

Deletion und Charakterisierung von im Verlauf
der Wurzelinfektion von *Oryza sativa* durch
Magnaporthe oryzae exprimierten potenziellen
Effektorproteinen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)- Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.- Biol. Raphael Kist

aus

Bühl

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Natalia Requena

Korreferent: Prof. Dr. Peter Nick

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Zusammenfassung	6
2 Einleitung	8
2.1 Pflanzen und ihre Umwelt	8
2.1.1 Mutualistische Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroben	8
2.1.2 Parasitäre Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroben	12
2.1.2.1 Arten von parasitären Pflanzen-Mikroben-Interaktionen	13
2.1.2.2 (Hemi)biotrophe Pathogene	14
2.1.3 Wettrüsten zwischen Pflanze und Mikroorganismus	17
2.2 <i>Magnaporthe oryzae</i> - ein vielschichtiger Pilz	22
2.2.1 Bedeutung von <i>M. oryzae</i>	22
2.2.2 Ablauf der Infektion	23
2.3 Ziel der Arbeit	26
3 Material	28
3.1 Organismen	28
3.1.1 <i>Magnaporthe oryzae</i>	28
3.1.2 <i>Oryza sativa</i>	29
3.1.3 <i>Allium cepa</i>	29
3.1.4 <i>Escherichia coli</i>	29
3.1.5 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	30
3.1.6 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
3.1.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
3.1.8 <i>Medicago truncatula</i>	31
3.1.9 <i>Aspergillus nidulans</i>	31
3.2 Verbrauchsmaterial und Geräte	32
3.2.1 Benutzte Kits	32
3.2.2 Medien	32
3.2.3 Lösungen	35
3.2.4 Chemikalien	39
3.2.5 Geräte	40
3.2.6 Verbrauchsmaterial	41
3.2.7 Primer	41
3.2.8 Verwendete Plasmide	43

4	Methoden.....	45
4.1	Infektion von Reiswurzeln (CO39) mit <i>M. oryzae</i>	45
4.1.1	Infektion durch vegetative Hyphen.....	45
4.2	Blattinfektionen mit <i>M. oryzae</i>	46
4.2.1	Blattinfektion von Reis durch <i>M. oryzae</i>	46
4.2.2	Infektion der Epidermis von Zwiebelschalen mit <i>M. oryzae</i>	46
4.2.3	Test auf Appressorienbildung.....	48
4.3	Transformation von <i>M. truncatula</i> mit <i>A. rhizogenes</i> - hairy root- Produktion.....	48
4.3.1	Sterilisieren von <i>M. truncatula</i> Samen.....	48
4.3.2	Transformation von <i>M. truncatula</i> Keimlingen.....	49
4.4	Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> Blättern mit <i>A. tumefaciens</i>	49
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	50
4.5.1	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	50
4.5.2	Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Agrobakterien.....	51
4.5.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	51
4.5.4	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> - MiniprÄp.....	52
4.5.5	Klonierung von PCR- Produkten in pCR2.1- TOPO.....	52
4.5.6	Klonierung in pENTR/D-TOPO.....	52
4.5.7	Ligation von DNA- Fragmenten mittels T4- Ligase.....	53
4.5.8	Gateway- Klonierungen.....	53
4.5.9	FÄllung von DNA.....	53
4.5.10	Restriktionsverdau.....	53
4.5.11	Extraktion von RNA.....	53
4.5.12	cDNA- Synthese.....	54
4.5.13	Extraktion von genomischer DNA aus <i>Magnaporthe oryzae</i>	55
4.5.14	PCR- Polymerase Chain Reaction.....	55
4.5.15	Gelelektrophorese.....	56
4.5.16	Herstellen der Knockout- Konstrukte zur Transformation von <i>M. oryzae</i>	58
4.5.17	Transformation von <i>M. oryzae</i> Protoplasten.....	58
4.5.18	Southern Blot.....	60
4.5.19	Transformation von <i>A. nidulans</i>	61
4.5.20	Für <i>in silico</i> Untersuchungen verwendete Internetdatenbanken.....	62
4.6	<i>Yeast signal sequence trap</i>	63
4.6.1	Durchföhrung des <i>yeast signal sequence trap</i>	64
4.7	<i>Yeast two Hybrid</i> Analyse (y2h).....	64
4.7.1	Allgemeines zu der Methode.....	64
4.7.2	Durchföhrung des y2h- Screen.....	65
4.7.3	Expressionstest des <i>Bait</i> - Konstruktes durch Western Blot.....	65
4.7.4	X- α - Galactosidase Test.....	66
5	Ergebnisse.....	67

5.1	<i>in silico</i> -Untersuchung.....	69
5.1.1	Struktur der ausgewählten Gene.....	69
5.2	Ergebnisse der Deletionsversuche von Zf1, Nt1, Llr1 und Nud1	71
5.3	Phänotypisierung der Zf1- und Nt1- Deletionsstämme.....	74
5.3.1	Phänotypisierung der Wurzelinfektion.....	74
5.3.2	Phänotypisierung der Blattinfektion.....	80
5.3.2.1	Auswirkung auf die Appressorienbildung und die Frühphase der Infektion	80
5.3.2.2	Auswirkung auf die Infektion von Reispflanzen.....	81
5.4	Lokalisierung der Proteine Zf1, Nt1, Llr1 und Nud1	83
5.4.1	Expression in <i>N. benthamiana</i> Blättern.....	83
5.4.2	Lokalisierung von Zf1 und Nt1 während der Infektion.....	90
5.4.3	Funktionsfähigkeit des Signalpeptides von Zf1 und Nt1	90
5.4.4	Lokalisierung von Zf1 und Nt1 in <i>A. nidulans</i>	92
5.4.5	Suche nach Interaktionspartnern von Zf1 und Nt1.....	93
6	Diskussion.....	97
6.1	Auswahl der untersuchten Proteine	98
6.2	Herstellen von Deletionsmutanten für Zf1, Nt1, Llr1, Nud1	102
6.3	Die Deletion von <i>MoZf1</i> und <i>MoNt1</i> zeigt keinen Einfluss auf die Infektion von Reis durch <i>M. oryzae</i>	105
6.4	Die zelluläre Lokalisierung von Zf1, Nt1, Llr1 und Nud1	106
6.5	Putative Interaktionspartner für Zf1	110
6.6	Fazit und Ausblick.....	112
	Literaturverzeichnis	114
	Erklärung	127
	Danksagung	128
	Lebenslauf.....	129

Abkürzungsverzeichnis

AVR-Gene	Avirulenzgene
dsRED	<i>Discosoma sp. red fluorescent protein</i>
ETI	<i>Effector triggered immunity</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
mRFP	Monomeres rot fluoreszierendes Protein
ORF	<i>Open reading frame</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PTI	<i>Pamp triggered immunity</i>
R-Gene	Resistenzgene
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD-LWHA	synthetisches Dropoutmedium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin
SD-LW	synthetisches Dropoutmedium ohne Leucin und Tryptophan
Sp	Signalpeptid
ÜN	Über Nacht
ysst	<i>Yeast signal sequence trap</i>
y2h	<i>Yeast two hybrid</i>
ZSE	Zwiebelschaleneperidermis

1 Zusammenfassung

Im Verhältnis zwischen Pflanzen und Mikroorganismen haben sich im Lauf der Evolution verschiedenartige Interaktionen herausgebildet. Es existieren mutualistische Symbiosen zu beiderseitigem Nutzen ebenso wie parasitäre Interaktionen, in denen die Pflanze als Nahrungsquelle ausgebeutet wird. Auch die Intensität der Interaktionen unterscheidet sich: Während biotrophe Mikroorganismen in lebendem Pflanzengewebe wachsen und sich ernähren, töten nekrotrophe Mikroorganismen das Pflanzengewebe ab, bevor sie sich von ihm ernähren. Hemibiotrophe Mikroorganismen wenden einen Teil ihres Lebens eine biotrophe Strategie an, bevor sie zu einem nekrotrophen Lebensstil wechseln. Dabei haben sich sowohl bei mutualistischen als auch bei parasitären Symbiosen erstaunliche funktionelle Ähnlichkeiten sowohl in den auftretenden Strukturen zur Kolonisierung ihres Wirtes, als auch im Aufrechterhalten der Interaktion herausgebildet.

Ein von Mikroorganismen benutztes Mittel ist die Sekretion von Effektoren, also Proteinen zur Manipulation des Wirtes. Auch in dem in dieser Arbeit betrachteten hemibiotrophen Pathogen *Magnaporthe oryzae* sind zahlreiche Effektorproteine vorhanden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, bei einem in meiner Diplomarbeit durchgeführten *Microarray* gefundener, putativer Effektoren von *M. oryzae*. Da *M. oryzae* in der Lage ist seinen Wirt über Blätter und Wurzeln zu infizieren, wurde in diesem ein Expressionsvergleich zwischen infiziertem Wurzel- und Blattgewebe durchgeführt. Aus in der Wurzelinfektion verstärkt exprimierten Genen wurden nach *in silico* Untersuchung vier putative Effektorgene zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Für sie wurden Deletionskonstrukte hergestellt, um die Gene durch homologe Integration derselben ins Genom zu deletieren, was für die beiden Gene *Zf1* und *Nt1* gelang. Bei Infektionsversuchen mit den Deletionsstämmen zeigte die Deletion von *Zf1* und *Nt1* keine erkennbaren Auswirkungen auf das Infektionsverhalten von *M. oryzae*. Durch transiente Expression von GFP-Fusionsproteinen in *Nicotiana benthamina* und einer auf dem *yeast signal sequence trap* basierenden Expression in Hefe wurde gezeigt, dass nur *Zf1*, nicht aber *Nt1* sekretiert wird. Beide Proteine wiesen bei einer Expression in *Aspergillus nidulans* eine cytoplasmatische Lokalisation auf. Weiter wurden mit Hilfe des *yeast two hybrid*-Systems nach Interaktionspartnern von *ZF1* und *Nt1* gesucht.

In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass die Deletion von *Zf1* bzw. *Nt1* keinen erkennbaren Einfluss auf die Virulenz von *M. oryzae* hat. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es sich bei *Zf1* um ein sekretiertes Protein handelt, für das eine Effektoraktivität im Verlauf der Reisinfektion wahrscheinlich ist, wenngleich die genaue Funktion noch unklar ist. Bei *Nt1* hingegen fand in zwei heterologen Expressionssystemen keine

Sekretion statt, wodurch auch eine Sekretion in *M. oryzae* sehr unwahrscheinlich ist, es sich bei Nt1 also nicht um ein Effektorprotein handelt.

2 Einleitung

2.1 Pflanzen und ihre Umwelt

Pflanzen sind als sessile Organismen in sehr stark von den Bedingungen ihrer Wachstums- und Lebensumgebung abhängig. Während mobile Organismen, wie die meisten Tiere, bei Bedrohungen, Nahrungsmangel oder ähnlich ungünstigen Umweltbedingungen den Ort verlassen können, um sich bessere Lebensbedingungen zu suchen, besteht diese Möglichkeit für Pflanzen nicht. Sie müssen sich mit den Lebensbedingungen des Ortes ihrer Keimung und allen aufkommenden Bedrohungen auseinandersetzen, um überleben zu können. Dies führte im Laufe der Evolution zu verschiedenen Anpassungen von Pflanzen an ihre Umwelt. Allgemeine Anpassungen von Pflanzen an ihre vorherrschende Umwelt, wie die Ausbildung von Aerenchymen in sumpfigen Gebieten oder reduzierte Blätter an trockenen Standorten, sollen hier nicht weiter betrachtet werden, da es sich um allgemeine Spezialisierungen auf einen Lebensraum handelt, die in gleicher Form auch bei mobilen Lebewesen vorkommen.

In der weiteren Betrachtung soll es besonders um die Reaktion auf die direkte Lebensumwelt einer Pflanze gehen. So hat eine Pflanze keinerlei Einfluss auf den Nährstoff- und Wassergehalt ihres Standortes. Um sich auch auf nährstoffarmem Untergrund behaupten zu können, gehen sehr viele Pflanzen „Lebensgemeinschaften“ mit anderen Organismen ein. Bei diesen mutualistischen Symbiosen handelt es sich um eine Zusammenarbeit zwischen einer Pflanze und einem Mikroorganismus zu beiderseitigem Nutzen. Allerdings sind Pflanzen nicht nur abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt, sondern natürlich auch biotischen. Dies können sowohl Fraßfeinde wie Insekten oder herbivore Wirbeltiere sein als auch pathogene Mikroorganismen wie Bakterien und Pilze. Vor diesen müssen sich Pflanzen bestmöglich schützen, um den durch sie angerichteten Schaden so gering wie möglich zu halten. In den folgenden Kapiteln soll im Besonderen der Fokus auf der Interaktionen von Pflanzen und Mikroorganismen liegen, und deren Einfluss auf die Pflanze, sowie die Reaktionen der Pflanzen beschrieben werden.

2.1.1 Mutualistische Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroben

Wie schon erwähnt, handelt es sich bei mutualistischen Symbiosen um eine Interaktion, aus der beide Interaktionspartner einen Vorteil ziehen. Derartige Interaktionen gehen Pflanzen sowohl mit pilzlichen als auch mit bakteriellen Partnern ein. Beispielhaft seien hier drei Interaktionen erwähnt, nämlich die Ektomykorrhiza, die arbuskuläre Mykorrhiza als Beispiel einer Pilz- Pflanze Interaktion und die hauptsächlich bei Leguminosen vorkommende Interaktion mit Rhizobien als Beispiel für eine bakterielle Interaktion.

Gemeinsam ist diesen Symbiosen, dass sich die Partner dabei gegenseitig mit Nährstoffen versorgen. Allerdings unterscheiden sich die Interaktionspartner sehr stark, da nicht jede Pflanze alle diese Interaktionen eingehen kann. Die Interaktion mit Rhizobienbakterien ist zum Beispiel nur auf die Ordnung Fabales, und dort mit einer einzigen Ausnahme auf die Familie der Fabaceae (auch als Leguminosae bezeichnet) beschränkt (Gage, 2004). Dagegen können 80 % aller Landpflanzen eine arbuskuläre Mykorrhiza Symbiose eingehen (Strack et al., 2003), welche damit zu den meistverbreiteten mutualistischen Symbiosen zählt. Was diese beiden Symbiosen jedoch gemeinsam haben ist, im Gegensatz zu der erwähnten Ektomykorrhiza, die Tatsache, dass es sich dabei um Endosymbiosen handelt. Aus diesem Grund sollen sie im Folgenden genauer beschrieben und miteinander verglichen werden. Zuvor jedoch wird der Vollständigkeit wegen kurz auf die Ektomykorrhiza eingegangen.

Bei der Ektomykorrhiza handelt es sich um eine Symbiose zwischen Waldbäumen und hauptsächlich Pilzen der Abteilung Basidiomycota, in geringerem Umfang auch der Abteilungen Ascomycota und Zygomycota (Horton & Bruns, 2001; Anderson & Cairney, 2007). Wie oben schon erwähnt handelt es sich dabei, wie auch der Name andeutet, nicht um eine Endosymbiose. Der Pilzpartner dringt also nicht in die Wirtszellen ein, sondern kolonisiert den Apoplasten zwischen epidermalen und korticalen Zellen. Er umschließt dabei die Wirtszellen mit einer stark verzweigten Struktur, welche als Hartiges Netz bezeichnet wird (Anderson & Cairney, 2007). Die beiden Partner tauschen dabei Nährstoffe aus. Der Pilz erhält hauptsächlich Kohlenhydrate, während die Pflanzen durch eine verbesserte Mineralienversorgung, insbesondere durch Stickstoff, profitieren (Lopez et al., 2008; van Schöll et al., 2006).

Um eine wesentlich intimere Interaktion handelt es sich bei einer Endosymbiose, wobei der Mikroorganismus in die Pflanzenzelle eindringt und in ihr existiert. Dabei zeigen sich, trotz der sehr verschiedenen mikrobiellen Partner, verblüffende Übereinstimmungen sowohl in der Kommunikation der Partner, der Ausbildung der Symbiose als auch ihrer Regulierung.

Der Beginn jeder Beziehung liegt im Sich-Finden und Kennenlernen der Partner. Für ihr Gelingen ist eine ausreichende Kommunikation, sowie sich auf den Partner einzustellen, extrem wichtig. Diese Aussagen haben, nicht nur mit Blick auf uns Menschen, wenig Überraschendes an sich, denn sie gelten in genau dem gleichen Maße für den Beginn einer mutualistischen Symbiose- und wie wir später noch sehen werden, nicht nur bei mutualistischen sondern auch bei pathogene Interaktionen!

Die ersten Schritte dieses Findens und Kennenlernens werden mit Hilfe von sekretierten chemischen Botenstoffen vollzogen. So dienen Pflanzen Flavonoide als chemische Lockstoffe für Rhizobien. In diesen wird durch die Wahrnehmung der Flavonoide die Expression so genannter Nod-Gene eingeleitet (Hassan & Mathesius, 2012). Einige die-

ser Nod-Gene sind verantwortlich für die Produktion so genannter Nod-Faktoren. Bei diesen handelt es sich um Lipochitooligosaccharide, welche in der Pflanze den Beginn der Knöllchenbildung auslösen (Ardourel et al., 1994; Spaink, 1995). Da der Fokus in dieser Arbeit auf pilzlichen Mikroorganismen liegt, soll diese bakterielle Symbiose nicht bis ins Detail besprochen werden. Der anschließende Verlauf der Symbiosenaustrbildung ist in vielen Reviews, wie z.B. in Ivanov et al., 2010 und Oldroyd et al., 2011, sehr gut zusammengefasst. Neben den Nod-Faktoren möchte ich nur auf zwei wichtige Schritte im Verlauf der Interaktion kurz eingehen, welche große Ähnlichkeit zu pilzlichen Interaktionsstrukturen haben. Dies ist zum einen die Reaktion der Pflanze auf die Gegenwart der Rhizobien, sowie die Art und Weise, wie die Bakterien sich in der pflanzlichen Zelle, in einem so genannten Symbiosom, aufhalten.

In der Pflanze gibt es ein Set von Genen, die so genannten SYM-Gene, die für eine Ausbildung der Rhizobiensymbiose erforderlich sind, und zugleich auch eine essentielle Funktion in der Ausbildung arbuskulärer Mykorrhiza besitzen. Wie Kistner et al. 2005 publizierten, gibt es zum Beispiel in *Lotus japonicus* mindestens sieben SYM-Gene. Zu einigen dieser in *L. japonicus* vorhandenen Gene wurden in weiteren Pflanzen ebenfalls orthologe Gene gefunden, die dort auch die gleichen Funktionen erfüllen. So ist zum Beispiel die Rezeptor ähnliche Kinase SYMRK (in *Medicago truncatula* als DMI2 und in *M. sativa* als NORR bekannt) sowohl in der Ausbildung einer Rhizobien- wie auch einer arbuskulären Mykorrhizasymbiose der Startpunkt eines gemeinsamen SYM-Signalweges. Im Ablauf dieses Signalweges kommt es sowohl im Falle der Rhizobien- als auch der Mykorrhizasymbiose zu einem so genannten Kalziumspiking, worunter oszillierende Änderungen der Kalziumkonzentration im Bereich des Zellkerns zu verstehen sind. Allerdings ist die Art der einzelnen Oszillationen als Reaktion auf Nod-Faktoren eine andere als in Reaktion auf Mykorrhizapilze (Kosuta et al., 2008). Mutationen dieser SYM-Gene führen dazu, dass die Pflanzen weder eine Knöllchen- noch eine arbuskuläre Mykorrhizasymbiose ausbilden können (Catoira et al., 2000; Kistner et al., 2005). Dieser SYM-Signalweg wird aktiviert, nachdem die Pflanze Nod-Faktoren, bzw. im Falle der arbuskulären Mykorrhiza, einen bislang hypothetischen so genannten Myc-Faktor erkannt hat. Obwohl schon bekannt war, dass Pflanzen lange vor einem direkten Kontakt zwischen Pilz und Wurzel auf dessen Gegenwart reagieren (Kosuta et al., 2003; Kuhn et al. 2010), war doch nicht bekannt, welche der von diesem sekretierten Moleküle dafür verantwortlich sind, dass der SYM-Signalweg aktiviert wird. Im Jahr 2011 konnten allerdings Maillet et al. zeigen, dass der arbuskuläre Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* ebenfalls Lipochitooligosaccharide, hier „Myc-LCO“ genannt, sekretiert, welche in Pflanzen zu einer Stimulierung des Wurzelwachstums, der Wurzelverzweigung und dadurch der Ausbildung der Symbiose führen. Maillet et al. konnten auch zeigen, dass diese stimulierende Wirkung von oben erwähnten SYM-Genen ab-

hängig ist, aber in dem weiteren Verlauf des Signalweges einen mykorrhizaspezifischen Verlauf nimmt.

Bei dem Wachstum innerhalb der Wirtszellen ergeben sich naturgemäß deutliche Unterschiede, da es sich bei Rhizobien um einzellige Bakterien handelt, während die Pilze der *Glomeromycota* filamentös wachsende eukaryotische Organismen sind. Auch der Weg auf dem die Mikroorganismen in die Wirtspflanzen gelangen und sich dort verbreiten bzw. wachsen unterscheidet sich deutlich. Beiden ist aber gemein, dass die Wirtspflanze im Voraus das Eindringen bzw. die Bewegung innerhalb der Pflanzenzellen vorbereitet, und die Mikroorganismen in beiden Fällen nicht in das Cytoplasma der Wirtszelle eindringen, sondern durch vom Wirt gebildete Membranen umschlossen sind. Wie wir später noch sehen werden, ist dies eine Eigenschaft die sie mit sehr vielen pathogenen Organismen gemeinsam haben. Bei beiden Symbiosen ist der Ort der eigentlichen Symbiosomausbildung der innere Kortex der Wurzel.

