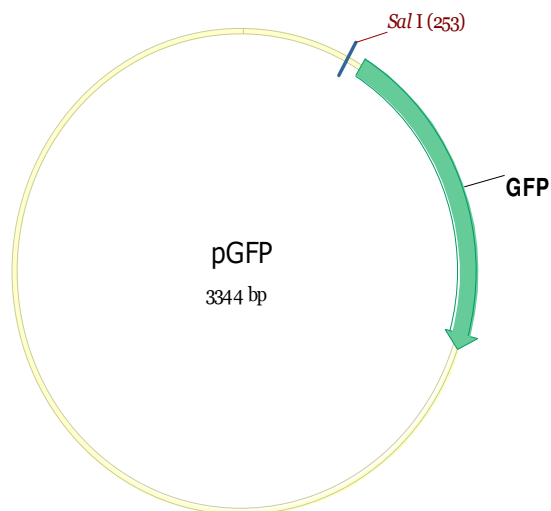
# Anhang

## 7.1 Plasmid Karten

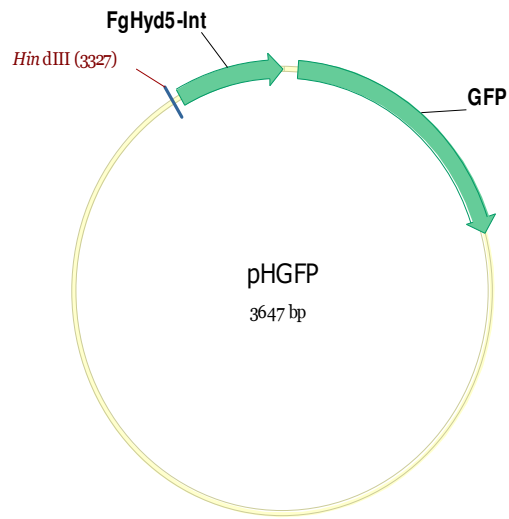
### 7.1.1 pHyd5-Int



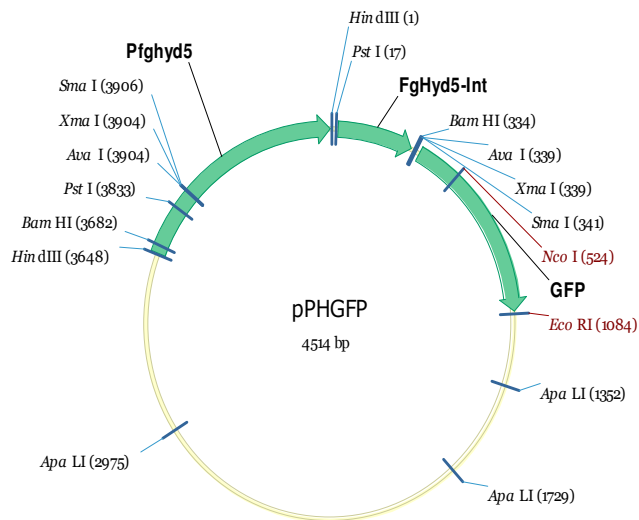
### 7.1.2 pGFP



### 7.1.3 pHGFP

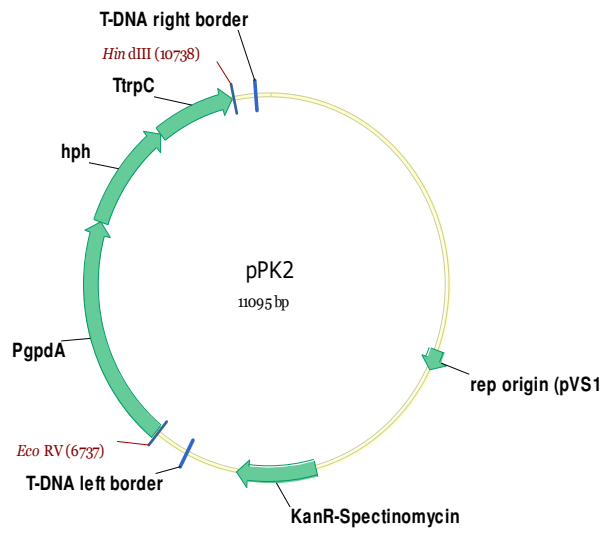


### 7.1.4 pPHGFP

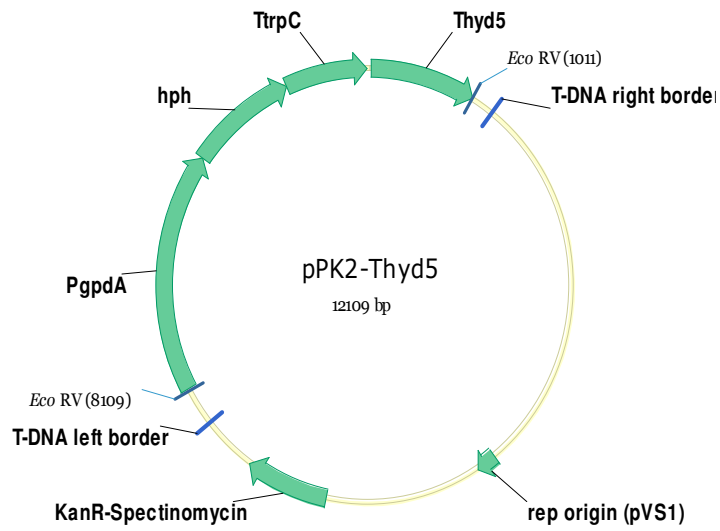




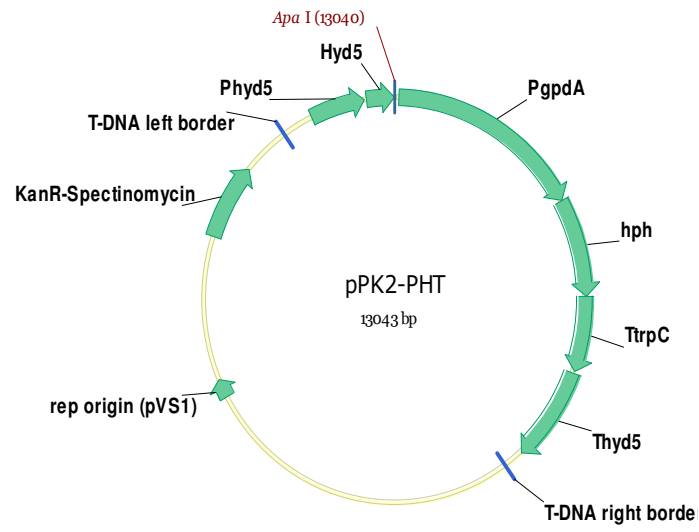
### 7.1.5 pPK2



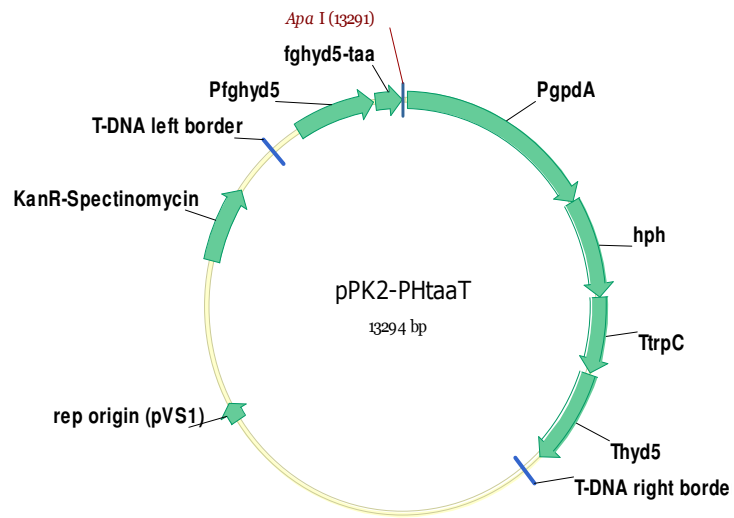
### 7.1.6 pPK2-Thyd5



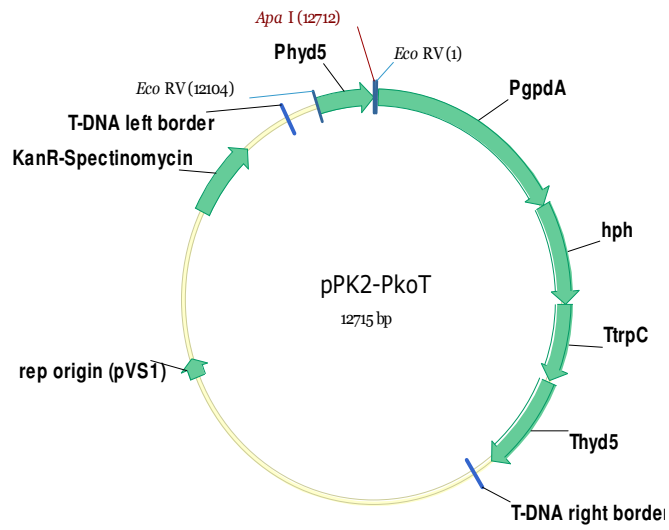
### 7.1.7 pPK2-PHT



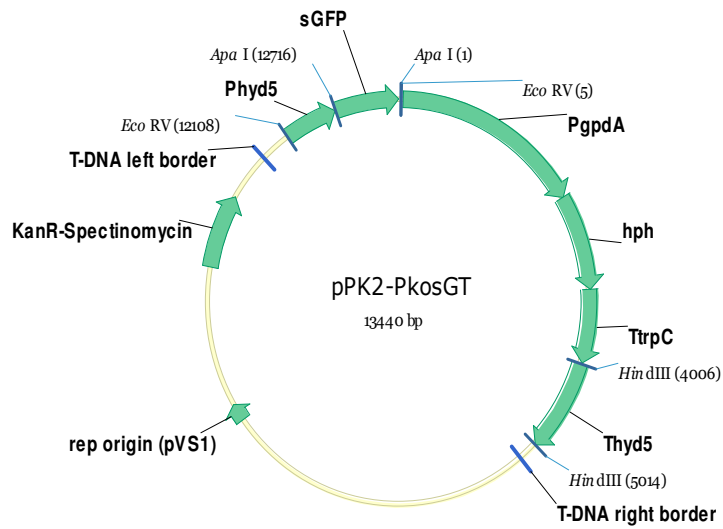
### 7.1.8 pPK2-PHtaaT



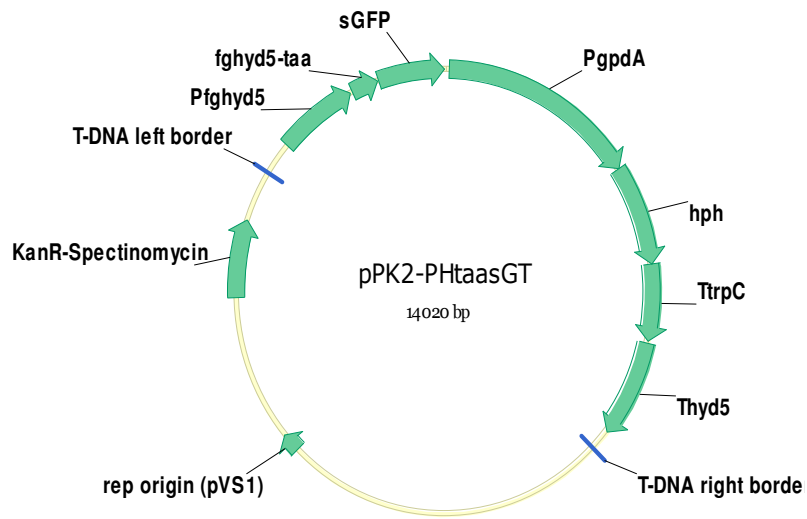