So führt ein durch Nod-Faktoren ausgelöstes Aufrollen von Wurzelhaaren zum Einschließen von Rhizobien. An dieser Stelle beginnt sich ein so genannter Infektionsstrang (engl. infection thread; It) auszubilden. Dieser wächst durch Spitzenwachstum nach innen, wobei sich die Rhizobien darin faktisch noch außerhalb der Wurzel befinden, da der It komplett mit einer Zellwand ausgekleidet ist. Innerhalb des It wachsen die Rhizobien weiterhin und vermehren sich (Gage, 2004). Beim Übergang von einer Zelle in die darunter liegende wird die Zellwand lokal geschwächt. In der tieferliegenden Zelle wird zur Vorbereitung des Überganges ein sogenannter preinfection thread (Pit) ausgebildet. Dabei handelt es sich um eine Cytoplasmabrücke, durch die nach dem Eindringen des It dessen weiteres Wachstum erfolgt (van Brussel et al., 1992). Ist der It schließlich in der Organanlage der Nodulierung im inneren Kortex angekommen, werden die Bakterien in diese Zellen freigesetzt. Die Bakterien werden dazu von einer Wirtsmembran, der Peribakteroidmembran (PBM), umschlossen und in das Cytoplasma der Zelle abgegeben, wo sie sich anschließend in die endgültige symbiontisch aktive Form des Bakteroids entwickeln und zusammen mit der PBM das Symbiosom bilden. In diesem Bakteroid findet die Fixierung von Luftstickstoff statt, welcher als Ammonium der Pflanze zur Verfügung gestellt wird, während diese die Bakterien mit Photosyntheseprodukten versorgt.

Bei der arbuskulären Mykorrhiza (AM) erfolgt das erste Erkennen ebenfalls durch von der Pflanze ausgesandte Stoffe. Für diesen Fall zeigten Akiyama et al. (2005), dass Strigolactone für ein starkes Verzweigen der Pilzhyphen verantwortlich sind, wodurch die Wahrscheinlichkeit für ein Zusammentreffen der Hyphen mit den Wurzeln deutlich erhöht wird. Nehmen die aus Sporen gekeimten Hyphen jedoch keinen Interaktionspartner wahr, so stoppen sie das weitere Wachstum, das Protoplasma zieht sich mit den Zellkernen in die Spore zurück und diese keimt zu einem späteren Zeitpunkt erneut aus (Requena et al. 2007). Wie Kuhn et al. (2010) deutlich zeigen konnten, reagiert der Pilz

darauf ebenfalls mit der Ausschüttung von Signalmolekülen, die in der Pflanzenwurzel noch vor dem direkten Kontakt zu einer veränderten Genexpression führen. Wie oben schon erwähnt, zeigten Maillet et al. (2011), dass dabei Lipochitooligosaccharide eine sehr wichtige Rolle spielen.

Ist der direkte Kontakt zwischen Wurzel und Hyphe hergestellt, beginnt diese mit der Ausbildung von Penetrationsstrukturen, die Appressorien genannt werden. Die Pilzhypen wachsen intrazellulär durch die Epidermis- und äußeren Kortextzellen bis zu den inneren Kortextzellen. Hierbei bildet sich in jeder Zelle vor dem Eindringen ein „Präpenetrations Apparat“ (engl. prepenetration apparatus, PPA), wobei es sich um eine Komponenten des Cytoskeletts und des endoplasmatischen Reticulums enthaltende intrazelluläre Anordnung des Wirts handelt (Genre et al., 2005; Genre et al., 2008). Der PPA beinhaltet darüber hinaus eine Cytoplasmabrücke, die den Weg des intrazellulären Wachstums der Hyphe definiert. Im inneren Kortext angelangt, gibt es verschiedene Möglichkeiten. In *Medicago truncatula* zum Beispiel, verlassen die Hyphen ihre Wirtszellen. Hier wachsen sie interzellulär, verzweigen sich und dringen anschließend in die inneren Kortextzellen ein (Genre et al., 2008). In *Daucus carota* dagegen wachsen die Hyphen weiterhin intrazellulär durch die inneren Kortextzellen (Genre et al., 2008). In beiden Fällen bilden sie in den inneren Kortextzellen die, der Symbiose den Namen gebenden, typischen bäumchenartigen Arbuskel aus. Auch hier wird initial ein PPA ausgebildet, der sich allerdings durch z.B. eine Vergrößerung der Wirtszellkerne von der Vorpenetrationsphase in den Epidermis- und äußeren Cortextzellen unterscheidet (Genre et al., 2008). Die intrazellulären Hyphen sind dabei von einer pflanzlichen, so genannten periarbuskulären Membran umgeben. Zwischen dieser und der pilzlichen Membran befindet sich der periarbuskuläre Raum. An dieser, die Arbuskel umgebenden Membran, findet der Stoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze statt, wobei der Pilz von der Pflanze Kohlenhydrate erhält (Pfeffer et al., 1999). 2011 konnten Helber et al. erstmals einen pilzlichen Zuckertransporter *Mst2* vorstellen, der eine wichtige Rolle in der Ausbildung dieser Symbiose spielt. Die Pflanze erhält im Gegenzug von dem Pilz Mineralstoffe. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Phosphat (Harrison et al., 2002; Javot et al. 2007), ausserdem erhält sie aber auch Stickstoff von dem Pilz, wie ein hauptsächlich in arbuskulierten Zellen hochregulierter Ammoniumtransporter in *Lotus japonicus* nahe legt (Güther et al., 2009).

Es gibt auch Hinweise darauf, dass eine AM-Symbiose für die Pflanze noch weitere Vorteile, wie eine erhöhte Resistenz gegen Pathogene (Liu et al., 2007; Campos-Soriano et al., 2012) mit sich bringt.

2.1.2 Parasitäre Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroben

Die bislang besprochenen Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen waren sowohl für die Pflanze als auch den Mikroorganismus von Vorteil. Allerdings muss

sich jede Pflanze auch mit zahlreichen Mikroorganismen auseinander setzen, die sie als einfache Nahrungsquelle ausbeuten wollen, ohne sich dafür zu revanchieren. Dies können sowohl bakterielle, pilzliche als auch virale Pathogene sein. Um den Rahmen dieser Arbeit nicht zu sprengen, werde ich mich im Folgenden nur auf pilzliche Pathogene konzentrieren.

2.1.2.1 Arten von parasitären Pflanzen-Mikroben-Interaktionen

Unter diesen gibt es drei grundsätzlich unterschiedliche Infektionstypen. Bei der ersten handelt es sich um nekrotrophe Pathogene. Die Besonderheit von nekrotrophen Organismen ist, dass sie das Gewebe der Wirtspflanze, bevor sie es kolonisieren, durch Phytotoxine und/oder lytische Enzyme abtöten, um sich anschließend von der toten Biomasse zu ernähren. Einen Überblick über die nekrotrophe Lebensweise am Beispiel des Grauschimmelfäuleerregers *Botrytis cinerea* liefert zum Beispiel van Kann (2006). Da es sich bei nekrotrophen allgemein um Organismen handelt, die nicht mehr mit lebendem Gewebe in Kontakt kommen, sondern dieses vor der Hyphenfront abtöten, sind diese Pathogene oftmals nicht sehr wirtsspezifisch. So ist zum Beispiel der oben erwähnte *B. cinerea* dazu in der Lage, mehr als 200 unterschiedliche Wirtsspezies zu infizieren. Allerdings gibt es auch nekrotrophe Organismen, die eine weitaus geringere Anzahl an potentiellen Wirtspflanzen besitzen und die wirtsspezifische Toxine produzieren. Diese Vielfalt nekrotropher Organismen und die unterschiedlichen Kolonisierungsweisen sind ausführlich z.B. in Laluk & Mengiste (2010) beschrieben.

Die zweite Gruppe von Pathogenen hat eine von der oben beschriebenen stark abweichende Lebensweise. Diese Pathogene werden biotrophe Organismen genannt. Ihre zentrale Eigenschaft ist es, lebende Wirtszellen zu infizieren, in diesen zu wachsen und sich von diesen zu ernähren, wobei sie nicht abgetötet werden.

Die dritte und letzte Gruppe kann als eine Art Zwischenform der ersten beiden betrachtet werden und wird hemibiotroph genannt. Hemibiotrophe Pathogene sind dadurch charakterisiert, dass sie die Wirtszellen mittels einer biotrophen Strategie infizieren. Nach einer bestimmten Zeit, die von dem jeweiligen Pathogen abhängt, ändern sie ihre Strategie in eine nekrotrophe und beginnen damit die Wirtszellen abzutöten.

Diese beiden letzten Organismengruppen sollen in dem folgenden Kapitel detaillierter beschrieben werden. Aufgrund ihrer großen Übereinstimmungen werden sie zusammen betrachtet. Dabei wird zuerst der gemeinsame biotrophe Lebensabschnitt thematisiert werden und zum Schluß kurz auf den Wandel zum nekrotrophen Lebensstil hemibiotropher Organismen eingegangen.

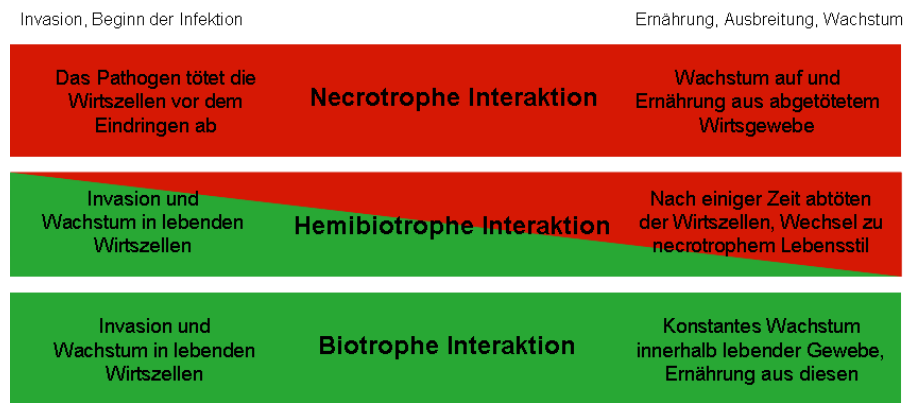


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Einteilung von Pflanzen-Mikroben-Interaktionen und ihrer Merkmale.

2.1.2.2 (Hemi)biotrophe Pathogene

Die biotrophe Lebensweise ist dadurch definiert, dass der Mikroorganismus in lebenden Wirtszellen wächst und sich aus diesen heraus ernährt (Schulze-Lefert & Panstruga, 2003). Dies trifft auch auf die schon weiter oben beschriebenen arbuskulären Mykorrhizapilze zu. Tatsächlich sind auch diese obligat biotrophe Organismen, können also nicht ohne einen Symbiosepartner, von dem sie Kohlenhydrate erhalten, existieren. In ihrem Fall ist die Interaktion allerdings in beiderseitigem Interesse, während es die biotrophen Pathogene schaffen, in der Pflanze zu überleben und ihr zu schaden, ohne von ihr bekämpft zu werden. Wie dies genau geschieht und welche Abwehrmaßnahmen die Pflanzen treffen, soll zu einem späteren Zeitpunkt erläutert werden. Zuerst sollen hier die allgemeinen Charakteristika und die Infektionswege biotropher Pathogene vorgestellt werden.

Das erste Problem vor dem ein biotropher pathogener Mikroorganismus steht, wenn er eine Pflanze infizieren will, ist die zu durchdringende Zellwand. Er kann nicht, wie nekrotrophe Organismen, im Überschuss Toxine oder lytische Enzyme ausschütten, da er sonst die Wirtszelle beschädigen oder gar töten würde. Dies bedeutete aber ebenfalls den eigenen Tod oder zumindest Stillstand des Wachstums. Auf der anderen Seite muss er in die Zelle eindringen, da sich vor allem die obligat biotrophen Pathogene nur auf diese Weise ernähren können. Aus diesem Grund haben biotrophe Organismen sehr ausgeklügelte Infektionsstrukturen und -strategien entwickelt. Prinzipiell sind drei Möglichkeiten gegeben, auf welchem Weg biotrophe Pilze in ihren Wirt eindringen können. So können sie in den Interzellularbereich des Wirtsgewebes eindringen und darin wachsen. Dafür können sie entweder natürlich vorhandene Öffnungen des Wirtes nutzen, wie die Stomata, oder zwischen zwei Pflanzenzellen in diesen eindringen. In beiden Fällen wachsen die Pilze aber zuerst in dem Interzellularbereich des Gewebes und dringen erst zu einem späteren Zeitpunkt in die Wirtszellen ein. Die letzte Möglichkeit ist es, direkt durch die Zellwand in eine Epidermiszelle einzudringen. Da sich die beiden ersten

Möglichkeiten nur minimal unterscheiden, werden sie im weiteren Verlauf zusammen untersucht.

Die Rostpilze, bei denen es sich um obligat biotrophe Pflanzenpathogene handelt, dringen meist zuerst in den Interzellularraum der Wirte ein, bevor sie intrazellulär wachsen. In der dikaryotischen Phase von *Uromyces fabae* beispielsweise, dringt dieser in den Interzellularraum seiner Wirtspflanze, der Ackerbohne *Vicia faba*, ein, indem er ein Appressorium über einem Stoma bildet (Mendgen & Hahn, 2002). Bei Appressorien handelt es sich um spezielle Infektionsstrukturen von symbiontischen Pilzen, mit Hilfe derer diese in das Gewebe ihrer Wirte eindringen können. Für die Penetration werden von den verschiedenen Pathogenen unterschiedliche Strategien verwendet. So konnte für *Magnaporthe oryzae* zum Beispiel festgestellt werden, dass die Appressorien dazu in der Lage sind, einen enormen Turgordruck von 8 MPa aufzubauen und damit die Zellwand zu durchdringen (Howard et al., 1991). Für den echten Mehltau *Erysiphe graminis* konnten Pryce-Jones et al. (1999) feststellen, dass die Appressorien einen mechanischen Druck von 2-4 MPa in Kombination mit verschiedenen Enzymen für die Penetration verwenden. Für den oben erwähnten *U. fabae* konnten Rauscher et al. (1994) feststellen, dass im Anschluss an die Appressorienbildung und im Verlauf des interzellulären Wachstums extrazelluläre Proteasen gebildet werden, die in der Lage sind, Zellwände lokal aufzubrechen

Für den Rostpilz *Puccinia graminis* wurde gezeigt, dass eine Kombination von chemischen und topographischen Signalen dafür notwendig ist, die Appressorienbildung auf einem Stoma auszulösen (Collins et al., 2001). In Mendgen und Hahn (2002) ist das weitere Wachstum des Dikaryons von *U. fabae* nach dem Durchwachsen des Stoma sehr gut zusammengefasst. Der Pilz beginnt mit einem interzellulären Wachstum, das in der Ausbildung einer sogenannten Haustorienmutterzelle mündet. Von dieser Haustorienmutterzelle dringt eine Hyphe in eine Wirtszelle ein und formt dort ein Haustorium. Bei diesem Haustorium handelt es sich um eine Struktur, die eine sehr große Ähnlichkeit mit dem zuvor schon beschriebenen Arbuskel der AM-Pilze aufweist. Wie dieser ist das Haustorium ebenfalls komplett von einer Wirtsmembran umschlossen, die extrahaustorielle Membran (EHM). Auf diese folgt dann eine sogenannte extrahaustorielle Matrix, die ebenfalls von dem Wirt gebildet wird. Beide Komponenten, Matrix und EHM, haben strukturelle Auffälligkeiten. So ist bei der extrahaustoriellen Matrix zu sehen, dass sie meist reich an Polysacchariden und Glycoproteinen ist, die im allgemeinen in der primären Zellwand von Pflanzenzellen zu finden sind, zum Beispiel Pektine, Xyloglucan, Arabinogalactanproteine und andere Glycoproteine. In Mehltaupilzen, welche ebenfalls Haustorien ausbilden, sind diese Zellwandbestandteile jedoch nicht zu finden (O'Connell & Panstruga, 2006).

Auch die EHM besitzt eine andere Struktur und einen anderen Aufbau als die normale Zellmembran der Pflanzenzellen. So ist die EHM der Mehltaupilze dicker und enthält

weniger integrale Membranproteine als die normale Zellmembran. In Rostpilzen konnte auch festgestellt werden, dass die EHM weniger Sterole enthält und viele membrangebundene Proteine nicht in ihr vorkommen (O'Connell & Panstruga, 2006; Koh et al., 2005). In der pflanzlichen EHM von *Uromyces fabae* wurde darüber hinaus ein Fehlen an ATPase-Aktivität festgestellt, was darauf hindeutet, dass die Wirtszelle keine Kontrolle mehr über den Molekülfluss nach außen hat (Voegelé, 2006; O'Connell & Panstruga, 2006).

Wie die Arbuskel in der AM-Symbiose scheinen auch die Haustorien der Ort des Stoffaustausches zwischen Wirt und Parasit. So konnte ein möglicher haustoriumspezifischer Aminosäuretransporter in *U. fabae* gefunden werden. Dabei handelt es sich um einen vermutlichen H^+ -Symporter, welcher einen Protonengradienten zum Co-Transport der Aminosäuren nutzt (Hahn et al., 1997). Dies würde sehr gut dazu passen, dass ebenfalls in *U. fabae* eine um ein vielfaches höhere ATPase Aktivität in Haustorien gefunden wurde (Struck et al., 1996). Voegelé et al. (2001) konnten erstmals den Glucose/Fruktose Transporter HXT1 identifizieren, der mittels Immunofluoreszenz exklusiv in Haustorien festgestellt wurde. Bei diesem handelt es sich ebenfalls um einen H^+ -Symporter. Darüber hinaus konnte 2006, ebenfalls in *U. fabae*, eine pilzliche Invertase gefunden werden, die spezifisch in Haustorien auftritt. Diese Invertase, so wird vermutet, könnte als Substratlieferant für HXT1 fungieren (Voegelé et al., 2006). Dies sind also deutliche Hinweise darauf, dass es zu einem Fluss von Nährstoffen aus der Pflanze hin zu dem Pilz im Bereich der Haustorien kommt.

Neben der oben beschriebenen Art der biotrophen Infektion mit Umweg über den Interzellularraum, können natürlich auch direkt Epidermiszellen infiziert werden. Diesen direkten Weg schlagen als Beispiel für obligate biotrophe Pathogene die Mehltaupilze ein (Pryce-Jones et al., 1999). Nach dem Eindringen in die Wirtszelle bilden auch sie, wie die Rostpilze, hier ein Haustorium und ernähren sich aus diesem (Manners & Gay, 1982). Allerdings infizieren auch die hemibiotrophen Pathogene *Colletotrichum lindemuthianum* sowie *M. oryzae* ihre jeweiligen Wirte, die Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) bzw. den Reis (*Oryza sativa*), auf diese Weise. Beide benutzen dafür Appressorien, die eine melanisierte Zellwand besitzen. Da es sich bei *M. oryzae* um den Hauptprotagonisten dieser Arbeit handelt, soll er zu einem späteren Zeitpunkt detailliert besprochen werden. Beiden hemibiotrophen Organismen ist gemein, dass sie direkt nach der Penetration in einer biotrophen Phase intrazellulär wachsen. Dabei bilden sie aber nicht wie die meisten obligaten biotrophen Pathogene ein Haustorium aus, sondern sie durchwachsen die Wirtszellen mit so genannten invasiven Hyphen. Diese Hyphen besitzen ebenfalls die typisch biotrophe Eigenschaft, dass sie von einer Wirtsmembran direkt umschlossen sind. Während die Infektionshyphen von *C. lindemuthianum* von einer Matrix ähnlich der extrahaustoriellen Matrix umgeben sein sollen (Mendgen & Hahn, 2002), ist dies bei *M. oryzae* nicht der Fall (Kankanala et al., 2007). Bei *C. lindemuthi-*

anum dauert die biotrophe Phase ca. zwei bis drei Tage. Danach schaltet der Pilz auf nekrotrophes Wachstum um, wobei er dünnere sekundäre Hyphen ausbildet, die eine Vielzahl an Depolymerasen wie Polygalacturonase, Pektinlyasen und Proteinasen ausschütten. Diese verdauen die Zellwände der Pflanzenzellen bevor die Hyphen eindringen und setzen so deren Nährstoffe frei (Münch et al., 2008). Im Gegensatz dazu schaltet *M. oryzae* nicht generell in eine nekrotrophe Phase um, sondern hier scheint jede neue Zellinfektion auf biotrophem Wege zu erfolgen. Erst wenn die infizierte Zelle mit invasiven Hyphen ausgefüllt ist und diese in eine benachbarte Zelle weiterwachsen, schalten die Hyphen in der zuerst infizierten Zelle um und töten diese ab (Kankanala et al., 2007).

2.1.3 Wettrüsten zwischen Pflanze und Mikroorganismus

Wie wir bei der Besprechung der mutualistischen Symbiosen schon gesehen haben, sind Pflanzen auf keinen Fall als passive Verfolgte zu sehen, sondern als aktive Teilnehmer an den Symbiosen. Im Fall der mutualistischen Symbiosen zeigt sich dies durch das chemische Anlocken der Symbionten, die Kommunikation mit diesem, das Bereithalten symbiosespezifischer Regulationswege, sowie das Aktivieren symbiosespezifischer Genexpression. In diesem Fall sind die Pflanzen natürlich an einem Gelingen der Interaktion interessiert, da es ihnen zu vielfältigem Vorteil gereicht. Im Fall der parasitären Interaktionen dagegen setzen die Pflanzen alles daran, diese Interaktion gar nicht erst entstehen zu lassen oder, sofern dies nicht zu verhindern war, diese so schnell wie möglich zu erkennen und wieder zu beenden.