### 7.1.9 pPK2-PkoT



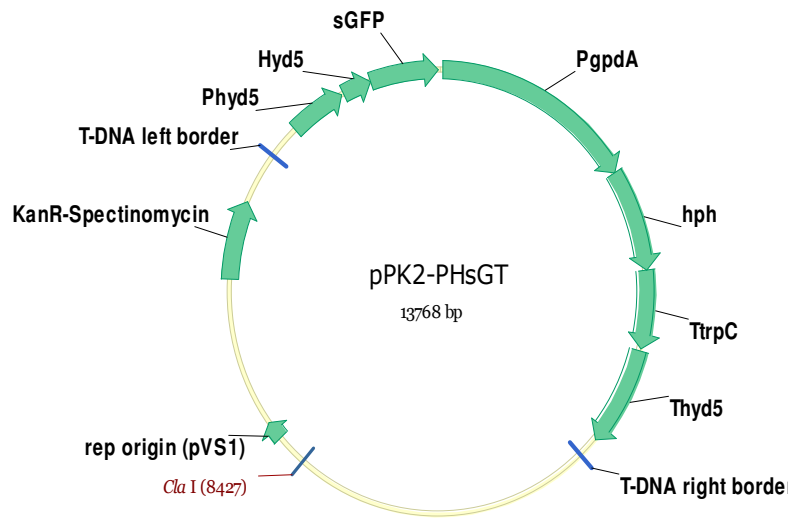
### 7.1.10 pPK2-PkosGT



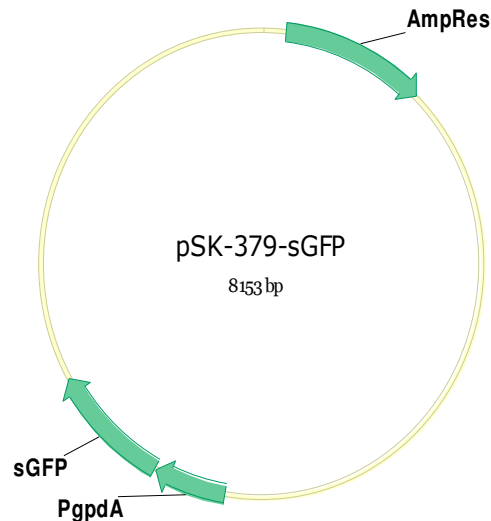
### 7.1.11 pPK2.PHTaasGT



### 7.1.12 pPK2-PHsGT



### 7.1.13 pSK-379-sGFP



## 7.2 Sequenzen

### 7.2.1 *FgHyd5* – genomische Sequenz (*FG01831.1*)

ATGAAGTTCTCACTCGCCGCCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCTTCCCGCCAACGAGAA  
 GCGACAGGCCTACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGCTGTGCTACTGATGTCTTGG  
 GTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCGTAAGTCATCGAGCCTTTCGATAAGAGACCAAGCTAACAT  
 GAACAGCCCCTTCGTCTCCCACCGACGCCGACAATTCAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCG  
 AGCTCGCTGCTGTGCCTCCCATCGTGAGTTTGCCTTGGTATTGATGATTAATAATAAAAATCTCT  
 TTAGCTTGACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGACTAA

### 7.2.2 *FgHyd5* – Sequenz ohne Intronen

ATGAAGTTCTCACTCGCCGCCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCTTCCCGCCAACGAGAA  
 GCGACAGGCCTACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGCTGTGCTACTGATGTCTTGG  
 GTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTCTCCCACCGACGCCGACAATTCAGCGCTGTC  
 TCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGCTGCTGTGCCTCCCATCCTTGACCAAGGCATCCTCTGCAA  
 TACCCCTACTGGTGTCCAGGACTAA