Genre et al. (2009) verglichen den bei arbuskulärer Mykorrhiza auftretenden PPA mit einer bei Pathogenen oft beobachteten Cytoplasmaaggregation im Vorfeld des Eindringens an der Kontaktstelle. Diese führt bei Pathogenen zu Akkumulationen des endoplasmatischen Retikulums und Zellwandablagerungen und so zu einer ersten Abwehr. In Pflanzen, die zum Beispiel eine Mutation in einem der bereits erwähnten SYM- Gene, DMI3, besitzen, kann sich diese Cytoplasmaaggregation bei einer Infektion mit *Colletotrichum trifolii* nicht ausbilden (Genre et al., 2009). Genre et al. schlossen daraus, dass eine solche Cytoplasmaaggregation als Reaktion auf einen pilzlichen Interaktionspartner zu werten sei, und entweder zur Korridorbildung für einen Symbionten führt, oder eben ein erster Schritt zur Abwehr eines Pathogens ist. Pflanzen haben insgesamt eine zweistufige Abwehr entwickelt, in deren letzter Konsequenz sie sogar den selbst induzierten lokalen Zelltod einsetzen, was anders formuliert den Selbstmord eigener Zellen bedeutet, um die Ausbreitung von Pathogenen zu verhindern. Hierzu ist wichtig zu sehen, dass Pflanzen keine speziellen Immunabwehrzellen, wie es bei Tieren üblich ist, besitzen, sondern dass jede einzelne Zelle dazu in der Lage ist, sich selbst zu verteidigen. Von solchen Infektionsstellen gehen auch systemische Signale aus, die die restlichen Zellen der Pflanze in Alarmbereitschaft versetzen.

Die erste Hürde, die ein potentiell Pathogen zu überwinden hat, liegt natürlich in dem Aufbau der Pflanzengewebe und -zellen. Die Epidermis von Pflanzen ist von einer stark hydrophoben Cuticula überzogen, während jede einzelne Zelle von einer stabilen Zellwand umschlossen ist. Ausserdem halten Pflanzenzellen eine Anzahl an antimikrobiellen Stoffen, sowohl Proteine als auch Sekundärmetabolite, vorrätig, mit denen sie Pathogene bekämpfen können (Heath, 2000). Dies sind schon Hindernisse, die so manchen potentiellen Angreifer daran hindern, eine erfolgreiche Interaktion zu beginnen. Sie sind jedoch passiv und nicht gegen spezifische Organismen gerichtet, sondern dienen einem Grundschutz der Pflanze, um möglichst wenige Pathogene überhaupt zuzulassen. In der ersten Stufe der aktiven Abwehr erkennen Pflanzen typische pathogenabhängige molekulare Muster (engl. pathogen associated molecular patterns; PAMPs) (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2008). Diese Moleküle sind allerdings nicht nur für Pathogene spezifisch, sondern sind typisch für ganze Gruppen von Mikroorganismen. Aus diesem Grund wird auch häufig von MAMPs (microbe associated molecular pattern) anstelle von PAMPs gesprochen. Auf Seite der Pflanzen gibt es Mustererkennungszepatoren, sogenannte *Pattern Recognition Receptors* (PRR) auf der Zelloberfläche, die diese MAMPs erkennen können (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2008). Die beiden bekanntesten MAMPs sind Flagellin, aus dem die Flagellen beweglicher Bakterien aufgebaut sind, und Chitin, welches den Hauptbestandteil von Pilzzellwänden ausmacht. Es konnte gezeigt werden, dass ein besonders konservierter Bereich im N-Terminus des Flagellins, als flg22 bezeichnet, als Auslöser für eine Immunantwort ausreichend ist (Felix et al., 1999). Im Jahr 2006 konnte in *Arabidopsis thaliana* der entsprechende PRR FLS2 gefunden werden (Chinchilla et al., 2006). In Reis konnte ein spezifisch Chitin erkennender PRR gefunden werden. Bei diesem LysM-Motif enthaltendem CEBiP (Chitin elicitor binding protein) genannten Membranprotein konnte durch RNAi basierens herunterregulieren gezeigt werden, dass es eine Schlüsselrolle in der Erkennung von Chitin als MAMP spielt (Kaku et al., 2006). Eine durch PAMPs ausgelöste Immunität wird als PAMP triggered immunity (PTI) bezeichnet. Diese PTI beinhaltet eine Genexpressionsänderung, die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und die Verstärkung von Zellwandstrukturen, z.B. durch die Einlagerung von Kallose (Zipfel, 2008).

Würde diese PTI immer funktionieren wie sie soll, so gäbe es schon aufgrund der oben erwähnten MAMPs weder bakterielle noch pilzliche Pflanzenpathogene. Allerdings haben erfolgreiche Pathogene Wege gefunden, dieses grundlegende Erkennungssystem auszutricksen bzw. zu unterdrücken. Im Fall pilzlicher Pathogene konnte für die beiden Rostpilze *Puccinia graminis* und *U. fabae* sowie für den hemibiotrophen *C. lindemuthianum* nachgewiesen werden, dass die intrazellulären Strukturen in ihrer Zellwand Chitosan, ein Chitinderivat, eingelagert haben anstatt Chitin (ElGuedarri et al., 2002). ElGuedarri et al. vermuteten, dass dies dazu dient, der Zersetzung der eindringenden

Hyphen durch in der Pflanzenzelle vorliegende Chitinasen entgegenzuwirken. Darüber hinaus kann so auch einer verstärkenden Immunantwort durch die, bei der Zersetzung entstehenden, löslichen Chitinbruchstücke als PAMP entgegengewirkt werden. Neben dem Verändern der die Pflanzenabwehr auslösenden Oberflächenstrukturen, haben Pathogene noch eine andere Strategie entwickelt, um diese erste Stufe der Abwehr zu überwinden. So konnte in dem biotrophen Tomatenpathogen *Cladosporium fulvum* ein sekretiertes chitinbindendes Protein AVR4 gefunden werden. Für dieses Protein wurde gezeigt, dass es spezifisch an Chitin bindet, dass es dieses dadurch vor einer Hydrolyse durch Chitinasen schützt, und dass schließlich eine AVR4 Expression in *Arabidopsis thaliana* zu einer verstärkten Virulenz mehrerer pilzlicher nicht aber bakterieller Pathogene führt (van den Burg et al., 2006; van Esse et al., 2007). Dieses Protein scheint also eindeutig dafür verantwortlich zu sein, das Pathogen vor einer Pflanzenabwehr zu schützen. Ähnlich verhält es sich bei dem ebenfalls in *C. fulvum* entdeckten Protein Ecp6. Dabei handelt es sich um ein eine LysM-Domäne enthaltendes Protein, dass von den Hyphen freigesetzte Chitinoligosaccharide bindet, um dadurch eine PTI zu unterbinden (de Jonge et al., 2010). In *M. oryzae* konnte ebenfalls ein sekretiertes LysM-Domänen Protein Slp1 gefunden werden, das um die invasiven Hyphen akkumuliert ist, dort Chitin bindet und die pflanzliche PTI unterdrückt (Mentlak et al., 2012). Dieses Slp1 scheint also in Konkurrenz mit dem ebenfalls LysM-Domänen enthaltenden Reis-PRR CEBiP Chitinfragmente zu binden, wodurch sie nicht mehr von diesem erkannt werden können und eine Immunantwort ausbleibt.

Diese von den Pathogenen sekretierten Proteine werden Effektoren genannt. Sie dienen dazu, die pflanzliche Abwehr zu unterdrücken, so dass es den Pathogenen trotzdem ermöglicht wird, eine Symbiose zu etablieren. Nach dem von Jones und Dangl (2006) publizierten zigzag Modell führt diese durch Effektoren ausgelöste Unterdrückung der PTI zu einer so genannten *effektor-triggered susceptibility* (ETS), also einer durch Effektoren ausgelösten Anfälligkeit der Pflanzen. Allerdings ist das Repertoire an Abwehrmaßnahmen der Pflanze dadurch noch lange nicht ausgeschöpft.

In einer zweiten Verteidigungslinie entwickelten Pflanzen die Möglichkeit, die von den Pathogenen sekretierten Effektoren zu erkennen. Dies ist eine hochspezifische Abwehr, die sich gegen einzelne Pathogene richtet, die oft auch nur von einzelnen Pflanzenlinien gegen einzelne pathogene Stämme ausgebildet wird. Dafür sind sogenannte Resistenzgene (R-Gene) verantwortlich. Von diesen R- Genen gibt es acht unterschiedliche Klassen, wobei die größte Klasse aus Genen mit einer *nucleotide binding side* (NBS) und einer *leucine rich repeats* Domäne (LRR) bestehen (Zhang et al., 2012). Ist ein Effektor durch ein R- Protein entdeckt, wird eine *effector triggered immunity* (ETI), also eine durch Effektoren ausgelöste Immunantwort, induziert (Jones & Dangl, 2006). Die dadurch eingeleiteten Abwehrmaßnahmen sind eine stärkere Form der PTI und beinhalten zum Beispiel Verstärkung von Zellwänden, die Produktion von antimikrobiellen

Phytoalexinen und Sekundärmetaboliten, PR-Proteinen (pathogenesis related protein) und schließlich eine *Hypersensitive Response*, worunter der oben angesprochene Zellselbstmord zu verstehen ist. Dadurch soll die weitere Ausbreitung des Pathogens verhindert werden (Zipfel, 2008; Glazebrook, 2005; Heath 2000). Solche erkannten Effektoren werden als AVR-Proteine (Avirulenzproteine) bezeichnet. Es gibt verschiedene Modelle, wie diese Interaktionen, die zu einer Resistenz führen, ablaufen. In dem *gene for gene* Ansatz ist jedem AVR-Protein ein entsprechendes R- Protein zugeordnet, das es erkennt (Keen, 1990). In dem *guard* Modell dagegen „beschützt“ ein R- Protein mehrere eventuell durch Effektoren attackierte Wirtsproteine. Werden diese durch Effektoren verändert, wird dies durch das R- Protein festgestellt und eine ETI eingeleitet (Dangl & Jones 2001). Dieses Modell hat den Vorteil, dass ein R-Protein verschiedene Effektoren ausschalten kann und so im Verhältnis weniger R-Gene notwendig wären. Darüber hinaus gibt es Indizien für ein weiteres Modell, welches als *decoy* Modell bezeichnet wird. Dem liegt zugrunde, dass Effektoren oftmals multiple Ziele in der Pflanze haben, die teilweise aber keinen Einfluss auf die Virulenz haben. Diese Effektorziele sollen der Pflanze als Effektorfalle dienen, um Pathogene zu erkennen (van der Hoorn & Kamoun, 2008; Zhang et al., 2012).

Um nochmals auf das oben erwähnte Beispiel des *C. fulvum* Effektors AVR4 einzugehen, so zeigt der Name, dass es sich dabei um einen solchen erkannten Effektor handelt. Das bedeutet also, dass Stämme, die dieses AVR4 besitzen, Tomatenpflanzen nicht infizieren können, welche das entsprechende Cf4 R-Protein haben. Allerdings kann durch einzelne Punktmutationen in der Gensequenz des AVR4 diese Abwehr schon wieder umgangen werden (Joosten et al., 1997).

Auf diese Weise ist es ein ewiges Wettrüsten zwischen Mikroben und Pflanzen um mit neuen bzw. veränderten Effektoren die ETI zu verhindern, welche dann wieder durch neue bzw. veränderte R-Gene erkannt werden müssen.

Effektoren sind ein weit verbreitetes Phänomen bei mit Pflanzen interagierenden Symbionten. Darüber hinaus handelt es sich nicht nur um Proteine, welche, wie die oben beschriebenen Effektoren, im Apoplasten an pilzliche Moleküle binden, um diese zu tarnen. In der Interaktion von *U. fabae* mit *V. faba* wurde 2005 ein von dem Pilz stammendes Protein mit Kernlokalisierungssequenz (NLS) in der Wirtszelle und dort auch in dem Zellkern nachgewiesen (Kemen et al., 2005). 2010 konnten Rafiqi et al. die Effektorproteine AvrM und AvrL567 des Flachsrostpilzes *Melampsora lini* durch Immunolokalisation in Wirtszellen nachweisen. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass diese Effektoren, vermittelt durch einen N-terminalen Translokationsteil, unabhängig von der Gegenwart des Pathogens in die Wirtszellen eindringen können. Im Jahr 2011 konnten Djamei et al. in dem biotrophen Maispathogen *Ustilago maydis* das Effektorprotein Cmu1 identifizieren. Dieses Protein hat Ähnlichkeiten zu einer Choris-matmutase und greift in den Wirtszellen in den Shikimat-Syntheseweg ein. Dabei lenkt

es die Synthese weg von der Salicylsäureproduktion, welche ein Schlüsselhormon in der Pflanzenabwehr ist. Ebenfalls im Jahr 2011 konnten Klopffholz et al. erstmals ein Effektorprotein eines arbuskulären Mycorrhizapilzes präsentieren. Dieses Protein SP7 wird von dem Pilz sekretiert, von den Pflanzenzellen aufgenommen und dort in den Zellkern dirigiert, wo es mit dem Wirtstranskriptionsfaktor ERF19 interagiert und so zum Aufbau der biotrophen Symbiose beiträgt. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass SP7 ohne weiteres Zutun des Pilzes selbstständig in die Pflanzenzelle eindringt. Auch in dieser mutualistischen Symbiose macht die Gegenwart von Effektoren eindeutig Sinn. In den ersten Anfangsphasen der AM-Symbiose werden in Wirtspflanzen ähnliche Abwehrmaßnahmen eingeleitet, wie sie auch in parasitären Symbiosen auftauchen (Garcia-Garrido & Ocampo, 2002). Auf diese erste Reaktion der Pflanze muss der Pilz wiederum reagieren um sie in die „richtigen Bahnen“ zu lenken. Auch in dem weiteren Verlauf der Interaktion muss es für deren Zustandekommen zu einer ständigen Beeinflussung des Wirtes kommen. Deren Sinn lässt sich hier wohl weniger als ein Tarnen, Verstecken und Überrumpeln des Wirtes wie bei Pathogenen, sondern eher als eine Art Kommunikation mit dem Wirt, die ein Gelingen der Symbiose gewährleistet, bezeichnen. Dies scheint jedoch ein rein rhetorischer und wertender Unterschied zu sein, da die grundlegenden Verhalten und Mechanismen bei Pathogenen und mutualistischen Symbionten offensichtlich gleich sind.

Ziel intensiver Forschungsarbeit, ist die Frage wie ein Effektor an seine Wirkstelle kommt. Für apoplastische Effektoren ist dies recht einfach zu erklären, da ein reines Sekretieren des Proteins ausreicht. Wie allerdings gelangen Effektoren, die ihre Wirkung in den Wirtszellen entfalten, dort hin?

In den oben beschriebenen Beispielen der *M. lini* Effektoren AvrM und AvrL 567 (Rafiqi et al., 2010) sowie SP7 in *G. intraradices* (Klopffholz et al., 2011) konnte gezeigt werden, dass die Effektoren auch ohne die Gegenwart von Pilzstrukturen in die Pflanzenzellen eindringen. Dies setzt voraus, dass diese Effektoren in ihrer Sequenz alle für ein solches Eindringen notwendige Information enthalten. In Oomyceten konnte in etlichen Effektoren ein konserviertes N-terminales RXLR-Motif, manchmal gefolgt von einem dEER-Motif, gefunden werden. Für den *Phytophthora infestans* Effektor Avr3a (Whisson et al., 2007) sowie den *P. sojae* Effektor Avr1b (Dou et al., 2008) konnte durch Mutationen in den RXLR- und dEER-Motifen gezeigt werden, dass diese für den Transport der Effektoren in die Wirtszellen notwendig sind. Darüber hinaus konnten Dou et al. zusätzlich zeigen, dass dies auch in Abwesenheit des Pathogens geschieht. Kale et al. zeigten 2010 starke Hinweise darauf, dass diese Aufnahme in die Wirtszelle durch Endozytose erfolgt. Sie konnten sowohl für Avr1b- als auch AvrL567-GFP-Fusionsproteine kleine, vesikelähnliche, Strukturen beim Eindringen in Wirtszellen beobachten. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von die Endozytose blockierenden Reagenzien die Aufnahme der Effektoren verhindert werden. Ähnliche Endozytose nahele-

gende Membranstrukturen sahen auch Mims et al., 2002 bei Ultrastrukturuntersuchungen von Haustorien des Rostpilzes *Puccinia hemerocallidis*. In *M. oryzae* wurden endoplasmatisches Retikulum (ER) ähnliche Strukturen und Vesikel um invasive Hyphen herum beobachtet (Kankanala et al., 2007), während, wie oben schon beschrieben, Teile des ER auch bei arbuskulären Mycorrhizsymbiosen ein Bestandteil des PPA sowie des direkten Umfelds von Arbuskeln sind (Genre et al., 2008).

Wie genau die Translokation solcher RXLR-Effektoren funktioniert, wird allerdings noch heftig diskutiert. So publizierten Kale et al. (2010), dass das RXLR-Motiv des Effektorproteins Avr1b mit Phosphatidyl-inositol-3-phosphat (PI3P) auf der Wirtszellmembran interagiert und so das Eindringen der Effektoren in die Pflanzenzelle ermöglicht. Darüber hinaus entdeckten Kale et al. auch in den pilzlichen Effektoren AvrL567, Avr2 (*Fuarium oxysporum*) sowie AvrLm6 (*Leptosphaeria maculans*) N-terminale Bereiche für den Zelleintritt. Aus diesen entwickelten sie ein erweitertes RXLR-ähnliches Motiv, das allgemein in vielen pilzlichen Effektoren gefunden werden könne um diesen zum Zelleintritt zu verhelfen. 2011 allerdings veröffentlichten Yaeno et al., dass die Interaktion desselben Avr1b sowie des Avr3a mit PI3P nicht mit Hilfe des RXLR-Motivs stattfindet, sondern mittels der C-terminalen Effektordomäne. Da aber sowohl bei Avr3a als auch Avr1b das RXLR-Motiv notwendig und ausreichend sind, würde dies einer Rolle der PI3P-Bindung in der Effektoraufnahme widersprechen. Darüber hinaus besitzen einige der bislang gefundenen intrazellulären Effektoren, unter anderem die oben erwähnten Cmu1 und SP7, das von Kale et al. vorgeschlagene erweiterte RXLR-Motiv nicht (Rafiqi et al., 2012). Noch komplizierter wird es dadurch, dass es weitere diskutierte, konservierte Sequenzen gibt, wie z.B. ein N-terminales Motiv, das in Mehltaupilzen vorkommt (Godfrey et al., 2010), die möglicherweise für eine Translokation von Effektoren in Pflanzenzellen notwendig sind. Somit kann auf die Frage, wie Effektoren tatsächlich in die Wirtszellen gelangen, bislang noch keine abschließende Antwort gegeben werden.

2.2 *Magnaporthe oryzae*- ein vielschichtiger Pilz

2.2.1 Bedeutung von *M. oryzae*

Bei *M. oryzae* handelt es sich um einen filamentösen, haploiden, heterothallischen Ascomyceten, der unter anderem Reis (*Oryza sativa*) infiziert und dort den Reisbrand verursacht. Aufgrund dieser Krankheit gehen jährlich 10%-30% der Reisernte verloren, was ausreichen würde, um mehr als 60 Millionen Menschen ein Jahr lang zu ernähren (Skamnioti & Gurr, 2009). Darüber hinaus ist *M. oryzae* aber auch noch in der Lage mehrere andere Wirte, wie zum Beispiel Hirse (*Eleusine coracana*, *Setaria ssp.*), Gerste (*Hordeum vulgare*), Weizen (*Triticum aestivum*), Mais (*Zea mays*) und andere Gräser

zu infizieren (Couch & Kohn, 2002; Zellerhof et al., 2006). Dieser Pilz ist also sowohl unter wirtschaftlichen wie auch ernährungspolitischen Gesichtspunkten von entscheidender Bedeutung.

Bei allen bisher angesprochenen Arten handelt es sich um monokotyle Pflanzen. Wie Park et al. (2009) berichteten, sind mindestens zwei reispfadogene Stämme von *M. oryzae* allerdings auch dazu in der Lage, die dikotyle Pflanze *Arabidopsis thaliana* zu infizieren. In diesem Fall scheint der Pilz nicht zwingend die bei der Infektion von Reis verwendeten Penetrationsstrukturen (siehe Kapitel 2.2.2) zurückzugreifen, sondern sich hauptsächlich auf die Sekretion von Phytotoxinen zu stützen. Park et al. sehen in diesem System die Möglichkeit, die Antwort von monokotylen und dikotylen Pflanzen auf dasselbe Pathogen zu vergleichen.

M. oryzae ist aber auch innerhalb der gleichen Wirtsart sehr variabel in der Infektionsstrategie. So konnte neben der weithin bekannten Infektion von oberirdischen Pflanzenteilen, insbesondere der Blätter, durch Appressorien ein zweiter Infektionsweg durch die Wurzel entdeckt werden (Sesma & Osbourne, 2004). Durch die Fähigkeit beide Infektionswege zu verwenden, kann dieser Pilz als Modell zum Vergleich von Infektionen der Blätter und der Wurzel genutzt werden, wie zum Beispiel der Suche nach konservierten Schlüsselgenen für die einzelnen Infektionswege.

Ein großer Vorteil von *M. oryzae* als Modellorganismus ist es, dass der Pilz leicht in Kultur gehalten werden kann, dass er sich genetisch verändern lässt und dass sein Genom sequenziert ist (Dean et al., 2005; Caracuel-Rios & Talbot, 2007). Da in vergleichenden Genomanalysen festgestellt wurde, dass verschiedene infektionsrelevante Proteinfamilien in phytopathogenen Pilzen konserviert sind, spricht die leichte Handhabung und genetische Veränderbarkeit des hemibiotrophen *M. oryzae* für ihn als wissenschaftlichen Modellorganismus. Dies insbesondere, da obligat biotrophe Pathogene aufgrund ihrer Lebensweise nur sehr schwer in Kultur zu halten und zu untersuchen sind. Wie Guimil et al. (2005) in einer vergleichenden Transkriptomanalyse und auch Heupel et al. (2009) anhand des orthologen Genpaares *Erl1* aus *M. oryzae* und *Gin1* aus *Glomus intraradices* feststellten, lässt sich diese Konservierung von infektionsrelevanten Genen auch auf mutualistische Symbionten wie arbuskuläre Mykorrhizapilze ausdehnen, was die mögliche Bedeutung von *M. oryzae* als Modell für Pflanzen-Mikrobeninteraktionen noch weiter ausdehnt.

2.2.2 Ablauf der Infektion

Wie oben schon erwähnt, ist *M. oryzae* in der Lage, sowohl oberirdische Pflanzenteile, als auch die Pflanzenwurzeln zu infizieren. Die Infektion von Blättern erfolgt durch auf dem Luftweg transportierte Sporen. Landen diese, so heften sie sich mit einer Art Klebstoff an die Oberfläche (Hamer et al., 1988), beginnen auszukeimen und an der Spitze

dieses Keimschlauch eine spezielle Infektionsstruktur, ein Appressorium, zu bilden. In diesem Appressorium wird ein enormer Turgor aufgebaut, welcher zum Durchbrechen der pflanzlichen Zellwand benutzt wird (Howard et al., 1991). Für den Aufbau dieses Druckes wird in dem Appressorium Glycerol eingelagert (de Jong et al., 1997), zu dessen Synthese Autophagozytoseprozesse in dem Konidium notwendig sind (Veneault-Fourrey et al., 2006; Liu et al. 2007). In die Zellwand von Appressorien ist Melanin eingelagert, welches als Diffusionsbarriere für Glycerol dient, so dass dieses nicht entweichen kann, während von außen Wasser zuströmt, wodurch Druck aufgebaut wird. An der Unterseite der Appressorien befindet sich eine anfangs zellwandfreie Pore, die später von Zellwandmaterial überlagert wird und an der sich der Penetrationskeil zum Durchbrechen der Zellwand bildet. Um diese Pore herum fanden Dagdas et al. (2012) ein Aktinnetzwerk, das durch Septine organisiert und mit der Membran verbunden wird. Dieses Netzwerk soll der Stabilisierung und als Diffusionsbarriere dienen.

Ist die Pflanzenoberfläche dann durchbrochen, wächst eine primäre invasive Hyphe in die Pflanzenzelle ein. Aus ihr entwickelt sich anschließend eine sekundäre invasive Hyphe mit einer meist stark aufgeblähten Morphologie (Kankanala et al., 2007). In dieser Phase wachsen die Hyphen in einer typischen biotrophen Art und Weise wie Kankanala et al. zeigen konnten. So werden die Hyphen von einer pflanzlichen extra invasive Hypphen Membran (EIHM) umgeben und die pflanzliche Zelle ist intakt und am Leben. In dieser Phase sekretiert der Pilz ein ganzes Arsenal an Effektoren in die pflanzliche Zelle. So konnten Mosquera et al. (2009) vier biotrophie assoziierte Proteine (BAS1-4) vorstellen, die in die Zelle sekretiert werden. Durch Fusion der BAS-Proteine mit fluoreszenten Proteinen konnte die Lokalisation dieser Proteine in der Zelle gezeigt werden. BAS 1 und 2 treten in einem speziellen Komplex, dem „biotrophic interphacial complex“ (BIC) auf, der von Khang et al. (2010) genauer untersucht wurde. BAS3-Fluoreszenz konnte im Cytoplasma der Zelle gezeigt werden, während BAS4 die invasive Hyphe ummantelte. Khang et al. waren in der Lage zu zeigen, dass sowohl dieses BAS1 als auch ein weiteres Effektorprotein PWL2 im Cytoplasma der Pflanzenzelle auftrat und von dort in (noch) nicht infizierte Nachbarzellen gelangte. Bei diesem BIC handelt es sich um eine lokale Struktur, in der Effektoren akkumulieren. Dieser bildet sich an der primären invasiven Hyphe und wandert bei deren weiterem Wachstum an die Seite der sich entwickelnden sekundären Hyphe, wo er verbleibt (Khang et al., 2010).

Insgesamt wurden bislang 15 *M. oryzae* Effektoren gefunden, wovon 9 als AVR-Proteine wirken, und somit zu einer Resistenz der Wirtspflanze gegen den sie sekretierenden Pilz führen, sofern die infizierte Reispflanze das entsprechende R-Gen besitzt (Liu et al., 2013). Die ersten entdeckten Effektoren waren die beiden PWL1 und das oben schon erwähnte PWL2 (Kang et al., 1995; Sweigard et al., 1995). PWL steht hier für *prevents infection of weeping love grass*, was also bedeutet, dass Stämme, die diesen

Effektor besitzen, nicht in der Lage sind dieses gebogene Liebesgras (*Eragrostis curvula*) zu infizieren. Auf eine Infektion von Reis haben diese Proteine aber keine negative Auswirkung. Ein weiteres sehr bekanntes AVR-Protein ist AVR1-CO39. Obwohl es schon seit langer Zeit bekannt ist und seine Lage auf Chromosom 1 auf ein 1,6 kB Fragment eingeschränkt werden konnte, gelang es erst 2012 Ribot et al. endgültig das Gen zu bestimmen und dazu auch zu zeigen, dass es sich um ein in das Cytoplasma der Pflanzenzelle sekretiertes Protein handelt. Ein etwas exotisches AVR-Protein ist ACE1, da es sich bei dem Protein um eine im Cytoplasma von Appressorien lokalisierte Synthetase handelt. Die Avirulenzreaktion wird hier nicht von dem Protein selbst ausgelöst, sondern von einem von diesem produzierten Sekundärmetaboliten (Böhnert et al., 2004). Neben einigen anderen AVR-Proteinen und schon besprochenen Effektoren sind die beiden neuesten Mitglieder der *M. oryzae* Effektorenfamilie der oben schon erwähnte Slp1 (Mentlak et al., 2012), der allerdings extrazellulär als „Chitinfänger“ fungiert (siehe S. 24), sowie das Protein MC69 (Saitoh et al., 2012).

Nach ca. 32-36 Stunden Wachstum in der infizierten Zelle beginnen die Hyphen, ebenfalls biotroph, in die Nachbarzellen einzuwachsen. Dabei werden höchst wahrscheinlich die Plasmodesmen der Pflanzenzelle zum Durchwachsen der Zellwand verwendet (Kankanala et al., 2007). Nachdem eine neue Zelle infiziert wurde, scheinen die in der alten Zelle verbleibenden Hyphen auf eine nekrotrophe Lebensweise umzuschalten und die Zelle zu töten (Kankanala et al., 2007).

Neben diesem schon sehr lange bekannten Infektionsweg konnten Sesma & Osbourne (2004) einen weiteren Weg der Infektion durch *M. oryzae* über die Wurzeln der Wirtspflanze beschreiben. Dabei gelang es ihnen, Infektionsstrukturen zu zeigen, die sich deutlich von den Strukturen der Blattinfektion unterscheiden. So werden hier keine Appressorien zur Penetration eingesetzt, sondern Hyphopodien. Dabei handelt es sich um Hyphenschwellungen, welche sowohl an Keimschläuchen als auch an vegetativem Mycel gebildet werden können. Sesma & Osbourne konnten auch zeigen, dass für die Infektion von Wurzeln kein hoher Turgordruck notwendig ist. Diese Nachweise gelangen durch die Verwendung von Stämmen mit infektionsrelevanten Mutationen wie einer *cpka*-Mutante (unfähig, Appressorien auszubilden) und einer *buff*²-Mutante (keine Melaninsynthese), die trotzdem zu einer Infektion über die Wurzel in der Lage waren. Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde ein *Microarray* zum Vergleich des Transkriptoms von infiziertem Blattgewebe und Wurzelgewebe durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass 30 % der ersten 100 während der Wurzelinfektion stärker exprimierten Gene zellwandabbauende Enzyme waren. Dies stellt möglicherweise einen Hinweis auf die Art und Weise der Penetration in diesem Fall dar. Sesma & Osbourne konnten ebenfalls zeigen, dass für die Wurzelinfektion ein Gen essentiell ist, welches ein homologes Gen zu *FOW1* aus *Fusarium oxysporum*, einem typischen Wurzelpathogen, ist. Mit Hilfe von GFP- exprimierenden *M. oryzae*- Stämmen konnten sie auch zeigen, dass der

Pilz nach der Infektion in den Zentralzylinder und von dort in die oberirdischen Teile der Pflanze wächst, wo er die typischen Symptome hervorruft. Dufresne & Osbourne zeigten schon 2001, dass es auch Gene wie die MAP- Kinase *pmk1* gibt, die sowohl für die Blatt- als auch die Wurzelinfektion wichtig sind. In Abbildung 1.2 sind die Abläufe der möglichen Infektionswege durch Blatt und Wurzel dargestellt.

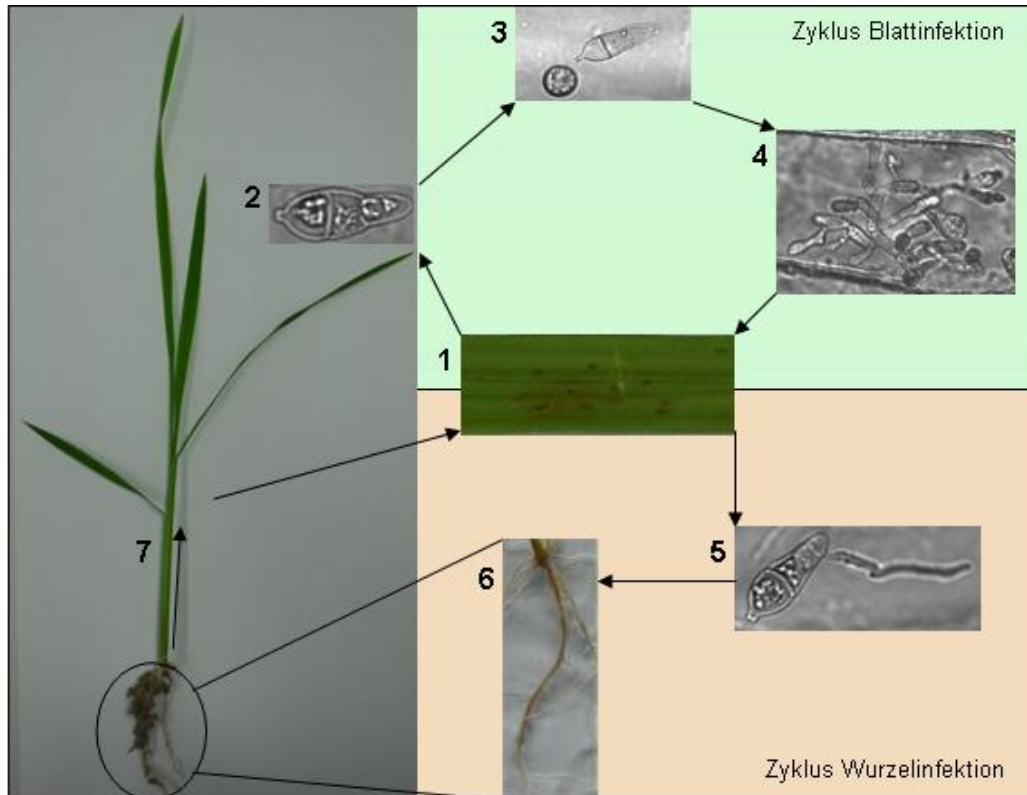


Abb. 1.2: Infektionswege und Lebenszyklen von *M. oryzae*. Zu sehen sind der Zyklus der Blattinfektion sowie der Zyklus der Wurzelinfektion. Von Läsionen auf einem Blatt (1) freigesetzte Sporen können andere Pflanzen auf zwei Wegen infizieren: entweder eine Spore lande auf einem Wirtsblatt (2), oder sie lande auf der Erde, keimt aus (5) und infiziert einen Wirt durch die Wurzel. Keimt die Spore auf einem Blatt, bildet sie ein Appressorium, (3) welches mit Hilfe von Turgordruck die Oberfläche durchbricht. In den Pflanzenzellen wachsen invasive Hyphen (4), diese wachsen in benachbarte Zellen, töten die verlassenen Zellen ab und bilden so Läsionen, von denen erneut Sporen ausgehen (1). Treffen Hyphen in der Erde auf Wurzeln, bilden sie dort Hyphopodien, was Infektionsstrukturen ohne den Einsatz von Druck sind, und kolonisieren die Wurzel (6). Innerhalb des Zentralzylinders wachsen Hyphen in oberirdische Pflanzenteile (7) und bilden dort wieder die typischen Symptome des Reis brandes aus (1).

2.3 Ziel der Arbeit

Seit einiger Zeit stehen Effektorproteine im Fokus der wissenschaftlichen Untersuchung von Pflanzen-Mikroben-Interaktionen. Insbesondere für biotrophe und hemibiotrophe pathogene Mikroorganismen wurde festgestellt, dass die Sekretion solcher Proteine eine sehr große Rolle für das Zustandekommen der Infektion spielt. In dem reispathogenen

Pilz *Magnaporthe oryzae* wurde bislang hauptsächlich die Infektion von Wirtspflanzen über das Blattgewebe untersucht. Allerdings ist dieser Organismus ebenfalls in der Lage, seine Wirtspflanzen über deren Wurzelsystem zu infizieren, jedoch existieren hierzu weit weniger Untersuchungen als zur Blattinfektion. Diese beiden Themenfelder sollen im Rahmen dieser Arbeit zusammengeführt werden.

Während meiner Diplomarbeit wurde ein *Microarray* mit dem Ziel durchgeführt, Gene von *M. oryzae* zu finden, welche während der Wurzelinfektion stärker exprimiert sind als während der Blattinfektion. Aus diesen sollen in dieser Arbeit nach einer *in silico* Analyse gezielt Gene ausgesucht werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit für Effektorproteine kodieren. Sie sollen daraufhin untersucht werden, ob es sich dabei wirklich um Effektoren handeln kann und ob sie einen Einfluss auf die Infektiosität des Pathogens haben. Dies soll durch gezielte Deletion der Gene und anschließende Infektionsversuche mit den mutierten Stämmen, durch Charakterisierung der Proteine hinsichtlich ihrer Sekretion, Lokalisierung und der Suche nach möglichen Interaktionspartnern durchgeführt werden.

Auf diese Weise könnten neue Erkenntnisse über mögliche Effektoren während der Wurzelinfektion sowie über den Infektionsweg von *M. oryzae* gewonnen werden. So könnte nicht nur ein besseres Verständnis der Infektionsmechanismen von *M. oryzae*, sondern von Interaktionen zwischen Pflanzen und pathogenen Pilzen allgemein erhalten werden. Durch ein besseres Verständnis dieser Infektionsprozesse könnte auch die Grundlage zu effektiveren Methoden für den Schutz von Kulturpflanzen in der Landwirtschaft gelegt werden.

3 Material

3.1 Organismen

3.1.1 *Magnaporthe oryzae*

In dieser Arbeit wurden mehrere *M. oryzae* Stämme verwendet. Zur Amplifikation der homologen Flanken für die Knockout Konstrukte wurden der Wildtypstamm Guy 11 sowie der Stamm 70-15 verwendet, welches auch der Laborstamm ist, dessen Sequenz durch das Broadinstitute veröffentlicht wurde. Er wurde durch zahlreiche Rückkreuzungen mit dem Wildtypisolat guy 11 entwickelt. Diesen Stamm erhielt ich freundlicherweise von Herrn Thines vom „Institut für Biotechnologie und Wirkstoff- Forschung“ (ibwf) in Kaiserslautern. Anhand der Datenbank des Broadinstitutes wurden die entsprechenden Flanken für die Klonierung der Knockout Konstrukte ermittelt.

Für die anschließenden Knockout Versuche wurde der Stamm Δ Ku80 verwendet (Villalba et al., 2008). Dabei handelt es sich um einen Wildtypstamm, bei dem das *Ku80*-Gen, welches essentiell für das nicht homologe end joining von Doppelstrangbrüchen ist, ausgeschaltet wurde. So soll sich die Wahrscheinlichkeit eines gezielten Genaustausches durch homologe Rekombination deutlich erhöhen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein GFP-markierter *M. oryzae*-Stamm der auf dem Wildtyp Guy 11 basiert verwendet. Dabei handelt es sich um einen Stamm, der in seinem Verhalten und seiner Morphologie dem Wildtyp entspricht, aber mit dem Green Fluorescent Protein (GFP) unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors transformiert ist. Dieses wird im Cytoplasma des Pilzgewebes exprimiert und fluoresziert unter Anregung durch Licht der Wellenlänge 490 nm grün.

Alle Stämme sind als Glycerolstock am Institut vorhanden und werden dort bei -80°C gelagert. Sie wurden auf CM (complete medium) -Agarmedium bei 28°C in Dunkelheit kultiviert. Nach dem ersten Animpfen einer CM- Agarplatte aus dem Glycerolstock, wurde von diesen Platten Mycel auf neue Platten überimpft. Jeweils nach ungefähr zwei Monaten wurde wieder eine frische Kultur aus dem Glycerolstock angeimpft.

Konidien wurden zwischen 10 und 15 Tagen nach der Inokulation geerntet. Hierzu wurde eine definierte Mycelfläche einer Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher abgekratzt und in einer entsprechenden Menge sterilem destilliertem Wasser (dH_2O) resuspendiert. Meist wurden ca. 4 cm^2 Mycel und 1 ml dH_2O gewählt, was aber je nach den Eigenschaften der Kolonie, gewünschter Sporenkonzentration und benötigter Suspensionsmenge variieren konnte. Dieses Gemisch wurde anschließend durch Glaswolle fil-

triert, wodurch die Konidien von dem Mycel getrennt wurden. Im Anschluss wurde mit Hilfe einer „Neubauer improved“- Zählkammer die Konzentration der Sporensuspension bestimmt. Lag die Konzentration höher als gewünscht, wurde sie entsprechend verdünnt. War sie zu gering, wurden die Konidien abzentrifugiert (4 min., 13000 rpm) und in einer entsprechend geringeren Menge dH₂O resuspendiert.

3.1.2 *Oryza sativa*

Für die Infektionsversuche wurde das *Oryza sativa* L ssp. *indica* Kultivar CO39 verwendet. Die Samen wurden vom Botanischen Garten der Universität Karlsruhe bezogen. Sie wurden vor dem Verwenden zuerst oberflächensterilisiert. Dazu wurden sie eine Minute mit 70% Ethanol behandelt, dreimal mit sterilem dH₂O gewaschen, 10 Minuten mit Natrium- Hypochlorid (2%) inkubiert und nochmals dreimal mit dH₂O gewaschen.

Die sterilisierten Samen wurden auf Wasseragarplatten gegeben und für mindestens zwei Tage bei 4°C gelagert. Zur Keimung wurden die Platten bei 25°C bei Tag- Nacht Rhythmus (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit) in einem Pflanzenwachstumschrank inkubiert. Die Keimlinge wurden nach 3-4 Tagen für die Versuche verwendet.

Für die Sprayinokulation mit Sporensuspension (Blattinfektionsversuche) wurden Reispflanzen in einem Alter von ca. 3 Wochen verwendet. Die Keimlinge wurden, nach einer Vorbehandlung wie der oben beschriebenen, in ein Gemisch aus Bausand und Vermiculite oder handelsübliche Blumenerde eingepflanzt. Sie wurden 1-2 mal in der Woche, je nach Bedarf, mit Yoshidalösung gegossen und bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit aufgezogen.

3.1.3 *Allium cepa*

Die Zwiebelschaleninfektionen wurden mit handelsüblichen Speisezwiebeln durchgeführt, die in einem normalen Supermarkt eingekauft wurden.

3.1.4 *Escherichia coli*

Alle verwendeten *E. coli* wurden in Flüssigkultur bei 37°C und 200 rpm bzw. auf Platten bei 37°C in/auf LB- Medium mit den entsprechenden Antibiotika inkubiert.

- **Top 10**

Genotyp: F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1*
araD139 Δ(*araleu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

Eigenschaften: Streptomycinresistent (50 mg/L). Geeignet für blue / white Screening

- **X11blue**

Genotyp: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB
lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

Eigenschaften: Tetracyclinresistent (25 mg/L). Geeignet für blue / white screening.

- **Mach 1**

Genotyp: ΔrecA1398 endA1 tonA Φ80ΔlacM15 ΔlacX74 hsdR(r_K⁻ m_K⁺)

Eigenschaften: wahrscheinlich der am schnellsten wachsende, chemisch kompetente *E. coli* Stamm derzeit (Verdopplungszeit ca. 50 min.).

- **DB3.1**

Genotyp: F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB-, mB)
ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Smr) xyl5 Δleu mtl1

Eigenschaften: Streptomycin resistent (50 mg/L). Durch eine Mutation in der Gyrase (gyrA462) können Plasmide, die das ccdB_Gen enthalten, kloniert werden

3.1.5 *Agrobacterium rhizogenes*

Um hairy roots von *Medicago truncatula* zu erhalten, wurde der *A. rhizogenes*- Stamm ARqual (Referenz: Quandt et al., 1993) verwendet. In diesen wurden durch Elektrottransformation die gewünschten Plasmide transformiert.

Ri- Plasmid: Ri- Plasmid: pRiA4b

Genotyp: wt, SM^R

Phänotyp: Onc+, SM^R, BiotypII (Keane et al., 1970)

Eigenschaften: Streptomycinresistenz (600mg/l), Derivat des Wildtyps R1000, Derivat des Wildtyps A4T (Moore et al., 1979)

Kultiviert wurden die *A. rhizogenes* vor der Transformation auf/in LB Medium mit Streptomycin als Selektionsmarker (600 µg/ml) bei 28°C, und nach der Transformation auf LB- Medium mit Streptomycin und dem entsprechenden Selektionsantibiotikum des Plasmids.

3.1.6 *Agrobacterium tumefaciens*

Für die transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* wurde der *A. tumefaciens* Stamm GV3101/pMP90 (Referenz: Koncz & Schell, 1986) verwendet.