### 7.2.3 *FgHyd5* vorhergesagter Promoter-Bereich

GTGGAGATTTTCTTGATTCTGGGGCATTGGATCCATGATCAGCGATAAGCGACCTCGCGAAAATCAT  
 GATATAGAGTCAAGTTGCCTTGTACGGAAGGATTAGTCCGCACTTAAAGACAGCCACTTACATCTTTT  
 CTCAACAAATAACTTAGTGTCTGGGGTTGGAACAAGTAATCTGCAGGTACAGTGTGATGTATGGATA  
 GGCTCAGATGAGCTGAGAGACAAGCAGAAACAGGAACAAAGCGGACATCCCGGGACGATATTATG  
 ACGATCAAGCAGTACCTTTTCAGCGAATCAACCAACTCAATGTGACATTCCAGCAAACAATGACATCG  
 GCCAGCAGCAGCAGTCCCAAATTAGTCCTTAACAAAGTCCACTATAATTGGATGAAACGTCGACAG  
 CTCATATAACTTGCTGTGGCGATTTCGGCAGTCTGGCATCCCTTTCAGCGATACCTCCGACGACCCAA  
 CCAATTAAGGTTCAATTAGCTTGGATCGTCGAAACGCGTTAATGCGTTGCTATCCCCTGTCCGGCT  
 GCGTACCTCGTTGTTGCGACGCTACAACAGGTTTCGAGGCTCCATTTAAGCTGCGATATAGACCGG  
 GATGGTAGGTTTCAAACGTCACCGCTTAAACATGATTTCTATCATTGTTGAGTGGCAATAGGTCAT  
 TGAGAGATGACGACAAGAAATTGCTTATGCTCATCTTATTAATAAATGGACTTGTGTGGACGGCGAGT

TGTATAAATACAGAGGCGTTGTGACCGGAAATCACTTTTGAATCCTCATTACATCCTCAAAGCACA  
TCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCCTAAACCAATCACTCTATTCATC

#### 7.2.4 *FgHyd5* vorhergesagter Terminatorbereich

AGTGTACAGAGTTTGTGACCTTGTATAATGCGAATACGATATTGGAATTGATTGATGGATTATATAAA  
CCGAGTTCTGACTTTGTTATAATATTAGTTCTAACAAGTTACATATTTGAATCAACCTCTTAATTCGTCT  
TACTGCGGGATCTTGTGTTTTGCCATCTACGGATCCCACAAAATGCATGTACCTTGTAAAGTATGCTT  
ATCTTAAACTCGATGGCATGTGCATTGTAGTATGGCATCCTTAATTAACCCCACGATGGAAGTGTTC  
AGCCGGATGCACCTACAAAGGCTTGGTATTTTGGCTTGATAGCACTGGATCGAATACGAGTATGGTT  
TTGTAGTTCCGAGCCTATTTGACAGATCCGTCCACTTAATTCCGTCCGGAATATACACAAGCCCAAT  
GAAACAAAGCACCCACACACAGTTGTACGCTATGATACCCGTTAAGATTGTTTCAATTCTTACAAC  
CTAGAGCTTGGAGCTCTTTCTCCGATGCTCCCTGTTCTCTACTTGAACAATTTCTAAATCAGCATCCTT  
GTCGTCCCAGGCCAACTCTTACAAGGCCACCATCCTGGCCAAACACAGGGTCACACTTGGGCTTTT  
GAACCCTCCACGATTGCCATAGTCGCCACCACGCTTGACAAAATCCCAGTTTCCACCATTGTAAGCT  
CCCATCATGGTATATCCCGACAATTCAACCTCTCCAGGGCCTGCCGTGGGTCATCAGCTTCGATGCC  
GTGTCCAACACCGGGTGATAGGAGCTTGAAGCTTGCTTCGGGTTTGGTGTGTGTGTTTTGTGTGCTA  
CGCTGCTGGGATGACAAAACATCTCCCGCTCAGCTTGAAGCTCAATGCCGCCATTCTCCCAAGAC  
GAGCCATAGGTGTTTTCTGAAGTCGTCTGATGTATCACCTGCACCGAAGCGAATAGTTGCGGTTT  
CTGAAAGGACTGCCATGCACTCATGCGCTCCGAGTGAAAGTGAGATA

#### 7.2.5 sGFP-Sequenz

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA  
CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC  
CCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCACT  
ACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCGCCAT  
GCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCACTACAAGACCCGCGC  
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGA  
GGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGC  
CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGT  
GCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC  
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGATGGTCCTGC  
TGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

#### 7.2.6 Verwendete Teilsequenz des Chromosom 1 von *F. graminearum* PH1

GCTTCTACGTGGCACATAATTTATTGGGAATTCATGCGCATTAAATCGATTCCGGTGGACGTCCGATGCC  
CAGGTAATAACGGTCAACGTTTACGATCCCAGCTTCGAAACACCAAACCTCTGGGCATCGCGATCGC  
ATGATTTCTCGAGAATCAAGAATCCCCAGATGTACATAGGTAATACGTTAACCATATTCTTCATGGAA  
TCTTCGCAAGAGTACCATAAGGAGATTTTCTTGATTCTGGGGCATTGGATCCATGATCAGCGATAA  
GCGACCTCGCGAAAATCATGATATAGAGTCAAGTTGCCTTGTACGGAAGGATTAGTCCGCACTTTAA  
GACAGCCACTTACATCTTTTCTCAACAAATAACTTAGTGTCTGGGGTTGGAACAAGTAATCTGCAGGT  
ACAGTGTGATGTATGGATAGGCTCAGATGAGCTGAGAGACAAGCAGAAACAGGAACAAAGCGGAC  
ATCCCGGGACGATATTATGACGATCAAGCAGTACCTTTTCAGCGAATCAACCAACTCAATGTGACATT  
CCAGCAAACAATGACATCGGCCAGCAGCAGCAGTCCCAAATTAGTCTTAACAAAGTCCACTATAA  
TTGGATGAAACGTGACAGCTCATATAACTTGCTGTGGCGATTTCCGGCAGTCTGGCATCCCTTTGAGC  
GATACCTCCGACGACCCAACCAATTAAGGTTCAATTAGCTTGGATCGTCAAACGCGTTAATGCG  
TTGCTATCCCCTGTCCGGTGGCGTACCTCGTTGTTGCGACGCTACAACAGGTTTCGAGGCTCCATTT