Ti- Plasmid: pMP90 (pTiC58 ΔT-DNA), Gm^R,

Genotyp: C58, Rif^R

Phänotyp: Nopalin+, Gentamycinresistent (40µg/ml), Rifampicinresistent (100µg/ml)

Kultiviert wurden die *A. thumefaciens* ebenfalls auf/in LB- Medium bei 28°C mit 40µg/ml Gentamycin im Medium plus dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion nach dem transformierten Plasmid.

3.1.7 *Saccharomyces cerevisiae*

Hefen wurden, sofern sie untransformiert waren, auf/in YPDA- Medium bei 37°C inkubiert. In Flüssigkultur wurden sie bei 220 rpm geschüttelt. Transformierte Hefestämme wurden auf/in SD- Medium inkubiert, dem die entsprechenden Aminosäuren zur Selektion fehlen. Transformierte Y12321- Zellen können zur Selektion auch auf Saccharose-Medium angezogen werden.

- **Y12321**

Genotyp: BY4741; Mat a; his3D1; leu2D0; lys2D0; ura3D0; YIL162w::kanMX4

- **AH109**

Genotyp: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ,
LYS2 : :GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2,
URA3 ::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1

- **Y187**

Genotyp: Matα; ura3-52; his3-200, ade2-101; trp1-901; leu2-3, 112; gal4α;
met-; gal80α; URA3 : : GAL1UASGAL1TATA-lacZ; MEL1

Die beiden Stämme AH109 und Y187 sind Teil des Matchmaker™ Library Construction and Screening Kit, während der Y12321 Stamm von dem European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for functional Analysis stammt.

3.1.8 *Medicago truncatula*

Zum Erhalt von hairy roots wurde das *M. truncatula* Kultivar Jemalong A17 verwendet. Die hairy roots wurden auf M- Medium inkubiert.

3.1.9 *Aspergillus nidulans*

In dieser Arbeit wurde der Stamm RMSO11 (Referenz Stringer et al., 1991) verwendet. Er wurde bei 37° C auf MM- Medium mit den Auxotrophiemarkern pyro und paba angezogen.

Genotyp: pabaA1, yA2, _argB::trpC_B; veA1, trpC801

3.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

3.2.1 Benutzte Kits

Tabelle 1: In dieser Arbeit benutzte Kits

innuPrep Plant RNA Kit	Analytik Jena AG, 07745 Jena, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit (mit pCR® 2.1 TOPO® Vektor)	Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland
Zymoclean™ Gel recovery Kit	Hiss Diagnostics GmbH, 79106 Freiburg, Deutschland
Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit	Takara Bio Europe/Clontech, Saint – Germain-en-Laye, France:630445
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim, Deutschland
pENTR™/ D-TOPO® Cloning Kit	Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland
Gateway® LR- Clonase® II Enzyme Mix	Invitrogen GmbH, 76131 Karlsruhe, Deutschland

3.2.2 Medien

Alle Medien wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und zum Sterilisieren autoklaviert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden für Festmedien 1,5% Agar verwendet. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren, direkt vor dem Gießen, der Platten bei ca. 50°C zugegeben. Diese hitzeempfindlichen Zugaben wurden zuvor steril filtriert (Porendurchmesser 0,45 µm).

- LB- Medium: Kultur von Bakterien

10 g Trypton, 10 g NaCl, 5 g Hefeextrakt

Auf 1 l auffüllen, pH auf 7 einstellen, autoklavieren.

- SOC- Medium: Verwendet bei der Transformation von Bakterien

5 g Hefeextrakt, 20 g Trypton, 0,584 g NaCl, 0,186 g KCl,

Auf 1 l auffüllen mit dH₂O, pH auf 7 einstellen, autoklavieren.

- modifiziertes Fahraeus Medium: verwendet für Wurzelinfektionen

Tabelle 2: modifiziertes Fahraeus- Medium

	Stock	Endkonzentration
Macroelemente		
Calciumchlorid CaCl_2	0,9 M	0,9 mM
Magnesiumsulfat MgSO_4	0,5 M	0,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4	0,7 M	0,7 mM
Di-Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	0,4 M	0,8 mM
Eisencitrat	20 mM	20 μM
Ammoniumnitrat NH_4NO_3	1 M	0,5 mM
Microelemente		
Manganchlorid MnCl_2	1 mg/ml	100 $\mu\text{g/l}$
Kupfersulfat CuSO_4	1 mg/ml	100 $\mu\text{g/l}$
Zinkchlorid ZnCl_2	1 mg/ml	100 $\mu\text{g/l}$
Borsäure H_3BO_3	1 mg/ml	100 $\mu\text{g/l}$
Natriummolybdat Na_2MoO_4	1 mg/ml	100 $\mu\text{g/l}$
Agar		15 g/l

Der pH Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

Für die Kultivierung von Reiskeimlingen in Petrischalen wurde das Fahraeusmedium in leicht schräg stehende Petrischalen gegossen. Auf diese Weise war in der einen Hälfte der Petrischale eine größere Menge Medium (der Bereich für die Wurzeln), während in der anderen sehr wenig war (der Bereich des Sprosses).

- CM-Medium: zum Kultivieren von *M. oryzae*

50 ml 20x Nitratsalze (siehe Lösungen), 1 ml Spurenelemente (siehe Lösungen), 1 ml Vitaminlösung (siehe Lösungen), 10 g D-Glucose, 2 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 1 g Caseinhydrolysat

Es wurde mit 1 l dH_2O aufgefüllt und der pH Wert auf 6,5 eingestellt.

- Wasseragar: Zum Keimen der Reissamen

Destilliertes Wasser mit 0,6% Agar, autoklaviert

- YPDA- Medium: Zur Kultivierung von Hefe

20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt, 0,003 % Adenin

Auf 1 l auffüllen, den pH auf 6,5 einstellen, zum Gießen von Platten werden zusätzlich 20 g /l Agar eingewogen. Nach dem Autoklavieren werden 2% Glucose hinzugefügt (20 g Glucose in 50 ml dH₂O gelöst, steril filtriert) und im Fall von Agarplatten diese nach kurzem Rühren gegossen.

- SD- Medium: Zur Kultivierung von Hefe

6,7 g Hefeminimalmedium ohne Aminosäuren, 100 ml 100x LTHA- Dropoutlösung

Je nach Hefestamm werden die entsprechenden Volumina an nötigen Aminosäurelösungen zugesetzt, auf 1 l aufgefüllt und der pH-Wert auf 5,8 eingestellt. Nach dem Autoklavieren werden 2% Glucose hinzugefügt (20 g in 50 ml dH₂O gelöst, steril filtriert) und im Fall von Agarplatten, diese nach kurzem Rühren gegossen.

- Saccharose- Selektionsmedium: Zur Selektion im Verlauf des „yeast signal sequence traps“

10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 20 g Saccharose. pH bei 6,2 einstellen und anschließend 20 g Agar zugeben. Auf 1 l auffüllen und autoklavieren.

- M+S - Medium: Kultivieren von transformierten *M. truncatula* hairy roots

Tabelle 3: Zusammensetzung von M+S-Medium

Element	Endkonzentration	Stammlösung	Für 1 l
Makroelemente			25 ml
KNO ₃	80 mg/l	3,2 g/l	
MgSO ₄ *7H ₂ O	731 mg/l	29,24 g/l	
KCl	65 mg/l	2,6 g/l	
KH₂PO₄	4,8 mg/l	48 mg/l	100 ml
Ca(NO₃)₂	288 mg/l	115,2 g/l	2,5 ml
Na-FeEDTA	8 mg/l	3,2 g/l	2,5 ml
Mikroelemente			1 ml
MnCl ₂ *4H ₂ O	6 mg/l	6 g/l	
H ₃ BO ₃	1,5 mg/l	1,5 g/l	
ZnSO ₄ *7 H ₂ O	2,65 mg/l	2,65 g/l	
andere Elemente			100µl
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,0024 mg/l	0,0024 g/100 ml	

CuSO ₄ *5H ₂ O	0,13 mg/l	0,13 g/100 ml	
Vitamine			10 ml
Glycin	3 mg/l	0,3 g/l	
Myoinositol	50 mg/l	5 g/l	
Nicotinsäure	0,5 mg/l	50 mg/l	
Piridoxin HCl	0,1 mg/l	10 mg/l	
Thiamin HCl	0,1 mg/l	10 mg/l	
Saccharose			10 g

- AS- Medium: acetosyringonhaltiges Medium, zur Inkubation im Verlauf einer *Nicotiana benthamiana* Transformation durch *A. tumefaciens*.

10mM MES- KOH (pH 5,6), 10 mM MgCl₂, 150 µM Acetosyringon

3.2.3 Lösungen

- 10 x TAE Puffer (pH 8,5)

Für 5 l: 242g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 37,2g Na₂EDTA* 2 H₂O in 4,5 l dH₂O. 57 ml Eisessig zugeben und mit dH₂O auf 5 l auffüllen.

- 10x TE- Puffer

100 ml 1M Tris- Puffer (pH8) und 20 ml 0,5 M Na₂EDTA (pH8) zu 880 ml dH₂O geben, autoklavieren.

- Lösungen für die Plasmidpräparation aus *E. coli*

Lösung I: 50 mM Tris- HCl pH 7,5; 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A

LösungII: 0,2 M NaOH, 1% SDS

Lösung III: 75 ml Stocklösung, 175 ml dH₂O (Stocklösung: 60 ml 5M KAcetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml dH₂O)

- 20x Nitratsalze: 120 g NaNO₃
10,4 g KCl
10,4 g MgSO₄ *7H₂O

Mit doppelt destilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen, autoklavieren.

- Spurenelemente: 2,2 g ZnSO₄ *7H₂O

1,1 g H_3BO_3
 0,5 g $\text{MnCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 0,17 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 0,16 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
 0,15 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 5 g Na_2EDTA

Alle Komponenten wurden in dieser Reihenfolge zu 80 ml doppelt destilliertem Wasser gegeben. Die Lösung wurde danach aufgekocht, auf 60°C abkühlen gelassen und der pH- Wert mit KOH auf 6,5 eingestellt. Wieder auf Raumtemperatur abgekühlt, wurde mit doppelt destilliertem Wasser auf 100ml aufgefüllt.

- Yoshida- Nährlösung

Tabelle 4: Makro- und Mikroelemente der Yoshida-Lösung

Makroelemente	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	40,3 g/l
K_2SO_4	71,4 g/l
CaCl_2	88,6 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	324 g/l
NH_4NO_3	91,4 g/l
Mikroelemente	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1500 mg/l
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	74 mg/l
H_3BO_4	934 mg/l
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	35 mg/l
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	31 mg/l
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	7700 mg/l
Citrat-Monohydrat	11,9 g/l

Die Yoshida- Makroelemente wurden einzeln gelöst und autoklaviert. Von diesen Stammlösungen wurde jeweils 1 ml für 1 l Yoshida- Lösung verwendet.

2 g/l L- Histidin HCl Monohydrat werden in dH₂O gelöst, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

- L- Leucin Stammlösung (100x)

10 g/l L- Leucin werden in dH₂O gelöst, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

- L- Tryptophan Stammlösung (100x)

2 g/l L Tryptophan werden in dH₂O gelöst, autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

- Denaturierungspuffer für Southern Blot

0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl

- Neutralisierungspuffer für Southern Blot

0,5 M Tris- HCl, pH7,5, 1,5 M NaCl.

- DIG- Standard Hybridisierungspuffer für Southern Blot

125 ml 20x SSC, 0,5 g N- laurylsarcosine, 1ml 10% SDS, 50 ml 10x Blockierlösung, auf 500 ml auffüllen

- 10x Blockierlösung für Southern Blot

10% Blockierreagenz (Roche) in Puffer 1 für Southern Blot

- Waschlösung für Southern Blot

Für 2x Waschlösung 100ml 20x SSC (25 ml für 0,5X), 10 ml 10% SDS, auf 1l mit dH₂O auffüllen

- 20x SSC

3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat

- Puffer 1 für Southern Blot

100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH mit NaOH- Plätzchen auf ca. 6,7 einstellen und dann mit 10 M NaOH wieder auf einen endgültige pH von 7,5.

- Waschpuffer für Southern Blot

Puffer 1 mit 0,3% Tween 20

- Puffer 2 für Southern Blot

Puffer 1 mit 1% Blockierreagenz

- DIG- Antikörperlösung für Southern Blot

Puffer 2 mit 5µl/ 50 ml DIG- Antikörpern

- AP-Puffer für Southern Blot

100mM Tris- HCl, pH9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂

- MMR- Medium für Asperillus- Transformation

10 ml Salzlösung, 0,5 ml Spurenelemente, 171 g Saccharose, 7,5 g Agar, auffüllen auf 1 l und ph 6,8. Nach autoklavieren 50 ml 10x Glucose (200g/l) und 5 ml 100x Ammoniumtartrat (9,2g/ 100ml) zugeben.

- Lösung 2 für Aspergillus- Transformation

Für 50 ml: 14,9 g MgSO₄* 7H₂O, 1,8 ml 0,2 M Na₂HPO₄, 0,7 ml 0,2 M NaH₂PO₄, pH 5,5, steril filtrieren

- Lösung 5 für Aspergillus- Transformation

Für 100 ml: 10,9 g 0,6 M Sorbitol, 10 ml 0,1 M Tris- HCl, pH 7,5, autoklavieren

- Lösung 6 für Aspergillus- Transformation

Für 100 ml: 18,22 g 1 M Sorbitol, 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5, autoklavieren

- Lösung 7 für Aspergillus- Transformation

Für 100 ml: 18,22 g 1 M Sorbitol, 1 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5, 1 ml 1 M CaCl₂, autoklavieren

- Lösung 8 für Aspergillus- Transformation

Für 50 ml: 30 g PEG 4000, 0,5 ml 1 M Tris-HCl pH 7,5, 0,5 ml 1 M CaCl₂, autoklavieren

3.2.4 Chemikalien

Alle im Weiteren nicht extra aufgeführten Chemikalien wurden bei den Firmen Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), peqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen), Merck KGaA (Darmstadt) und AppliChem GmbH (Darmstadt) erworben.

RNA- Extraktion und cDNA- Synthese:

- RNase OUT: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 25 mM EDTA: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 10 X DNase I Reaction buffer: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- DNase I Amplification grade: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- SuperScript reverse Transcriptase: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- oligo dT –Primer: Invitrogen GmbH, Karlsruhe

- 5X First strand buffer: Invitrogen GmbH, Karlsruhe
- 0,1 M Dithiothreitol (DTT): Invitrogen GmbH, Karlsruhe

PCR:

- dNTPs: peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
- Pfu DNA- Polymerase: Fermentas, Burlington, Kanada
- Phusion High Fidelity DNA- Polymerase: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

Enzyme, die nicht Bestandteil eines Kits waren:

- Restriktionsendonucleasen: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Fermentas, Burlington, Kanada
- T4- DNA Ligase: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- Antarctic Phosphatase: New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
- Glucanex 100G: Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark

Southern Blot

- DIG- Antikörper: Anti digoxigenin AP Fab Fragments, Roche Diagnostics GmbH Mannheim
- Chemiluminescence Substrate: CDP- Star, Roche Diagnostics GmbH Mannheim
- Blocking reagent, Roche Diagnostics GmbH Mannheim

3.2.5 Geräte

- Mikroskop: Zeiss AxioVision Imager. Z1 mit Kamera Zeiss AxioCam MRm, Zeiss, Göttingen
- Fluoreszenz- Binokular: Zeiss Lumar. V12 Stereo, Zeiss, Göttingen
- Konfokalmikroskop: Leica TCS SP5
- Pflanzenwachstumsschrank: Binder KBW 400, Binder, Tuttlingen
- Brutschrank für *M. oryzae* und Agrobakterien : Typ BE 80, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
- Zählkammer: Neubauer improved, Brand GmbH + CO KG, Wertheim
- Zentrifuge: Spectrafuge 24 D, Labnet international, Woodbridge, USA
- Kühlzentrifuge: Eppendorf 5403, Eppendorf AG, Hamburg
- Gelelektrophoresekammer: Mupid®- exU, Advance co. Ltd, Tokyo, Japan

- Geldokumentation: Darkroom- CN 3000, Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell
- Photometer: ND 1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington USA
- PCR- Maschine: Biometra Tpersonal, Biometra GmbH Göttingen

3.2.6 Verbrauchsmaterial

Alle im Weiteren nicht aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe), A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg), Sarstedt AG & Co (Nümbrecht) bezogen.

- Cellophan : Cellophan, Papier Brinkmann GmbH, Münster
- Fuji Film medical XRay Film Super RX 100 NIF

3.2.7 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von der Eurofins MWG GmbH, Erlangen bezogen.

Tabelle 3.1: verwendete Primer, die Schmelztemperatur ist für den Gesamtprimer und in Klammer ohne eventuell angehängte Restriktionsschnittstellen und ähnliches angegeben.

Name	Sequenz	Länge	Tm °C
KO- Konstrukte			
08230downfw2pac	gtgtaattaagacagcaacaaggagcacac	31 bp	65,5 (59,4)
08230downrev1,6kb	cgtacctgtcagcaatcagc	20bp	59,4
08230KOnesFW	cttgggcaaaatgtggttaaactg	25bp	59,7
08230upRevASC	ggcgcgccgttgagaagtcgaaaagaaagaact	33bp	70,7 (58,1)
05504upFw1,9kb	cacggagcggagcctaac	19bp	61
05504uprev1	cacggcctgagtgccgttgccgaattggaatgccttg	38bp	77 (60,3)
05504 KOdown FW	gtgggccatctaggcccgcagctaagaatagag-ttaaatac	41bp	73,4 (58,1)
05504 KOdown Rev	catgcagcactgtcaatctttgc	23bp	60,6
10244 KOupFW	tttgacctctttgtgcttcc	22bp	60,3

10244uprevASCI	cacggcgcgcacctacattcatccagtcggtgcaaa	35bp	74,2 (58,1)
10244 downFW3Pac	gtgtaattaagaatggcaacagtcggaggac	32bp	66,9 (61,8)
10244 down rev2kb	ttagttgtacgtggaccggaag	22bp	60,3
14156upFW	aggaccccgacattttcaac	22bp	60,3
14156uprevAsc	cacggcgcgccttgaggagagaagataaaagggaag	36bp	74 (59,7)
14156downFWPac	gtgtaattaataactaatggctggcgcaacc	32bp	65,6 (59,8)
14156downRev2	gcaagggtgaattgtgggac	21bp	59,8
pCGFP- Konstrukte			
08230ORF+SPFW	caccatgcagatctcaagattgttcagg	29bp	65,3 (59,7)
08230 ORF-SP FW	ctccccgccccggccaa	17bp	73 (64,8)
08230 ORF REV	cgaccacagttcgtgatgatcgc	23bp	64,2
05505 ORF+SP FW	caccatgcagctctcatccgttttc	26bp	66,4 (60,3)
05504 ORF-SP Fw	caccatgcaggcagcttcgcttttc	26bp	68 (58,8)
05504 ORF REV	agcaagctcctcgaaaagg	20bp	59,4
05504SP Rev	agctgctgggtgacagac	19bp	61
10244 ORF+SP FW	caccatgaagtcggcaatcatcctc	25bp	64,6 (57,9)
10244 ORF- SP FW	caccatgtgcccgtgcccgc	22bp	71,4 (61,5)
10244 ORF Rev	ggccttggtcatcttgccc	20bp	61,4
14156 ORF +SP FW	caccatgaagtcctctttgtttatctcacctc	34bp	67,1 (61)
14156 ORF –SP FW	caccatggcaccggaaagcctgg	24bp	69,6 (60)
14156 ORF Rev	tcctcgggtggcggcatt	18bp	60,5
ysst- Konstrukte			
pyst2 08230FW EcoRI	cagaattcatgcagatctcaagattgttcagg	33bp	65,8 (59,7)
pyst2 08230 Rev NotI	gtgcggccgcaagcagatcatcacgaactgtgg	32bp	74,6 (59,8)
05504ystFwEco	cagaattcatgcagctctcatccgttttc	30bp	66,8 (60,3)
05504ystRevNot	gtgcggccgcaaagcaagctcctcgaaaagg	32bp	74,6 (59,4)
y2h- Konstrukte			
08230y2hFw NdeI	gtgcatatgctccccgccccggccaa	26bp	72,7 (64,8)
08230 y2hRev EcoRI	cacgaattcgcgatcatcacgaactgtggtcg	32bp	70,8 (64,2)

05504y2hFW NdeI	gtgcatatgcaggcagcttcgctttctc	28bp	68 (58,8)
05504y2hRev EcoRI	cacgaattcctaagcaagctcctcgcaaaag	31bp	68,2 (60,3)

Zur Herstellung der Konstrukte für die Aspergillus- Transformation wurden die Primer zur Amplifikation des ORF mit Signalpeptid der pCGFP Konstrukte nochmals verwendet.

3.2.8 Verwendete Plasmide

pCR2.1/ TOPO

Beschreibung: Vektor zur TOPO TA Klonierung über 3`A- Überhänge. Klonierung von PCR- Produkten.

Selektion: Blau- Weiß- Selektion, Ampicillinresistenz, Kanamycinresistenz

Quelle: Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pENTR/D-TOPO

Beschreibung: Entry- Vektor für Gateway Klonierungen, direktionales Klonieren von blunt end PCR- Produkten

Selektion: Kanamycinresistenz

Quelle: Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pYST2

Beschreibung: Vektor zur C-terminalen Fusion der suc2- Invertase ohne Signalpeptid für yeast signal sequence trap. Der enthaltene Promotor und Terminator stammen jeweils von der Alkoholdehydrogenase.

Resistenz: Auxotrophiemarker Leucin in Hefe, Ampicillinresistenz in *E. coli*

Quelle: J.K.C. Rose, Cornell Universität Ithaca

pCGFP- RR

Beschreibung: Gatewayvektor zur C-terminalen eGFP- Fusion. Agrobakterien vermittelte Transformation von Pflanzen. p35S Promoter und T35S Terminator zur Expression des Fusionsproteins in Pflanzen. Expression von dsRED unter dem Pubq10 Ubiquitinpromotor.