AAGCTGCGATATAGACCGGGATGGTAGGTTTCAAACGTCAACGGCTTTAACATGATTTCTATCATT  
GTTGAGTGGCAATAGGTCATTGAGAGATGACGACAAGAAATTGCTTATGCTCATCTTATTAATAATG  
GACTTGTGTGGACGGCGAGTTGTATAAATACAGAGGCGTTGTGACCGGAAATCACTTTTCAAATCCT  
CATTACATCCTCAAAGCACATCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCTAAACCAATCACTCTATT  
CATCATGAAGTTCTCACTCGCCGCGTTGCCCTCCTTGAGCCGTTGTCTCTGCCCTCCCGCCAACGA  
GAAGCGACAGGCCTACATCCCTTGACAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGCTGTGCTACTGATGTCT  
TGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCGTAAGTCATCGAGCCTTTGATAAGAGACCAAGCTAA  
CATGAACAGCCCCTTCGTCTCCACCGACGCGACAACCTCAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCA  
GCGAGCTCGCTGTGTCTCCCATCGTGAGTTTGCCTTTGGTATTGATGATTAATAACTAAAA  
TCTCTTTAGCTTGACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGACTAAAGTGTACAGAG  
TTTGTGACCTTGTATAATGCGAATACGATATTGGAATTGATTGATGGATTATATAAACCGAGTTCTGA  
CTTTGTTATAATATTAGTTCTAACAAGTTACATATTTGAATCAACCTCTTAATTCGTCTTTACTGCGGG  
ATCTTGTGTTTTGCCCATCTACGGATCCCAAAAATGCATGTACCTTGTAAGTATGCTTATCTTAAACT  
CGATGGCATGTGCATTGTAGTATGGCATCCTTAATTAACCCACGATGGAAGTTCAGCCGGATG  
CACCTACAAAGGCTTGGTATTTGGCTTGATAGCACTGGATCGAATACGAGTATGGTTTTGTAGTTCC  
GAGCCTATTTGACAGATCCGTCCTTAATTCCGTCGGAATATACACAAGCCCAATGAAACAAAG  
CACCCACACACAGTTGTACGCTATGATACCCGTTAAGATTGTTTCAATTCTTACAACCTAGAGCTTG  
GAGCTCTTTCTCCGATGCTCCCTGTTCTCTACTTGAACAATTTCTAAATCAGCATCCTTGTCTGCCCA  
GGCCAACTCTTACAAGGCCACCATCCTGGCCAAACACAGGGTCACACTTGGGCTTTGAAACCCTCCA  
CGATTTGCCATAGTCGCCACCACGCTTGACAAAATCCCAGTTTCCACCATTGTAAGCTCCCATCATGG  
TATATCCCGACAATTCAACCTCTCCAGGGCCTGCCGTGGTTCATCAGCTTCGATGCCGTGTCCAACA  
CCGGGTGATAGGAGCTTGAACCTCTGCTTCGGGTTTGGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTG  
GGATGACAAAACATCTCCCGCTTACGCTTGAAGCTCAATGCCGCCATTCTCCCAAGACGAGCCATA  
GGTGTCTTTCTGAAGGTCGTCTGATGTATCACCTGCACCGAAGCGAATAGTTGCGGTTCTGAAAGG  
ACTGCCATGCACTCATGCGCTTCCGAGTGAAAGTGAGATAATTGGGTTTGGGGATATCGAAAGATCC  
ATTCCACGTCCCATCCGTTCTTGGTGAACGTTTCCCAAACCTTCAACGGGGTCGCAATGCGTGGTGCCT  
GGTCTTTAGCTAACACATTTTTATAGTGCAGAAGTGGTCTTGGTGAATTTGGAACGAGATCTGTGG  
GGAGGAGATAGTATTCCTTGTGTTGGACATGATTGGTATGGAATATGTACAATAATTTATGATGG  
ATAGATATGTGACTTATTATGACAATGAGTGTTCGCCGAGCATCCGGGGTTGATATAAATAAGCGA  
A

Teilsequenz von Chromosome 1 (NCBI Reference Sequence: NT\_086521.1.) von *F. graminearum* (Nukleotide 61366-64209) Unterschtrichen - Sequenz des 5'bp50minPhyd Primers. Orange - Sequenz von Phyd5. Blau - Sequenz von *hyd5*. Rot - Sequenz des Terminator*hyd5*.