Selektion: Spektinomycin/Streptomycinresistenz in Bakterien, Kanamycinresistenz in Pflanzen.

Quelle: Kuhn et al., 2010

pSK-Tox-mRFP

Beschreibung: Gatewayvektor zur C-terminalen Fusion von mRFP unter Kontrolle des ToxA Promotors. Zur Transformation von *M. oryzae*. Die Basta-Resistenzkassette zur Selektion in *M. oryzae* ist unter der Kontrolle des Tryptophan C Promotors.

Selektion: Spektinomycin/ Streptomyciresistenz in Bakterien, Phosphinotricin- Acetyl- Transferase vermittelte Resistenz gegen Glufosinat (Bastaresistenz) in *M. oryzae*

Quelle: S. Klopffholz, Molecular Phytopathology Department, KIT Karlsruhe

pGBKT7

Beschreibung: Vektor des Yeast two Hybrid Systems. N- terminale Fusion der Gal4 Bindedomäne. Unter der Kontrolle des PADH1- Promotors. Enthält c-myc Tag

Selektion: Kanamycinresistenz in *E. coli*, Auxotrophiemarker Tryptophan in Hefe.

Quelle: Takara Bio/ Clontech

pGADT7

Beschreibung: Vektor des Yeast two Hybrid Systems. N- terminale Fusion der Gal4 Aktivierungsdomäne. Unter der Kontrolle des PADH1- Promotors. Enthält den HA- Tag.

Selektion: Ampicillinresistenz in *E. coli*. Auxotrophiemarker Leucin in Hefe.

Quelle: Takara Bio/ Clontech

pMT-sGFP

Beschreibung: Gatewayvektor zur C- terminalen GFP Fusion. Unter der Kontrolle des alcA- Promotors. Zur Transformation von *Aspergillus nidulans*.

Selektion: Ampicillinresistenz in *E. coli*. Auxotrophiemarker ArgininB zur Selektion in *A. nidulans*.

Quelle: Toews et al., 2004

4 Methoden

4.1 Infektion von Reiswurzeln (CO39) mit *M. oryzae*

4.1.1 Infektion durch vegetative Hyphen

Für dieses Infektionsverfahren wurde auf eine Fahraeus- Schrägagarplatte Cellophan so aufgelegt, dass es knapp den Bereich, in dem die Wurzeln liegen sollten, bedeckte. Mit einer Impföse wurde von einer *M. oryzae*- Kolonie etwas Material abgekratzt, über das Cellophan gerieben und so die Platte teilweise mit *M. oryzae* inokuliert. Das Cellophan hatte die Funktion zu verhindern, dass das Mycel in den Agar hinein und damit weg von der Wurzel wuchs. Anschließend wurden die Platten bei 28°C für 3-4 Tage inkubiert, bis sich ein erkennbares Mycel entwickelt hatte.

Nun wurden die Reiskeimlinge mit den Wurzeln nach unten auf die Fahraeusplatte gegeben. Dabei war darauf zu achten, dass die Wurzeln möglichst großflächig auf dem Pilzmycel auflagen. Waren die Keimlinge auf der Platte wurden sie aufrecht in einem Lichtschrank bei 25°C und einem Tag/ Nacht Rhythmus von 8h/16h inkubiert. Nach 3, 7, und 10 Tagen wurden die Wurzeln bewertet und fotografiert. Nach 10 Tagen wurde der Versuch abgebrochen, die Wurzeln gezählt, vermessen und nochmals im ganzen ohne Agar fotografiert, um den Infektionsgrad besser bestimmen zu können.

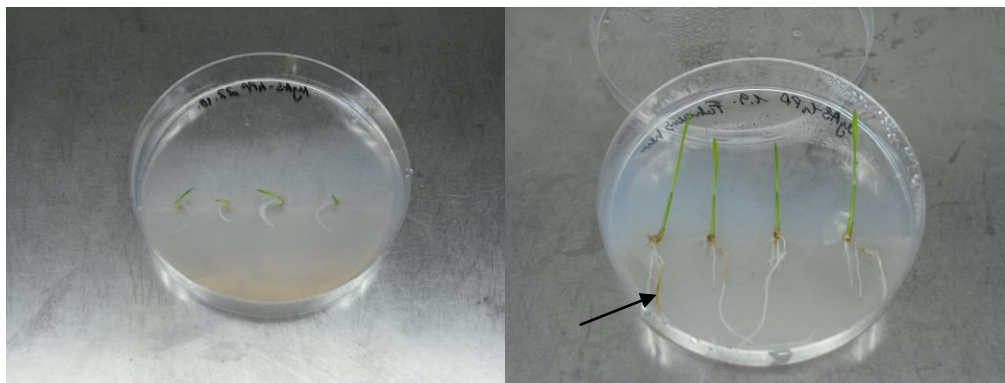


Abb. 4.1: Ansatz der Wurzelinfektion mit vegetativen Hyphen. Links zu sehen: Frisch aufgelegte Keimlinge, die Wurzeln liegen auf Cellophan mit *M. oryzae* Mycel. Rechts: Nach 3 Tagen Inkubation, der Pfeil markiert eine deutliche Braunfärbung einer Wurzel aufgrund einer Infektion.

4.2 Blattinfektionen mit *M. oryzae*

4.2.1 Blattinfektion von Reis durch *M. oryzae*

Für die Blattinfektionen wurden ca. 3 Wochen alte Reispflanzen verwendet. Diese wurden in einem Gemisch aus Sand und Vermiculite angezogen und mit Yoshida- Nährlösung gegossen. Sie wuchsen bei einem Tag/Nacht Rhythmus von 8 h hell und 16 h dunkel.

Für die Infektion wurden 15 ml einer Sporensuspension mit einer Konzentration von 10^5 Sporen/ ml benötigt. Dazu wurde zuerst eine Sporensuspension von 2-3 Kolonien des gewünschten Stammes hergestellt. Hierfür wurden auf die Kolonien 10 ml steriles dH₂O gegeben und mit einem Drigalsky- Spatel das Mycel abgekratzt. Diese Flüssigkeit wurde anschließend durch 2 Lagen Miracloth in ein 50 ml Falcon filtriert, um das Mycel von den Konidien zu separieren. Diese Sporensuspension wurde 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Im Anschluß wurden die Sporen in einer geringeren Menge an dH₂O resuspendiert, gezählt und berechnet, welches Volumen dieser Suspension notwendig war, um 15 ml der gewünschten Konzentration zu erhalten. Dieses Volumen wurde im Anschluss in ein 15 ml Falcon gegeben, auf 15 ml mit 0,25 % Gelatinelösung aufgefüllt und wurde mit einer Pumpsprühflasche auf die Blätter der Pflanzen gesprüht. Die Pflanzen waren dafür in eine durchsichtige Plastiktüte (Gefrierbeutel) gestellt worden und anschließend verschlossen. Sie wurden in einem 25°C Lichtschrank mit Tag/Nacht Rhythmus 8 h/16 h gestellt. Nach 24 h wurden sie nochmals mit Wasser besprüht und für weitere 3 Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Blätter einzeln betrachtet und fotografiert.

4.2.2 Infektion der Epidermis von Zwiebelschalen mit *M. oryzae*

Eine hier etablierte Methode, typische Blattinfektionsstrukturen von *M. oryzae* zu erhalten, ist die Infektion von Zwiebelschalen (*Allium cepa*). Wird auf die hydrophobe Seite einer Zwiebelschalenepidermis (ZSE) eine Sporensuspension gegeben, so erfolgt eine Infektion der Epidermiszellen, die der Infektion in Reisblättern exakt gleicht. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer Infektion in Reis ist die einfache und schnelle Handhabung sowie das konstant gute Ergebnis der Infektion.

Präparation der ZSE: Die Zwiebel wird zuerst halbiert und anschließend Spalten der gewünschten Breite (ca. 2 cm) von ihr abgeschnitten, die sich zum Zentrum hin verjüngen (wie Tortenstücke). Die einzelnen Schichten dieser Zwiebspalten können abgetrennt werden und jeweils an der Innenseite die ZSE mit einer Pinzette abgezogen werden.

In dem Standardprotokoll des Instituts werden die ZSE für 10 min. in Chloroform gegeben, 4-mal mit dH₂O gewaschen und schließlich in dH₂O wieder entfaltet. Dabei drehen

sich die ZSE mit der hydrophoben Seite nach oben und schwimmen auf der Wasseroberfläche. Sie werden in die benötigte Größe geschnitten und auf einen Objektträger gegeben. Diese werden in einer Feuchtekammer inokuliert und inkubiert.

In dieser Arbeit wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, bei dem der Chloroformschritt entfiel. Die ZSE wurden direkt in Wasser gegeben, geschnitten und auf Objektträger gezogen. Danach kamen sie, wie in dem Originalprotokoll, in die Feuchtekammer (Abbildung 4.2). Die Feuchtekammer besteht aus einer verschließbaren Plastikdose (siehe Abbildung 4.2), in der ein doppelter Boden eingelegt werden kann. Zuerst wird etwas Wasser in die Schüssel gegeben, dann der ebenfalls aus Plastik bestehende Einsatz hineingesetzt. Auf diesen gelochten Boden werden die Objektträger mit den Zwiebelschalen gelegt. Wird der Deckel geschlossen, kann so die für eine erfolgreiche Infektion notwendige hohe Luftfeuchtigkeit erhalten bleiben.

Die Zwiebelschalen wurden mit einer *M. oryzae* Konidiensuspension inokuliert. Diese Sporensuspension wurde wie in 3.1.1 beschrieben hergestellt. Als Konzentration wurden ungefähr 1×10^4 Sporen/ml gewählt. Von dieser Suspension wurde auf jede ZSE ein Tropfen von 100 μl gegeben, so dass im Endeffekt auf jede Zwiebelschale 1000 Sporen kommen. Da es sich dabei um die hydrophobe Oberfläche der Epidermis handelt, bleibt dieser Tropfen in sehr kompakter Form erhalten und zerfließt bei vorsichtiger Handhabung der Feuchtekammer nicht.

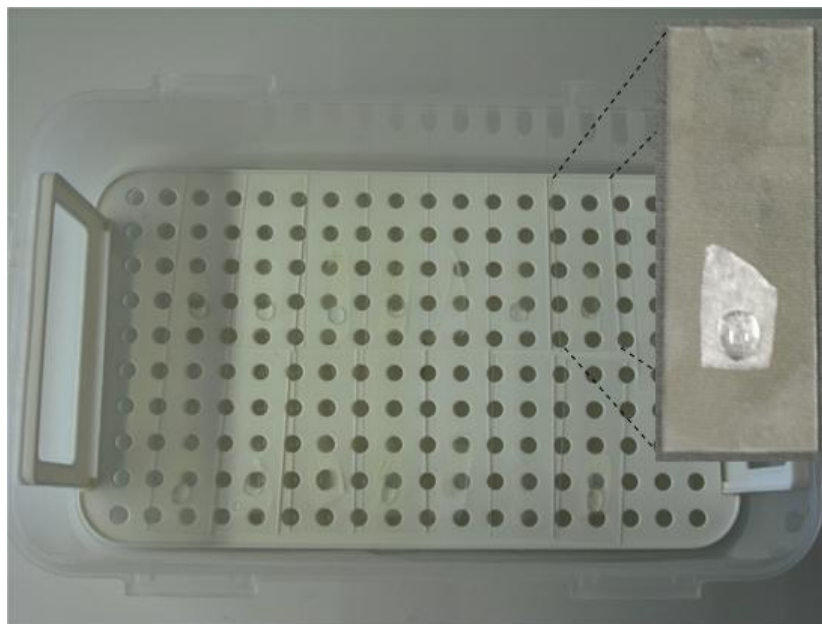


Abb. 4.2: Feuchtekammer, darin liegen Objektträger mit infizierter Zwiebelschaleneperidermis

Die Zwiebelschalen wurden bei 28 °C inkubiert. Die Dauer der Inkubation richtete sich nach der gewünschten Infektionsphase.

4.2.3 Test auf Appressorienbildung

Zum Testen der Knockout- Stämme auf die Fähigkeit Appressorien auszubilden wurden, wie oben beschrieben, Zwiebelchaleneperidermistests durchgeführt. Es wurden pro Stamm drei unabhängige Zwiebelhäutchen inokuliert. Die Zwiebelhäutchen wurden nach 24 Stunden Inkubation bei 28°C mikroskopiert und jeweils 100 Sporen, sowie die Anzahl der von diesen Sporen gebildeten Appressorien gezählt.

4.3 Transformation von *M. truncatula* mit *A. rhizogenes*- hairy root-Produktion

Bei *Agrobacterium rhizogenes* handelt es sich um ein gram negatives Bodenbakterium, das dazu in der Lage ist, Pflanzen durch Wunden zu infizieren. Dabei dienen von der Wunde abgesonderte Stoffe, wie zum Beispiel Acetosyringon, als Lockstoffe. Genau wie *Agrobacterium tumefaciens* ist auch *A. rhizogenes* dazu in der Lage, eigene DNA in die Pflanzenzellen zu schleusen und diese dort exprimieren zu lassen. Diese DNA liegt in den Bakterien auf einem Plasmid, dem Ti- Plasmid (beziehungsweise Ri- Plasmid in *A. rhizogenes*). Von diesem Plasmid wird aber nur die so genannte T- DNA in die Pflanze transportiert. Die originale T- DNA enthält Gene für eine Tumorinduktion durch Auxinproduktion und für die Opinsynthese bei *A. tumefaciens*. Bei *A. rhizogenes* enthält sie Gene für die Wurzelinduktion durch verstärkte Auxinsensitivität sowie für die Synthese von Opinen (Gelvin, 2009). Diese Opine werden dann von der Pflanze produziert und dienen den Bakterien als Nahrungsquelle. Der von *A. tumefaciens* produzierte unorganisiert wachsende Tumor wird als Wurzelhalsgalle bezeichnet, während *A. rhizogenes* „hairy roots“, eine Überproduktion von Adventivwurzeln, produziert.

Da die Bakterien immer den Bereich der T-DNA in die Pflanze transferieren, egal welcher Art die darin enthaltenen Gene sind, werden diese Organismen sehr erfolgreich zur Transformation von Pflanzen und auch Pilzen eingesetzt.

4.3.1 Sterilisieren von *M. truncatula* Samen

Zur Sterilisierung von *M. truncatula* Samen werden diese in konzentrierter Schwefelsäure inkubiert. Nach einiger Zeit bilden sich auf der Oberfläche der Samen schwarze Punkte. Sind auf den Samen im Durchschnitt fünf Punkte pro Samen (ca. 15- 30 min) zu sehen, wird die Inkubation der Samen durch Abnehmen der Säure und dreimaliges Waschen der Samen abgebrochen. Die Samen kommen auf Wasseragarplatten und werden für eine Nacht in 4°C inkubiert. Zur Keimung werden sie 16- 20 Stunden in 28°C bei Dunkelheit inkubiert.

4.3.2 Transformation von *M. truncatula* Keimlingen

Zur Transformation von *M. truncatula* wurde folgendes Protokoll angewendet: Die sterilen Keimlinge wurden nach der Keimung (16- 20 Stunden bei 28°C in Dunkelheit) von der Wasseragarplatte genommen und ihre Wurzeln mit einem sterilen Skalpell ca. 3 mm hinter der Spitze gekappt. Agrobakterien wurden frisch auf einer LB- Agarplatte mit 600 µg/ml Streptomycin und 100 µg/ml Spectinomycin ausplattiert und bei 28°C inkubiert. Nach 1-2 Tagen, je nach dem wie gut die Bakterien wuchsen, wurden sie für die Infektion verwendet. Die verletzten Reiswurzeln wurden über die *A. rhizogenes* Kolonien gestrichen, so dass diese auf die Schnittstelle gelangten. Anschließend wurden immer 5 Keimlinge, wie in 4.1.1 beschrieben, auf eine Fahraeus- Schrägagarplatte gesetzt.

Die infizierten Pflanzen wurden für eine Woche bei 20°C aufrecht stehend gelagert. Danach kamen sie bei 25°C in den Pflanzenwachstumsschrank. In regelmäßigen Abständen wurden die Wurzeln unter dem Fluoreszenzbinokular auf eine dsRed- Fluoreszenz hin überprüft.

Fluoreszierende Wurzeln wurden mit einem sterilen Skalpell geschnitten und auf M-Medium mit 10 g/l Saccharose und 400 mg/l Augmentin übertragen, um die Agrobakterien abzutöten. Diese Konzentration wurde schrittweise auf 200 mg/l und 100 mg/l reduziert werden.

4.4 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern mit *A. tumefaciens*

Für die Transformation von *N. benthamiana* Blättern mit *A. tumefaciens* wird ein Protokoll von Voinnet et al. (2003) angewendet. Die transformierten Agrobakterien werden auf einer LB- Platte mit 40 µg/ml Gentamycin und dem entsprechenden Selektionsantibiotikums des Plasmids ausgestrichen. Nach 2 Tagen bei 28°C werden von dieser Platte 5 ml LB- Flüssigmedium mit denselben Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Flüssigkultur werden am nächsten Morgen 1 ml entnommen, um 4 ml LB-Flüssigmedium (s.o.) neu zu inokkulieren. Diese werden anschließend 4 Stunden bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wird eine 1:10 Verdünnung in AS-Medium hergestellt und die OD₆₀₀ gemessen. Die Originalkultur wird anschließend auf eine OD von 0,7- 0,8 mit AS- Medium verdünnt. Es wird eine 1:1 Mischung aus Bakterien mit dem transformierten Plasmid, sowie aus dem, auf gleiche Weise vorbehandelten Stamm, K5A018 hergestellt. Dieser K5A018 exprimiert das p19 Protein, welches zur Unterdrückung von wirtsinduziertem Gensilencing dient. Diese Mischung wird anschließend für 2-4 Stunden auf Eis inkubiert und anschließend mit Hilfe einer Spritze ohne Nadel an der Unterseite der Tabakblätter in die Interzellularräume des Blattes injiziert. Dazu wird an der Oberseite des Blattes mit einem Finger ein

leichter Gegendruck erzeugt, so dass die Öffnung der Spritze auf der Blattunterfläche fest aufliegt, und die Suspension dann vorsichtig in das Blatt gedrückt wird. Die Blätter wurden nach 3 und 5 Tagen mikroskopisch untersucht. Für die Injektion werden 4- 6 Wochen alte Pflanzen von *N. benthamiana* verwendet.



Abb. 4.3: Inokulation von *N. benthamiana* Blättern. Die *A. tumefaciens* Suspension wurde mit Hilfe einer Spritze ohne Kanüle an der Unterseite der Blätter durch die Stomata in den Interzellularraum injiziert.

4.5 Molekularbiologische Methoden

4.5.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Für die Transformation von *E. coli* werden entweder erworbene chemisch kompetente *E. coli* nach Protokoll verwendet, oder selbst chemisch kompetent gemachte Zellen benutzt. Zur Selbstherstellung von kompetenten Zellen wird ein CaCl_2 basiertes Protokoll verwendet. 100 ml LB- Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum werden mit einer Kolonie von einer frisch ausgestrichenen Platte angeimpft. Dies wird über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen werden 500 ml LB- Flüssigmedium mit der Übernachtskultur auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft und bei $20-25^\circ\text{C}$ und 180 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis werden die Zellen 20 Minuten bei 3200 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 100 ml eiskaltem TB- Puffer resuspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis (10 min.) werden die Zellen bei 4°C 10 Minuten mit 3200 g zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml TB- Puffer + 7% DMSO aufgenommen, die Zellsuspension zu $100\mu\text{l}$ aliquotiert und diese Aliquote sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Transformation werden zu $100\mu\text{l}$ auf Eis aufgetauten *E. coli* die gewünschte Menge an Plasmid gegeben. Nach 30 Minuten auf Eis erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C von 30 Sekunden bis 1 Minute. Die Zellen kommen sofort auf Eis und es werden $500\mu\text{l}$

SOC- Medium zugegeben. Anschließend werden die Zellen für 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert, danach kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Davon werden 50 µl auf eine LB- Agarplatte mit dem Selektionsantibiotikum des transformierten Plasmids gegeben.

4.5.2 Herstellung und Transformation von elektrokompetenten Agrobakterien

Zur Herstellung von elektrokompetenten Agrobakterien werden zuerst 3 ml LB- Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie der Agrobakterien angeimpft. Dies wird über Nacht bei 28°C und Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen werden 2 ml der Kultur zu 500 ml LB- Flüssigmedium mit Antibiotikum gegeben und bei 28 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5- 0,6 inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis werden die Zellen bei 4°C mit 5000 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird zuerst in 500 ml bidest. H₂O resuspendiert, woraufhin der obige Zentrifugationsschritt wiederholt wird. Nun wird das Pellet in 10 ml 10% Glycerin resuspendiert, um anschließend erneut wie oben abzentrifugiert zu werden. Zum Schluss wird das Pellet in 3 ml 10% Glycerin resuspendiert und dann in 50 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zur Transformation wird die gewünschte Menge an Plasmid mit auf Eis aufgetauten Agrobakterien vermischt und diese in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Diese wird in den Elektroporator gegeben (bei 200 Ω, 25µF für 5 msec eine Spannung von 2 kV angelegt) und direkt nach der Auslösung des Pulses 500 µl SOC- Medium dazugegeben. Die Zellen werden für 2 Stunden bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Von dieser Kultur werden schließlich 50 µl auf eine LB- Platte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

4.5.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation wurde eine Kolonie einer frischen Platte in 50 ml YPDA- Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Mit dieser Kultur wurden am nächsten Morgen 300 ml YPDA- Medium bis zu einer OD₆₀₀ 0,2- 0,3 angeimpft. Anschließend wurde die Kultur bei 30°C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ 0,4- 0,6 wachsen gelassen, danach die Zellen abzentrifugiert (1000g, 5 min.) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in 1x TE- Puffer resuspendiert, woraufhin die Zellen wieder wie oben abzentrifugiert wurden und der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde anschließend in 1xTE/1xLiAc resuspendiert. Zur Vorbereitung der Plasmid- DNA wurde eine Hering Test Carrier DNA (2 mg/ml) 20 Minuten lang aufgeköcht und 50 µl davon zu der entsprechenden Menge an Plasmid (gewünscht sind 1 µg Plasmid) gegeben (in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß). Für Co- Transformationen zweier Plasmide wurden 1 µg je Plasmid eingesetzt. Zu diesem Transformationsansatz wurden 100 µl Hefen gegeben, kurz gevortext und anschließend 600 µl PEG/ LiAc Lösung zu-

gegeben. Diese Lösung wurde nach nochmaligem Vortexen bei 30 °C und 220 rpm für 30 Minuten inkubiert und anschließend 70 µl DMSO zugefügt. Nun erfolgte ein 15 minütiger Hitzeschock bei 42°C, wonach die Zellen nach 2 minütiger Inkubation auf Eis für 5 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen werden in 500 µl TE resuspendiert. Von diesen wurden je 100 µl unverdünnt, 1/10, 1/100, und 1/1000 verdünnt auf SD- Medium ohne die entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert. Die Platten wurden bei 30 °C mehrere Tage inkubiert bis Kolonien gewachsen sind.