## 7.3 Fusarium Transformanten Sequenzierungen

### 7.3.1 FgTK

## Anhang

```
ATGAAGTTCACICGCGCCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCTTCCCGCC
-----C
*

AACGAGAAGCGACAGGCCTACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGTCTGT
NACGAGAAGCGACAGGCCTACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGTCTGN
*****

GCTACTGATGTCTTGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTCTCCCACC
GCTACTGATGTCTTGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTCTCCCACC
*****

GACGCCGACAATTICAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGCTGCTGTGTC
GACGCCGACAATTICAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGCTGCTGTGTC
*****

CTCCCCATCCTTGAACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGACTAAGGG
CTCCCCATCCTTGAACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGACTAAGGG
*****

CCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTTGGTCCCATCCTGGTCGAGCTG
CCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTTGGTCCCATCCTGGTCGAGCTG
*****

GACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
GACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
*****

TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
*****

ACCCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
ACCCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
*****

AAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
AAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
*****

TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
*****

CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
*****

CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
*****

AACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCG-AGGACGGCAGC-GTGCAG-
AACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGGAGGACGGCAGNCGTGCAGG
*****

CTCGCC-GACCACTACCAGC-AGAACACCCCC-ATCGGCG-ACGGCCCCGIGCTGCTGCC
CTCGNCCGACCACTACCANNICAGAACACCCCCCATCGGCNGACGGCCCCNN--TGCT---
**** * ***** ***** ***** ***** ****
```

**FgTK Transformanten Sequenzierung:** gDNA der Transformante FgTK wurde mit Primer 5' HydSall-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz des *hyd5* Gens ohne Introns und des *sgfp* Gens (Nukleotide 1-597). Untere Reihe Sequenz der Transformante FgTK. Roter Pfeil - Anfang des *hyd5* Gens. Schwarzer Pfeil -Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Schnittstelle ApsI zwischen *hyd5*-



Gen und *sgfp* Gen. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. ---= keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

```

CCCATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTG
-----TCTTGGTCGAGCTG
*****

GACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
GACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
*****

TACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
TACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
*****

ACCCTCGTGACCACCTTCACTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
ACCCTCGTGACCACCTTCACTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
*****

AAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCAIGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
AAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCAIGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
*****

TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
*****

CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
*****

CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
CACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
*****

AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
AACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
*****

GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAICGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAICGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
*****

CACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG
CACTACCTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG
*****

GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAG
GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAG
*****

TAAAGGGCCC-----
TAAAGGGCCC-----GCNNA
*****

```

FgTK Transformanten Sequenzierung: gDNA der Transformante FgTK gDNA wurde mit Primer 5' sGFP<sub>Apal</sub>-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz des *sgfp* Gens mit Apal Schnittstellen. Untere Reihe: Sequenz der Transformante FgTK. Schwarzer Pfeil - Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Apal Schnittstelle. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. ---= keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

## Anhang

```
----->
-----ATGAAGTTCTCACTCGCCGCCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCT
GGTCGACATGAAGTTCTCACTCGCCGCCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCT
*****

TCCCGCCAACGAGAAGCGACAGGCCTACATCCCTTGCACTGGCCTCTACGGCACTTCTCA
TCCCGCCAACGAGAAGCGACAGGCCTACATCCCTTGCACTGGCCTCTACGGCACTTCTCA
*****

GTGCTGTGCTACTGATGCTTGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTC
GTGCTGTGCTACTGATGCTTGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTC
*****

TCCACCGACGCCGACAACCTCAGCGCTGCTGCGCCGAGATTGCCAGCGAGCTCGCTG
TCCACCGACGCCGACAACCTCAGCGCTGCTGCGCCGAGATTGCCAGCGAGCTCGCTG
*****

CTGIGTCTCCCCATCCTTGACCAAGGCAICCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGA
CTGNTCCTCCCNTCCT-GACCAAG-----
**** ***** **** *****

CTAA
----
```

FgTK Transformanten Sequenzierung: gDNA der Transformante FgTK gDNA wurde mit Primer 3' HydSall-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz des *hyd5* Gens ohne Introns. Untere Reihe: Sequenz der Transformante FgTK. Schwarzer Pfeil - Anfang des *gfp* Gens. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. ---= keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

7.3.2 FgFP

```

      →
ATGAAGTTCTCACTCGCCGCCGTTGCCCTCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCTTCCCGCC
-----TCIGCCTTTC--GNC
*****  ****  *  *

AACGAGAAGCGACAGGCCTACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGTCTGT
AACGAGAAGCGACAGGCCTANATCCCTTGCAGTGNNTCTACGGCANTTNTCAGTGTCTGT
*****  ****  *  *

GCTACTGAIGTCTTGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTCTCCCACC
NNTACTGATGTCTTGGGTGTTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCCCTTCGTCTCCCACC
*****

GACGCCGACAACTTCAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGTGTCTGTGTC
GACGCCGACAACTTCAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGTGTCTGTGTC
*****

CTCCCCATCCTTGACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGACTAAGGG
CTCCCCATCCTTGACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGAC--GGG
*****  ***

CCCA →
CCCA TGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC GGGG TGGTGCCCATCCTGGT CGAGCTG
CCCA TGGT GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACC GGGG TGGTGCCCATCCTGGT CGAGCTG
*****

GACGGCGACGTA AACCGCCACAAGTT CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
GACGGCGACGTA AACCGCCACAAGTT CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
*****

TACGGCAAGCTGACCC TGAAGTT CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCC
TACGGCAAGCTGACCC TGAAGTT CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCC
*****

ACCCTCGTGACCACCTTCACTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
ACCCTCGTGACCACCTTCACTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
*****

AAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
AAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
*****

TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT CGAGGGCGACACC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTT CGAGGGCGACACC
*****

CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
*****

CACAACTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
CACAACTGGAGTACA ACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
*****

AACGGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
AACGGCATCAAGGTGA-----
*****

GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCAATCGGGCAGGGCCCGTGTCTGTGCCCGACAAC
-----

```

FgFP Transformanten Sequenzierung: gDNA der Transformante FgFP wurde mit Primer 3' sGFP<sub>Apal</sub>-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz des *hyd5* Gens ohne Introns mit Stop Codon und *sgfp* Gen (Nukleotide 1-597). Untere Reihe: Sequenz der Transformante FgFP. Roter Pfeil - Anfang des *hyd5* Gens. Schwarzer Pfeil - Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Schnittstelle zwischen *hyd5*-Gen und *sgfp* Gen. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der

theoretischen Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. Rote Kreis - zeigt Abwesenheit des Stop Codons im *hyd5* Gen von FgFP

```

GCNAATNACTCTATTCTAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACATGAAGTTCTCACTCGCCG
-----ATGAAGTTCTCACTCGCCG
*****

CCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCTTCCCGCCAACGAGAAGCGACAGGCCT
CCGTTGCCCTCCTTGGAGCCGTTGTCTCTGCCCTTCCCGCCAACGAGAAGCGACAGGCCT
*****

ACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGTGTGCTACTGATGICTTGGGTG
ACATCCCTTGCAGTGGCCTCTACGGCACTTCTCAGTGTGTGCTACTGATGICTTGGGTG
*****

TTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCGTAAGAGCCCCTTCGTCTCCACCGACGCCGACAAC
TTGCCGACCTCGACTGCGGAAACCGTAAGAGCCCCTTCGTCTCCACCGACGCCGACAAC
*****

TTCAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGCTGCTGTGTCCTCCCCATCCTT
TTCAGCGCTGTCTGCGCCGAGATTGGCCAGCGAGCTCGCTGCTGTGTCCTCCCCATCCTT
*****

GACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGACGGGCCATGGTGAGCAAG
GACCAAGGCATCCTCTGCAATACCCCTACTGGTGTCCAGGAC-----TAA-----
*****

```

FgFP Transformanten Sequenzierung: gDNA der Transformante FgFP wurde mit Primer 5' PhydEcoRV-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz der Transformante FgFP. Untere Reihe: Sequenz des *hyd5* Gens ohne Introns und *sgfp* Gen (Nukleotide 1-12). Schwarzer Pfeil - Anfang des *hyd5* Gens. Rote Pfeil - Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Schnittstelle Apal zwischen *hyd5*-Gen und *sgfp* Gen. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

## Anhang

```
CCCATGGT→
-----
GACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
-ACGGCGACGTAA-CGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC
*****
TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
TACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCC
*****
ACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
ACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCACTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG
*****
AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
AAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
*****
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC
*****
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG
*****
CACAACTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
CACAACTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAG
*****
AACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
AACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTC
*****
GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
GCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGCTGCTGCCCGACAAC
*****
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG
CACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATG
*****
GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAG
GTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACTCACGGCATGGACGAGCTGTACAAG
*****
TAAGGCCC---
TAAGGCCC GCG
*****
```

FgFP Transformanten Sequenzierung: gDNA der Transformante FgFP wurde mit Primer 5' sGFP<sub>Apal</sub>-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz des *gfp* Gens und Apal Schnittstellen. Untere Reihe: Sequenz der FgFP Transformante. Schwarzer Pfeil -Anfang des *hyd5* Gens. Schwarze Kasten - Schnittstelle Apal. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