4.5.4 Plasmid isolation aus *E. coli*- Minipräp

Für die Plasmid isolation aus *E. coli* wurde ein Verfahren, basierend auf der alkalischen Lyse von Zellen, angewendet. *E. coli* Kolonien wurden in 3 ml LB- Medium mit entsprechenden Antibiotika angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Bei der Verwendung von Mach1 Zellen (Invitrogen) für die Klonierungen verringerte sich dieser Inkubationsschritt auf ca. 6 Stunden, die restlichen Schritte waren jedoch identisch. Am nächsten Morgen wurden 2 ml dieser Kultur in einem 2 ml Eppi abzentrifugiert (5 Minuten, 13000 rpm). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben (alkalische Lyse) und nach mehrmaligem Invertieren mit 200 µl Lösung III neutralisiert. Im Anschluss wurden in einem 20- minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm die Zelltrümmer aus der Lösung pelletiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt und hier 500 µl 100% Isopropanol zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurde die Lösung 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und nach 5 Minuten Zentrifugation bei 13000 rpm der Überstand entfernt und das Pellet getrocknet. Zur Lösung der Plasmid- DNA wurden 50 µl TE- Puffer zugegeben und das Pellet für 2 Minuten bei 68°C gelöst.

4.5.5 Klonierung von PCR- Produkten in pCR2.1- TOPO

Die Klonierung in den Topovektor erfolgte nach Herstellerangaben (TOPO T/A Cloning Kit), allerdings nur mit 0,5 µl Topovektor pro Reaktion. Die Inkubationszeit betrug 25 Minuten. Sollte ein PCR- Produkt ohne 3'A- Überhänge (z.B. durch Phusion- Polymerase erzeugt) kloniert werden, so wurden direkt im Anschluß an die eigentliche PCR in einem zusätzlichen Schritt für 10 Minuten bei 72°C 0,5 µl Taq- Polymerase zugegeben um diese A- Überhänge zu ergänzen.

4.5.6 Klonierung in pENTR/D-TOPO

Die Klonierung wurde gemäß den Herstellervorgaben durchgeführt, allerdings nur mit 0,5 µl pENTR Vektor. Die Inkubationszeit betrug 25 Minuten.

4.5.7 Ligation von DNA- Fragmenten mittels T4- Ligase

Standardligationen wurden in einem Volumen von 10 µl angesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde mit 3:1 gewählt. Zu 50 oder 100 ng Vektor wurden entsprechende Mengen Insert, berechnet nach der Gleichung

$$[(\text{ng Vektor} * \text{kB Insert}) / \text{kB Vektor}] * 1/3 (\text{molares Verhältnis Insert zu Vektor}) = \text{ng Insert}$$

zugegeben. Dazu kamen je 10 µl Ansatzgröße 1 µl T4- Ligase-Puffer der benötigten Menge dH₂O (je nach Volumen von Vektor bzw. Insert) und 1 µl T4- Ligase. Die Reaktion erfolgte bei 16°C über Nacht.

4.5.8 Gateway- Klonierungen

Klonierungen mit Hilfe des Gateway L/R Clonase II Enzym Mix wurden nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

4.5.9 Fällung von DNA

Zur Fällung von DNA wurden der DNA- Lösung das 3fache Volumen an 100% Ethanol sowie 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat (pH 4,8) zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren wurde die Lösung bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die gefällte DNA bei 13000 rpm für 15 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 500µl 70 % Ethanol gewaschen und anschließend 5 Minuten bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet getrocknet. Zum Lösen des Pellet werden je nach Verwendung entweder TE- Puffer oder dH₂O zugegeben und 2 Minuten bei 68°C inkubiert.

4.5.10 Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau werden je nach dem Verwendungszweck unterschiedliche Volumina und DNA- Konzentrationen eingesetzt. Insgesamt gilt: Je 10 µl Verdauansatz werden 1 µl des passenden 10x Puffers verwendet. Je nach Menge der eingesetzten DNA und der Verdaugeschwindigkeit (units/ml) eines Enzyms berechnet sich die Menge an zugesetztem Enzym. Schließlich muss anhand der benötigten Volumina das Volumen an dH₂O berechnet werden, welches zum Auffüllen des Ansatzes benötigt wird. Ist der Ansatz fertig, wird er bei der für das benutzte Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Die Inkubationszeit richtet sich ebenfalls nach Verwendungszweck und Enzym, ein Standardverdau erfolgte jedoch für 1 Stunde.

4.5.11 Extraktion von RNA

Eine RNA- Extraktion erfolgte mit dem innuPrep Plant RNA Kit. Der erste Schritt der RNA- Extraktion war der Zellaufschluss. Dieser erfolgte unter flüssigem Stickstoff in

einem vorgekühlten Mörser. Die pflanzlichen Materialien wurden intensiv mit dem Pistill zerrieben, bis sie nur noch ein feines Pulver waren, das keine groben Bestandteile mehr enthielt. Dabei war von entscheidender Bedeutung, dass das Material niemals auftaut. So sollte verhindert werden, dass die RNA durch frei gewordene RNAsen degradiert wurde. Das Pulver wurde anschließend in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und, solange die restlichen Proben gemörsert wurden, in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Aluminiumblock gelagert. Waren alle Proben derartig vorbereitet, wurde die Extraktion nach dem Protokoll der Herstellerfirma durchgeführt. Die RNA wurde schließlich in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und es wurden 0,3 µl RNase OUT zugegeben. Zur Kontrolle der RNA- Qualität wurde ein 2 µl Aliquot zur Konzentrationsbestimmung an einem NanoDrop-Photometer, sowie entweder 5 µl für eine Gelelektrophorese oder 1,8 µl für eine Bioanalyser- Analyse abgenommen. Mit Hilfe des NanoDrop- Photometers konnte die Konzentration der RNA bestimmt werden, allerdings gab dies keinen Aufschluss darüber, ob die RNA intakt war oder abgebaut.

Ein intaktes RNA- Extrakt muss bei einer Gelelektrophorese zwei klare Banden ergeben. Die erste Bande besteht aus der 28S rRNA, während die zweite aus der 18S rRNA besteht. Das Intensitätsverhältnis zwischen den beiden Banden sollte ungefähr 2: 1 betragen. War die 18S rRNA- Bande wesentlich intensiver oder gar keine Bande erkennbar, war die RNA degradiert.

Die RNA wurde sofort anschließend an die Extraktion bei -80 °C eingefroren, um ein Degradieren zu verhindern

4.5.12 cDNA- Synthese

Bei cDNA handelt es sich um DNA, die durch reverse Transkriptase aus RNA synthetisiert wurde. Durch den Einsatz von oligo- dTPrimern wird speziell nur die mRNA, die einen Poly- A Schwanz enthält, in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe dieser Methode können also die in einem bestimmten Stadium exprimierten Gene untersucht werden.

Für die cDNA Synthese wurde wie in 4.5.11 beschrieben extrahierte RNA eingesetzt. Die benötigte Menge an RNA betrug 1 µg RNA in 8 µl Volumen, was einer Mindestkonzentration von 125 ng/µl entspricht. War die Konzentration des RNA- Extraktes höher, so wurde entsprechend weniger davon verwendet und mit DEPC- Wasser auf 8µl aufgefüllt. Zu jedem RNA- Ansatz wurde jeweils 1 µl 10x DNase I Puffer und DNase I gegeben. Anschließend wurde die RNA 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eventuelle Verunreinigungen durch genomische DNA zu verdauen. Um zu kontrollieren, dass wirklich keine genomische DNA die RNA verunreinigte, wurde eine Test-PCR mit einem Primer eines Haushaltsgens (Aktin) durchgeführt. In dieser Zeit wurde die RNA bei -80°C aufbewahrt.

War die PCR negativ, also keine genomische DNA darin, dann wurde mit der restlichen RNA wie folgt weiter verfahren. Es wurde pro Ansatz 1 µl 25 mM EDTA zugegeben und für 10 Minuten auf 65°C erhitzt um die DNase zu inaktivieren. Anschließend kamen jeweils 1 µl oligo dT- Primer und 10 mM dNTP's dazu. Es wurde für 5 Minuten wieder auf 65°C erhitzt und die Reaktionsgefäße anschließend für mindestens eine Minute auf Eis gestellt. Anschließend kamen 4 µl 5x First Strand Puffer, 1 µl DTT, 1 µl RNase OUT, und 1 µl Superskript II reverse Transkriptase hinzu. Diese Lösung wurde für 1 Stunde bei 42°C inkubiert und dann 10 Minuten auf 70°C erwärmt. Um zu testen, ob die Synthese der cDNA funktioniert hatte, wurde wieder eine Test- PCR mit dem Aktin-Primer durchgeführt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.5.13 Extraktion von genomischer DNA aus *Magnaporthe oryzae*

Für die Extraktion von genomischer DNA aus *M. oryzae* musste zuerst eine Flüssigkultur in flüssigem Komplettmedium (CM) angelegt werden. In eine Petrischale wurden ca. 15 ml CM- Medium gegeben. Von einer *M. oryzae* Kolonie wurde mit einer Impföse etwas Mycel abgekratzt und dem Flüssigmedium hinzugefügt. Diese Kultur wurde ca. 2 Tage bei 28°C ohne zu schütteln inkubiert. Waren aus den ursprünglichen Mycelstücken kleine Kolonien angewachsen, wurden diese weiterverarbeitet. Das Flüssigmedium wurde abfiltriert und so das Mycel gewonnen. Dieses wurde auf Küchenpapier kurz abgetrocknet und anschließend unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Dabei wurde ein mit flüssigem Stickstoff vorgekühlter Mörser benutzt und das gefrorene Mycel darin zu einem feinen Pulver zerrieben. Dieses Mycel wurde in einem 2 ml Eppendorf- Cup mit 750 µl Extraktionspuffer versetzt und 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 375 µl 5 M Kaliumacetat dazugegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf- Cup gegeben. Zu dem Überstand wurden 800 µl Isopropanol hinzugefügt und er wurde bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm wurde der Überstand entfernt und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem 3- minütigem Zentrifugieren wurde das Pellet an der Luft getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50 µl 1x TE-Puffer resuspendiert und die Lösung eine Stunde bei 37°C mit 1 µl DNase freier RNase verdaut. Zur Kontrolle der Extraktion wurden 5 µl des Extraktes in ein 1% Agarosegel geladen.

Die DNA- Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

4.5.14 PCR- Polymerase Chain Reaction

Die PCR ist inzwischen eine Standardmethode der modernen Molekularbiologie, mit der DNA in vitro vervielfältigt werden kann. Eine PCR verläuft in 3 Schritten:

1. Aufschmelzen der DNA- Doppelstränge

In diesem Schritt werden mit großer Hitze die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Basenpaaren der beiden Teilstränge gelöst. Dies ist die Voraussetzung, damit anschließend die Primer an die Einzelstränge binden können und der Vervielfältigungsprozess beginnen kann.

2. Annealing

In diesem Schritt binden die Primer an die nun einzelsträngige DNA. Als Annealingtemperatur wird eine Temperatur gewählt, die ungefähr im Bereich der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer liegt. So soll verhindert werden, dass die Primer unspezifisch an andere Sequenzen binden, was bei zu niedrigen Temperaturen der Fall wäre. Wird die Temperatur allerdings zu hoch gewählt, dann können die Primer auch an ihrer spezifischen Bindestelle nicht mehr binden. Die Schmelztemperatur der Primer hängt von ihrer Länge, also der Anzahl an Basen, sowie von ihrem GC-Gehalt ab. Diese Faktoren sind deshalb bei dem Design der Primer zu berücksichtigen.

3. Elongation

In diesem Schritt bindet die eingesetzte DNA- Polymerase (z.B. die Taq- Polymerase) und synthetisiert im Anschluss an die Primer einen komplementären DNA-Strang. Die Länge dieses Schrittes hängt von der zu erwartenden Länge des Amplikons sowie von der verwendeten Polymerase ab. Die Taq- Polymerase ist etwa in der Lage, ein 1 Kilobasenpaare (kB) langes Stück in ca. einer Minute zu amplifizieren, wohingegen die Phusion- Polymerase für das gleiche Stück nur ungefähr 30 Sekunden braucht.

Eine Standardreaktion mit Taq- Polymerase folgte diesem Schema:

- 1) 95°C für 3 Minuten
- 2) 95°C für 30 Sekunden
- 3) T_m der Primer für 30 Sekunden
- 4) 72°C für 1Minute pro kB des PCR- Produktes
- 5) 72°C für 10 Minuten

Die Schritte 2-4 werden jeweils in mehreren Zyklen wiederholt, wobei in dieser Arbeit in der Regel 30 bzw. 35 Zyklen gefahren wurden.

4.5.15 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um eine einfache Methode, um ein Gemisch von verschieden langer DNA oder RNA der Länge nach zu sortieren. Dies erfolgt mit

Hilfe eines angelegten elektrischen Stroms, der die negativ geladenen Nukleinsäuren zu der positiven Kathode hin zieht. Dabei müssen sie durch ein Agarosegel wandern, in dessen Gitterstruktur die langen Moleküle langsamer vorankommen als die kleinen. So sammeln sich Stränge gleicher Länge in Banden innerhalb des Gels. Diese Banden können durch ein Inkubieren des Gels in einer Ethidiumbromidlösung sichtbar gemacht werden. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen Basen der Nukleinsäuren und kann dann durch Anregung mit UV- Licht sichtbar gemacht werden (Fluoreszenz).

Je nach der Länge der aufgetragenen Nukleinsäurenfragmente wird die Agarose verschieden stark konzentriert. Als Faustregel gilt dabei, je kürzer das Fragment, desto höher die Agarosekonzentration. In dieser Arbeit wurde DNA je nach der Größe in 1% Agarosegelen (z.B. genomische DNA, lange PCR- Fragmente), 1 -2% Agarose (kurze PCR- Fragmente, Restriktionsverdauung) und RNA in 1,2% Agarosegelen (in Anlehnung an Protokolle für denaturierende RNA- Gele) aufgetrennt. Gele für Southern Blots wurden generell mit einer Konzentration von 0,8 % Agarose hergestellt. Als Spannung wurden für DNA 135V und für RNA sowie Southern Blots 110V angelegt. Zum Herstellen der Agarosegele wie auch als Puffer für die Elektrophoresekammern wurde 0,5 facher TAE- Puffer verwendet.

Als DNA- Leiter zum Ermitteln der Produktlänge von DNA- Banden wurde jeweils die 2 Log DNA- Ladder von New England Biolabs verwendet.

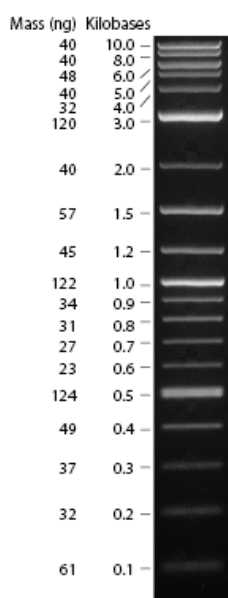


Abb. 4.4: Die in dieser Arbeit benutzte DNA-
Leiter 2 Log DNA- Ladder.

4.5.16 Herstellen der Knockout- Konstrukte zur Transformation von *M. oryzae*

Für die Herstellung der Knockout- Konstrukte wurden jeweils 2,5 kB Sequenzen upstream und downstream des zu deletierenden Gens verwendet. Diese Sequenzen wurden aus der Datenbank des Broadinstitutes entnommen. Mit Hilfe dieser Sequenzen wurden Primer zur Amplifikation einer upstream und einer downstream Flanke generiert. An das 3`Ende der upstream sowie an das 5`Ende der downstream Flanke wurden mit den Primern SfiI- Schnittstellen angehängt, um die Flanke im Anschluss an die Selektionsmarker-kassetten ligieren zu können. In zwei Fällen war dies nicht möglich, da sich eine SfiI- Schnittstelle innerhalb der Flanken befand. In diesem Fall wurden an die upstream 3`Flanke eine PacI- Schnittstelle und an die downstream 5`Flanke eine AscI- Schnittstelle angehängt. Da es sich bei einigen Flanken sehr schwierig gestaltete sie zu amplifizieren, wurden in diesen Fällen die äußeren Primer in 500 Bp Schritten so lange nach innen verschoben, bis die PCR gelang.

Die einzelnen Flanken wurden jeweils in den TOPO- Vektor kloniert. Zum Zusammenstellen des gesamten Konstruktes wurden die upstream Flanke mit KpnI und SfiI/ PacI und die downstream Flanke mit SfiI/AscI und NotI ausgeschnitten. Gleichzeitig wurde ein TOPO- Vektor mit KpnI und NotI verdaut. Die verdauten Ansätze wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden der richtigen Größe ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des Zymoclean DNA- Extraktionskits aus dem Gel extrahiert. Diese einzelnen Fragmente wurden im Anschluss in einem Ligationsschritt, zusammen mit der Resistenzmarker-kassette (die ebenfalls upstream und downstream die korrespondierenden SfiI- bzw. PacI/AscI- Schnittstellen besaß) ligiert. Die Ligation wurde am nächsten Tag in *E. coli* transformiert und dann aus gewachsenen Kolonien das enthaltene Plasmid isoliert und durch Restriktionsverdau überprüft. Vollständige Konstrukte wurden durch PCR amplifiziert und für Protoplastentransformationen eingesetzt.

Struktur der fertig gestellten Konstrukte: alle für die Transformation verwendeten Konstrukte enthielten eine Hygromycinresistenz- Kassette (aus dem Plasmid pfV8, Villalba et al., 2008). Der Umfang der daran ligierten endgültigen Flanken beträgt:

MGG 08230: upstream: 2,5 kB; downstream: 1,6 kB

MGG 05504: upstream: 1,9 kB; downstream: 2,5 kB

MGG 10244: upstream: 2,5 kB; downstream: 2 kB

MGG 14156: upstream: 2,5 kB; downstream: 2 kB

4.5.17 Transformation von *M. oryzae* Protoplasten

Die Transformation von *M. oryzae* Protoplasten wurde nach einem Protokoll abgeleitet von Villalba et al. (2008) durchgeführt.

Herstellen der Protoplasten

Um die Protoplasten herzustellen, wird eine Flüssigkultur in 100 ml CM- Medium hergestellt. Dazu wird mit einer Impföse Mycel einer Kolonie abgenommen und damit das Medium angeimpft. Diese Kultur wird für 48 h unter leichtem Schütteln bei ca. 26°C inkubiert. Die gewachsenen Mycelkugeln werden steril entnommen, mit einem Skalpell in kleine Stücke zerteilt und mit diesen erneut 50 ml CM- Flüssigmedium inokuliert. Diese Kultur anschließend für 16 h bei 26 °C und ca. 100 rpm inkubieren. Nach 16 h wird das Mycel mittels steriler Filtration durch Miracloth in einem Porzellantrichter gesammelt, mit 200 ml Waschlösung gewaschen und mit einem sterilen Spatel 0,5 g Mycel in ein 50 ml Falcon gegeben. Dazu werden 10 ml steriles osmotisches Medium mit Glucanex hinzugefügt. Es werden 4 Ansätze vorbereitet, die anschließend für 3 h bei 26 °C und 110 rpm inkubiert werden. In dieser Zeit werden durch das Glucanex die Zellwände verdaut und die Protoplasten gebildet. Sind bei einer mikroskopischen Kontrolle genügend Protoplasten zu erkennen, werden diese durch sterile Filtration durch Miracloth von dem restlichen Mycel getrennt und in neuen 50 ml Falcon gesammelt. Die Protoplasten werden bei 3500 rpm für 10 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 20 ml kaltem STC vorsichtig resuspendiert. Die Lösung wird nun für eine Minute bei 1000 rpm zentrifugiert und dann der Überstand von 2 Falcons in einem neuen gesammelt. In diesem Schritt sollen noch vorhandene Mycelreste entfernt werden. Der Überstand wird erneut zentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4 °C), der Überstand vorsichtig abgekippt und das Pellet anschließend vorsichtig in 2,5 ml kaltem STC gelöst. Die Lösungen werden kombiniert, in einer Zählkammer wird die Anzahl an Protoplasten bestimmt und diese auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^7$ Protoplasten / ml eingestellt. Diese wurden entweder direkt für eine Transformation verwendet oder in 600 ml Aliquots bei – 80°C gelagert.