### 7.3.3 FgΔhyd5

```

GTGGAGATTTTCTTGATTCTGGGGCATTGGATCCATGATCAGCGATAAGCGACCTCGCGA
-----CGA
***

AAATCATGATATAGAGTCAAGTTGCCTTGTACGGAAGGATTAGTCCGCACTTTAAGACAG
NGATCATGATATAGAGTCAAGTTGCCTTGTACGGAAGGATTAGTCCGCACTTTAAGACAG
*****

CCACTTACATCTTTTCTCAACAAATAACTTAGTGTCTGGGGTTGGAACAAGTAATCTGCA
CCACTTACATCTTTTCTCAACAAATAACTTAGTGTCTGGGGTTGGAACAAGTAATCTGCA
*****

GGTACAGTGTGATGTATGGATAGGCTCAGATGAGCTGAGAGACAAGCAGAAACAGGAACA
GGTACAGTGTGATGTATGGATAGGCTCAGATGAGCTGAGAGACAAGCAGAAACAGGAACA
*****

AAGCGGACATCCCGGGACGATATTATGACGATCAAGCAGTACCTTTTCAGCGAATCAACC
AAGCGGACATCCCGGGACGATATTATGACGATCAAGCAGTACCTTTTCAGCGAATCAACC
*****

AACTCAATGTGACATTCAGCAAACAATGACATCGGCCAGCAGCAGTCCCAAATTA
AACTCAATGTGACATTCAGCAAACAATGACATCGGCCAGCAGCAGTCCCAAATTA
*****

GTCCCTAACAAAGTCCACTATAATTGGATGAAACGTCGACAGCTCATATAACTTGCTGTG
GTCCCTAACAAAGTCCACTATAATTGGATGAAACGTCGACAGCTCATATAACTTGCTGTG
*****

GCGATTCGGCAGTCTGGCATCCCTTTCAGCGATACCTCCGACGACCCAACCAATTAATA
GCGATTCGGCAGTCTGGCATCCCTTTCAGCGATACCTCCGACGACCCAACCAATTAATA
*****

GGTTC AATTAGCTTGGATCGT CGAAACGCGTTAATGCGTTGCTATCCCCTGTCCGGCTGG
GGTTC AATTAGCTTGGATCGT CGAAACGCGTTAATGCGTTGCTATCCCCTGTCCGGCTGG
*****

CGTACCTCGTTGTTGCGACGCTACAACAGGTTTCGAGGCTCCATTTAAGCTGCGATATAG
CGTACCTCGTTGTTGCGACGCTACAACAGGTTTCGAGGCTCCATTTAAGCTGCGATATAG
*****

ACCGGGATGGTAGGTTTCAAACGTC AACCGGCTTTAACATGATTTCTATCAITGTTGAGT
ACCGGGATGGTAGGTTTCAAACGTC AACCGGCTTTAACATGATTTCTATCAITGTTGAGT
*****

GGCAATAGGTCATTGAGAGATGACGACAAGAAATTGCTTATGCTCATCTTATTAATAATG
GGCAATAGGTCATTGAGAGATGACGACAAGAAATTGCTTATGCTCATCTTATTAATAATG
*****

GACTTGTGTGGACGGCGAGTTGTATAAATACAGAGGCGTTGTGACCGGAAATCACTTTG
GACTTGTGTGGACGGCGAGTTGTATAAATACAGAGGCGTTGTGACCGGAAATCACTTTG
*****

AAATCCTCAITCACAATCCTCAAAGCACATCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCCT
AAATCCTCAITCACAATCCTCAAAGCACATCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCCT
*****

AAACCAATCACTCTATTCAITCGGGCCATGGTGAGCAAGGGCGA-GGAGCTGTTACCCGG
AAACCAATCACTCTATTCAITCGGGCCATGGTGAGCAAGGGCANNAGGAGCTGTTACCCGG
*****

GG-TGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGT
GGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGANNGCAGCTANACGGCCACAAGTTCACCGTGT
** *****

CCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCA
CCG-----
***

```

**FgΔhyd5 Transformanten Sequenzierung:** gDNA der Transformante FgΔhyd5 wurde mit Primer 5' PhydEcoRV-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz von *Phyd5*. Untere Reihe: Sequenz der Transformante FgΔhyd5. Schwarzer Pfeil - Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Schnittstelle *Apal* zwischen *Promoter Bereich* und *sgfp* Gen. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

```

GGGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGG
-----
GTGGTGCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
-----ATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC
*****

GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC
GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC
*****

GGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAAGTGC
GGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTCACCTACGGCGTGCAAGTGC
*****

TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
TTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAA
*****

GGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
GGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCC
*****

GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
GAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC
*****

AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTC
AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTC
*****

TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC
TATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC
*****

ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAC
*****

GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
GGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGAC
*****

CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACT
CCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCACT
*****

CACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAEGGCCCGCG-
CACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAEGGCCCGCGCA
*****

```

**FgΔhyd5 Transformanten Sequenzierung:** gDNA der Transformante FgΔhyd5 wurde mit Primer 5' sGFP<sub>Apal</sub>-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz von *sgfp* und *Apal* Schnittstellen. Untere Reihe: Sequenz der Transformante FgΔhyd5. Schwarzer Pfeil -Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Schnittstelle *Apal*. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.

```

-----
GGACTTGTGTGGACGGCGAGTTGTATAAATACAGAGGCGTTGTGACCGGAAATCACTTTT

-----AGCACATCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCC
GAAATCCTCATTACATCCTCAAAGCACATCCAATACAGTAATCTACATCTTTACTCTCC
*****

TAAACCAATCACTCTATTTCATCGGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGG
TAAACCAATCACTCTATTTCATCGGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGG
*****

GGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG
GGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTG
*****

CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCAC
*****

CGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAAGT
CGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTTACCTACGGCGTGCAAGT
*****

CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA
CTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGA
*****

AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
AGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGC
*****

CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
*****

CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGT
CAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGT
*****

CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAA
CTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAA
*****

CATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCCGA
CATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCCGA
*****

CGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
*****

CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC-----
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCAGCCGGGATCAC
*****

-----
TCACGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGGGCC

```

**FgΔhyd5 Transformanten Sequenzierung:** gDNA der Transformante FgΔhyd5 wurde mit Primer 3' sGFP<sub>Apal</sub>-2 sequenziert. Obere Reihe: Sequenz der Transformante FgΔhyd5. Untere Reihe:



Sequenz des *Phyd5* Gens in *F. graminearum* PH1 (Nukleotide 719-861), *ApaI* Schnittstelle und *sgfp* Gen. Schwarzer Pfeil - Anfang des *sgfp* Gens. Schwarzer Kasten - Schnittstelle *ApaI*. \*\*\* = Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz. --- = keine Übereinstimmung zwischen chromosomaler DNA und der theoretischen Sequenz.