Transformation der Protoplasten

200 µl der hergestellten Protoplastenlösung wurden auf Eis aufgetaut. Zur Transformation wurden ca. 3 µg DNA eingesetzt. Das entsprechende Volumen wurde mit sterilem dH₂O auf 20 µl aufgefüllt und dann 20 µl STC zugegeben. Zu dieser, in einem 15 ml Falcon vorbereiteten DNA, wurden die frischen oder aufgetauten Protoplasten gegeben, vorsichtig durchmischt und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 1 ml einer 60 %igen PEG- 4000 Lösung in 0,6 M Sorbitol und 10 mM MOPS hinzu gegeben. Durch leichtes Rollen wurde es durchmischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 3 ml TB3 Flüssigmedium zugegeben. Nun wurden die Transformationen je nach der verwendeten Resistenzmarkerkassette unterschiedlich weiter behandelt. War die eingesetzte Resistenzkassette eine Hygromycinresistenz, so wurden nach 2 h Inkubation mit langsamer Bewegung auf einem Tumbler bei Raumtemperatur die Protoplasten bei 3500 rpm 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen (nicht komplett um das Pellet nicht zu verlie-

ren) und dann die Flüssigkeit mit TB3 flüssig auf 1 ml aufgefüllt. Zu je 4-5 ml 47°C warmem TB3- TOP- Agar werden 330 µl der Protoplasten gegeben und nach kurzem Invertieren sofort auf vorbereitete vorgewärmte Selektionsplatten gegossen. Diese wurden für 5-7 Tage bei 28°C inkubiert, gewachsene Kolonien gepickt und erneut auf Selektionsmedium und CM- Agar inokuliert und die Kolonien anschließend für weitere Untersuchungen verwendet.

Im Unterschied zu dem oben beschriebenen Verfahren, wurden die Protoplasten bei einer Transformation mit einem die BASTA- Resistenzkassette enthaltenden Konstrukt nicht nur 2 h sondern 16 h auf einem Tumbler inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde wie oben weiter verfahren, allerdings wurden die Protoplasten auf SW- Basta Selektionsplatten gegossen.

Verwendete Medien und Lösungen:

Waschlösung: 0,6 M KCL- Lösung, autoklavieren mit sterilem Na- Puffer (5 ml/500ml) versetzen. Na- Puffer: 8ml 1M Na₂HPO₄ + 92 ml 1M NaH₂PO₄ , pH bei 5,8.

Osmotisches Medium mit Glucanex: 10 ml KCl- Na- Puffer mit 0,5 g Glucanex, pH mit 20% KOH auf 6 einstellen, steril filtrieren.

STC : 200g/l Saccharose, 50 mM Tris- HCl pH 7,5, 50 mM CaCl₂ *2 H₂O

TB3: 200g/l Saccharose, 3 g/l Hefeextrakt, für Top- Agar + 5 g/l Difco Agar

Hygromycineselektionsmedium: 200g Saccharose, 1g NH₄NO₃, 2g Hefeextrakt, 20 ml (KH₂PO₄ 10 g/500 ml, pH5 mit 10M NaOH), 10 ml (MgSO₄* 7H₂O 5 g/100 ml), 10 ml (CaCl₂*2H₂O 1 g/100 ml), 1ml (FeSO₄*7H₂O 0,4 g/500 ml), 1ml (ZnSO₄*7H₂O 7,9 g, CuSO₄* 5H₂O 0,6 g, H₃BO₃ 0,1 g, MnSO₄*H₂O 0,2 g, NaMo₄* 2H₂O 0,14 g für 1 l), 15 g/l Agar, auf 1 l auffüllen, pH mit Na₂HPO₄ auf 5,5- 5,8 einstellen, autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 240 µg/ml Hygromycin zugeben und Platten gießen.

BASTA- Selektionsmedium: 1,6 g Hefeminimalmedium ohne Aminosäuren, 2 g Asparagin, 1 g NH₄NO₃, 10 g Glukose auf 1 l auffüllen, pH 6, 15 g/l Agar, autoklavieren. Nach dem Autoklavieren 40 µg/ml Glufosinolat (BASTA) zugeben und Platten gießen.

4.5.18 Southern Blot

Verdau und Gelelektrophorese

In Restriktionsverdauen für Southern Blot wurden 50 µg gDNA in 50 µl Volumen eingesetzt. Die Verdauungen wurden über Nacht durchgeführt. Am nächsten Morgen wurden zuerst 5 ml des Verdauens in ein 1% Testgel geladen, und sofern die DNA gut verdaut war, der Rest des Ansatzes in ein 0,8% Gel, das bei 110 V für ca. 90 Minuten lief geladen. Das Gel wurde im Ethidiumbromid- Bad gefärbt, die Markerbanden markiert und anschließend für 30 Minuten denaturiert. Danach wurde es für 45 Minuten in Neutrali-

sierungslösung ebenfalls unter Schütteln inkubiert und schließlich zwei Mal für 5 Minuten in 2x SSC gewaschen.

Blotten :

Filterpapiere und Membran wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten und mit 2x SSC angefeuchtet. Auf ein Filterpapier, beide Enden in 20x SSC, wurde das Gel gelegt und darauf die Membran. Nun wurden weitere Filterpapiere und schließlich zugeschnittene Papierhandtücher gelegt und beschwert. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte über Nacht. Am nächsten Morgen erfolgte der Abbau, die Membran wird in einem UV- Stratalinker bei 120 kJ crossgelinkt und in Filterpapier verpackt aufbewahrt.

Hybridisieren:

Zum Hybridisieren wurden DIG gelabelte PCR Sonden (Roche, PCR DIG Probe Synthesis Kit) mit genspezifischen Primern nach Anweisung des Herstellers verwendet. Diese PCR- Produkte wurden in 50 ml Prähybridisierungspuffer gegeben und in dieser Konzentration verwendet. Die Prähybridisierung der Membran wurde bei 68°C für 2 h in einem Hybridisierungsofen durchgeführt. Die Sondenlösung wurde in einem Wasserbad für 10 Minuten aufgekocht, und nach der Prähybridisierung in das Hybridisierungsröhrchen gegeben und über Nacht bei 68°C hybridisiert.

Waschen:

Am nächsten Morgen wurde die Membran 2 mal für 5 Minuten in 2x Waschlösung bei Raumtemperatur und anschließend 2 mal für 15 Minuten in 0,5x Waschlösung bei der Hybridisierungstemperatur gewaschen. Daraufhin wurde die Membran in Waschpuffer für 5 Minuten inkubiert. Danach wurde die Membran zur Blockierung für 30 Minuten bis 1 Stunde in Puffer 2 gegeben und schließlich dieser wieder abgenommen und für 30 Minuten die Antikörper in Puffer 2 verdünnt zugegeben. Nach zweimaligen 15 minütigen Waschschritten mit Waschpuffer wurde 5 Minuten mit AP- Puffer inkubiert. Nun wurde die Membran für 5 Minuten mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase CSPD (5µl in 500µl AP- Puffer verdünnt) inkubiert. Die Membran wurde für 10 Minuten einem Röntgenfilm ausgesetzt und je nach Signalstärke für eine zweite Aufnahme die Zeit festgesetzt.

4.5.19 Transformation von *A. nidulans*

In dieser Arbeit wurde der *A. nidulans* Stamm RMSO11 verwendet, der zum Wachstum eine Zugabe von p- Aminobenzoesäure (PABA) und Arginin in das Medium benötigt (siehe 3.1.9). Das für die Transformation verwendete Plasmid pMT- sGFP verleiht den Transformanten wieder die Fähigkeit zur Argininsynthese, so dass dem Medium nach der Transformation nur noch PABA zugesetzt wurde.

Herstellung der Protoplasten

300 ml MM- Medium + PABA + Arginin wurden mit einer Kolonie des Stammes RMSO11 angeimpft und die Kultur bei 30°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur durch steriles Miracloth filtriert und mit sterilem dH₂O gewaschen. Ca. 1 g des Mycels wurde mit einem sterilen Spatel in einen 50 ml Falcon mit 10 ml vorgekühlter Lösung 2 gegeben. Dazu wurden 200 mg Glucanex gegeben, gevortext und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dies wurde bei 30°C und 120 rpm für 1,5 Stunden inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle auf das Vorhandensein von Protoplasten, wurde die Lösung mit 10 ml vorgekühlter Lösung 5 überschichtet, anschließend bei 4°C und 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt ist an der Phasengrenze eine Bande zu erkennen, die die Protoplasten enthält. Diese wird mit einer Pipette abgenommen und in ein neues vorgekühltes 50 ml Falcon gegeben (auf Eis). Zu dieser Suspension wird das doppelte Volumen an Lösung 6 hinzugefügt und erneut bei 4°C, 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Protoplasten wurden in 1 ml Lösung 6 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Hierin wurden sie wieder bei 4°C, 5000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet, das Pellet in der Restflüssigkeit gelöst und 200 µl vorgekühlte Lösung 7 zugegeben.

Transformation

Für die Transformation wurden ca. 10 µg DNA eingesetzt. Diese wurde in einem Volumen von 10 µl mit 40 µl Lösung 7 zu einem Endvolumen von 50 µl gemischt. Zu den Protoplasten in einem 15 ml Falcon wurden 50 µl Lösung 8 (enthält PEG) gegeben und dann die DNA- Lösung. Nach kurzem Mischen wurde für 20 Minuten auf Eis inkubiert und schließlich erneut 1 ml Lösung 8 zugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Mit vorgekühlter Lösung 7 wurde auf 5 ml aufgefüllt, 10 ml MMR- Top Agar zugegeben und auf MMR- Selektionsplatten gegossen. Diese wurden für ca. 3 Tage bei 37°C inkubiert. Transformanten wurden erneut auf MM- Medium + PABA gepickt. Von diesen wurden Sporen in 450 µl MM- Flüssigmedium mit Glucose bzw. Threonin oder Glycerol bei 28°C über Nacht inokuliert und die gekeimten Sporen mikroskopiert.

4.5.20 Für *in silico* Untersuchungen verwendete Internetdatenbanken

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden folgende frei zugänglichen Internetdatenbanken verwendet:

Die Sequenzen der Gene sowie der homologen Flanken für die KO- Konstrukte wurden ermittelt mit:

Magnaporthe grisea Database des BROAD Instituts, auf der die Genomsequenzen mit eventuellen Annotationen vorliegen.

http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/magnaporthe_grisea/MultiHome.html

Die *Magnaporthe grisea*/ *Oryza sativa* interaction database MGOS. Hier können ebenfalls die Genomsequenzen mit teils weitergehenden Informationen eingesehen werden. So sind hier auch Ergebnisse früherer veröffentlichter *M. oryzae*/ *O. sativa*- Agilent-Microarrays hinterlegt.

<http://www.mgosdb.org/perl/gene/index.cgi>

Die Proteinsequenzen wurden weiter auf Homologien zu anderen bekannten Proteinen, sowie auf bekannte Proteinmotife, Signalpeptide und ihre wahrscheinliche Lokalisation innerhalb der Zelle hin untersucht. Hierzu wurden folgende Datenbanken verwendet.

NCBI Blast search zur Suche homologer Proteine:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Zur Suche nach Proteinmotifen: Sanger Institute, SMART und Motif Scan

<http://pfam.sanger.ac.uk/search?tab=searchSequenceBlock>

<http://smart.embl-heidelberg.de/>

http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan

Zur Suche nach Signalpeptiden: SignalP

<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>

Zur Suche nach Repeats: RADAR

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/Radar/index.html>

Die wahrscheinliche Lokalisation innerhalb der Zelle wurde mit PSORT II ermittelt.

<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>

4.6 *Yeast signal sequence trap*

Durch diese Methode können relativ einfach Proteine, die ein funktionierendes Signalpeptid enthalten, gefunden werden. Es kann aber auch überprüft werden, ob ein bestimmtes Protein sekretiert wird oder nicht. Die in dieser Arbeit verwendete Methode basiert auf Lee et al. (2006).

Die Methode basiert auf einem einfachen Mechanismus. Damit Hefen auf einem Medium mit reiner Saccharose als Kohlenstoffquelle wachsen können, müssen sie eine Invertase sekretieren. Dieses Enzym katalysiert die Spaltung von Saccharose in Fructose und Glukose, welche dann von der Hefe verstoffwechselt werden können. Ein Hefestamm, welcher keine Invertase mehr besitzt, ist nicht zu Wachstum auf Saccharosemedium fähig. Dieser Umstand wird hier ausgenutzt, indem ein Stamm dessen Invertase *suc2* aus-

geschaltet wurde, mit Plasmiden welche *suc2* enthalten transformiert wird. Das auf dem Plasmid vorhandene *suc2*- Gen enthält allerdings kein Signalpeptid mehr. Wird jedoch ein Protein, das ein Signalpeptid enthält, vor die Invertase fusioniert, so kann diese quasi im Schlepptau des Proteins ebenfalls wieder sekretiert werden. Nur Zellen, welche ein solches Plasmid mit Fusionsprotein mit Signalpeptid besitzen, können auf Saccharosemedium wachsen. Hefen jedoch ohne Plasmid, bzw. deren Plasmid ein Fusionsprotein ohne Signalpeptid enthält, können nicht wachsen. Auf diese Weise können, mit den entsprechenden Vektoren, entweder ganze cDNA- Banken nach Proteinen mit Signalpeptid untersucht werden oder, wie in dieser Arbeit, einzelne Proteine auf die Funktionsfähigkeit eines vermuteten Signalpeptids überprüft werden.

4.6.1 Durchführung des yeast signal sequence trap

Für die Klonierung der Konstrukte wurde der ORF des Zielproteins aus cDNA amplifiziert, wobei er mit in die Primer integrierte EcoRI und NotI Schnittstellen versehen wurde. Das PCR- Produkt wurde zuerst in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor kloniert. Hieraus wurde das Insert durch Restriktionsverdau ausgeschnitten und dann durch T4- Ligation in den Vektor pYST2 kloniert. Das so erhaltene Plasmid wurde anschließend sequenziert um zu gewährleisten, dass sich der ORF fehlerfrei und in frame zu der *suc2* Invertase in dem Plasmid befindet.

Das Plasmid wurde anschließend in den Hefestamm Y12321 transformiert (wie in 4.5.3 beschrieben) und auf SD- Medium ohne Leucin sowie auf Saccharose- Selektionsmedium ausplattiert. Nach 3-5 Tagen wurden die Platten auf Kolonien überprüft.

4.7 Yeast two Hybrid Analyse (y2h)

4.7.1 Allgemeines zu der Methode

Bei dieser Methode wird der Transkriptionsfaktor Gal 4 aus der Hefe *S. cerevisiae* eingesetzt, um eine Interaktion zwischen zwei Proteinen nachzuweisen. Hierbei wird ausgenutzt, dass es sich bei diesem Transkriptionsfaktor um ein modular aufgebautes Protein handelt. Er ist unterteilt in eine Bindungsdomäne und eine Transaktivierungsdomäne. Nur wenn diese Domänen zusammenarbeiten, kann Gal 4 sowohl an die DNA binden als auch deren Transkription starten. In dem y2h- System wurden diese Domänen getrennt in zwei unterschiedliche Vektoren kloniert. An sie werden die zu untersuchenden Proteine fusioniert. Werden dann beide Plasmide gleichzeitig in einer Hefezelle exprimiert, so kommen bei einer tatsächlichen Interaktion der Proteine die Binde- und die Aktivierungsdomäne wieder in räumliche Nähe zueinander. Diese räumliche Nähe reicht aus, um die Funktionsfähigkeit des Gal 4 wieder herzustellen und so die Transkription der durch ihn kontrollierten Gene einzuleiten. Das Protein, für welches ein In-

teraktionspartner gefunden werden soll, wird als Bait- Protein bezeichnet, während die Proteine, die als mögliche Interaktionspartner dienen, als Prey- Proteine bezeichnet werden. Als Markergene werden die durch Gal 4 kontrollierten Gene *Ade2*, *His3*, *Mell* und *lacZ* verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gen des Adeninstoffwechsels (*Ade2*), ein Gen des Histidinstoffwechsels (*His3*) sowie eine α - Galactosidase (*Mell*) und eine β - Galactosidase (*lacZ*), die eine Farbreaktion bei Zugabe des entsprechenden Substrates auslösen.

4.7.2 Durchführung des y2h- Screen

Die Durchführung des y2h- Screens erfolgte genau wie in dem Protokoll des „Matchmaker™ Library Construction & Screening Kit“ von Clontech beschrieben. Um die Bait- Konstrukte herzustellen wurden die zu testenden Proteine ohne Signalpeptid kloniert. Sie wurden gegen eine cDNA- Bank aus mit *M. oryzae* infizierten Reisblättern und Wurzeln getestet, die im Verlauf der Batchelarbeit von Jasmin Götzenberger hergestellt wurde.

4.7.3 Expressionstest des *Bait*- Konstruktes durch Western Blot

Zusammensetzung der Acrylamidgele:

Sammelgel: 4,35 ml dH₂O, 750 μ l 1M Tris- HCl pH6,8, 60 μ l 10% SDS, 60 μ l 10% APS, 6 μ l TEMED

Trenngel: 4,4 ml dH₂O, 3 ml 40% Acrylamid. 100 μ l 10% SDS, 100 μ l 10% APS, 5 μ l TEMED

Die Proteinextraktion aus Hefe wurde durchgeführt, wie in dem Protokoll „Preparation of yeast Protein extracts“ von Clontech beschrieben. Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde das Mini PROTEAN Tetra Cell System von BioRad benutzt. Die Auftrennung im Sammelgel wurde mit einer Spannung von 60 V durchgeführt, während nach dem Erreichen des Trenngels 150 V angelegt wurden.

Die Proteine wurden über Nacht bei 4° C und mit einer angelegten Spannung von 30 V auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach Abschluss des Übertrags wurde die Membran in einem ersten Schritt in einer 5%igen Milchpulverlösung in 1xPBST für 1 h blockiert. Anschließend wurde sie dreimal für 5 Minuten in 1xPBST gewaschen und dann mit einer Antikörperlösung (1x PBST mit 2,5% Milchpulver + 1:3000 c-myc Antikörper) für 1 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem 5- minütigem Waschen in 1xPBST wurde der sekundäre Antikörper, ebenfalls in 2,5 % Milchpulver in 1xPBST, zugegeben und für 1 h inkubiert, dann wieder dreimal 5 Minuten gewaschen in 1x PBST. Zur Detektion wurden 1 ml Lösung A (50 ml 0,1 M Tris- HCl pH6,8, 12,5 mg Luminol), 100 μ l Lösung B(11 mg Hydroxicoumarinsäure in 10 ml DMSO) und 0,5 μ l H₂O₂ auf die Membran gegeben.

4.7.4 X- α - Galactosidase Test

Für den X α - Gal Test wurde eine Kolonie in 500 μ l dH₂O suspendiert und 50 μ l dieser Lösung auf Platten gegeben, die 20 μ g/ml X α - Gal enthielten. Diese wurden daraufhin bei 30 °C für 3-5 Tage inkubiert. Die Intensität der Blaufärbung einer Kolonie zeigt die Stärke der Interaktion an.

5 Ergebnisse

Während meiner Diplomarbeit führte ich in Kooperation mit Dr. Karsten Andresen und PD Dr. Eckhard Thines vom IBWF der Universität Kaiserslautern einen *Microarray* durch, in dem mit *M. oryzae* infiziertes Blattgewebe mit infiziertem Wurzelgewebe verglichen wurde. Als Ergebnis dieses Transkriptionsvergleiches konnten mehr als 900 Gene gefunden werden, die während der Wurzelinfektion stärker exprimiert waren, als während der Blatinfektion. Aus diesen Genen wurden durch *in silico*-Analysen der ersten 100 Gene mit Hilfe mehrerer Datenbanken 13 sekretierte und während der Infektion induzierte Gene ausgewählt, deren Genexpression durch *Real Time* PCR im Vergleich von vegetativem Mycel, Sporen, infiziertem Blattgewebe und infiziertem Wurzelgewebe nochmals überprüft wurde. Hieraus ergaben sich vier vielversprechende Kandidaten, die ausgewählt wurden, um sie weiter zu untersuchen. Dazu sollten die Gene durch homologe Integration eines Knockout-Konstruktes ausgeschaltet werden, um ihren Einfluss auf die Infektionsfähigkeit von *M. oryzae* zu ermitteln. Zusätzlich sollten die Proteine im Anschluss hinsichtlich ihrer möglichen Effektorfunktion näher charakterisiert werden.

Ausgewählt wurde ein Gen mit der Identifikationsnummer MGG 08230, das in dem Array während der Wurzelinfektion 25-fach höher exprimiert war. In der *Real Time* PCR zeigte sich, dass das Gen sowohl während der Wurzelinfektion (8000-fach) als auch während der Blatinfektion (1190-fach) sehr viel höher exprimiert war, als in vegetativem Mycel. Das zweite Gen, mit der Identifikationsnummer MGG 05504, war in dem Array in infiziertem Wurzelgewebe 25 mal stärker als in Blattgewebe induziert. Durch *Real Time* PCR konnte gezeigt werden, dass es in infiziertem Wurzelgewebe 51-fach stärker exprimiert wurde als in vegetativem Mycel. Das dritte ausgewählte Gen, MGG 10244, hatte im Vergleich von Wurzel- und Blatinfektion eine 34 mal höhere Expression während der Wurzelinfektion, und war in den infizierten Wurzeln 34 mal stärker induziert als in Mycel. Das letzte Gen schließlich, MGG 14156, war durch den Array ermittelt worden, in dem es 19 mal höher in Wurzelgewebe induziert war. In der *Real Time* PCR konnte zwar keine verstärkte Expression festgestellt werden, aufgrund der interessanten Nudix-Hydrolase Domäne, die es enthält, wurde jedoch auch dieses Gen für weitere Experimente ausgewählt. Diese Domäne ist deshalb interessant, da für ein Nudix-Hydrolase Protein gezeigt wurde, dass es ein negativer Regulator der Pflanzenabwehr in *Arabidopsis thaliana* ist (Ge et al., 2007). Ist dieses *A. thaliana* Gen *NudT7* außer Funktion, so führt dies dazu, dass die Pflanzenabwehr sowohl auf Pathogene als auch nicht Pathogene hypersensibel reagiert (Ge et al., 2007). Im Verlauf der Arbeit verstärkte sich diese Einschätzung noch, da in *Phytophthora sojae* ein Nudix-Hydrolase Effektor Avr3b (Dong et al., 2011) sowie zum Ende der Arbeit ein weiterer Nudix-

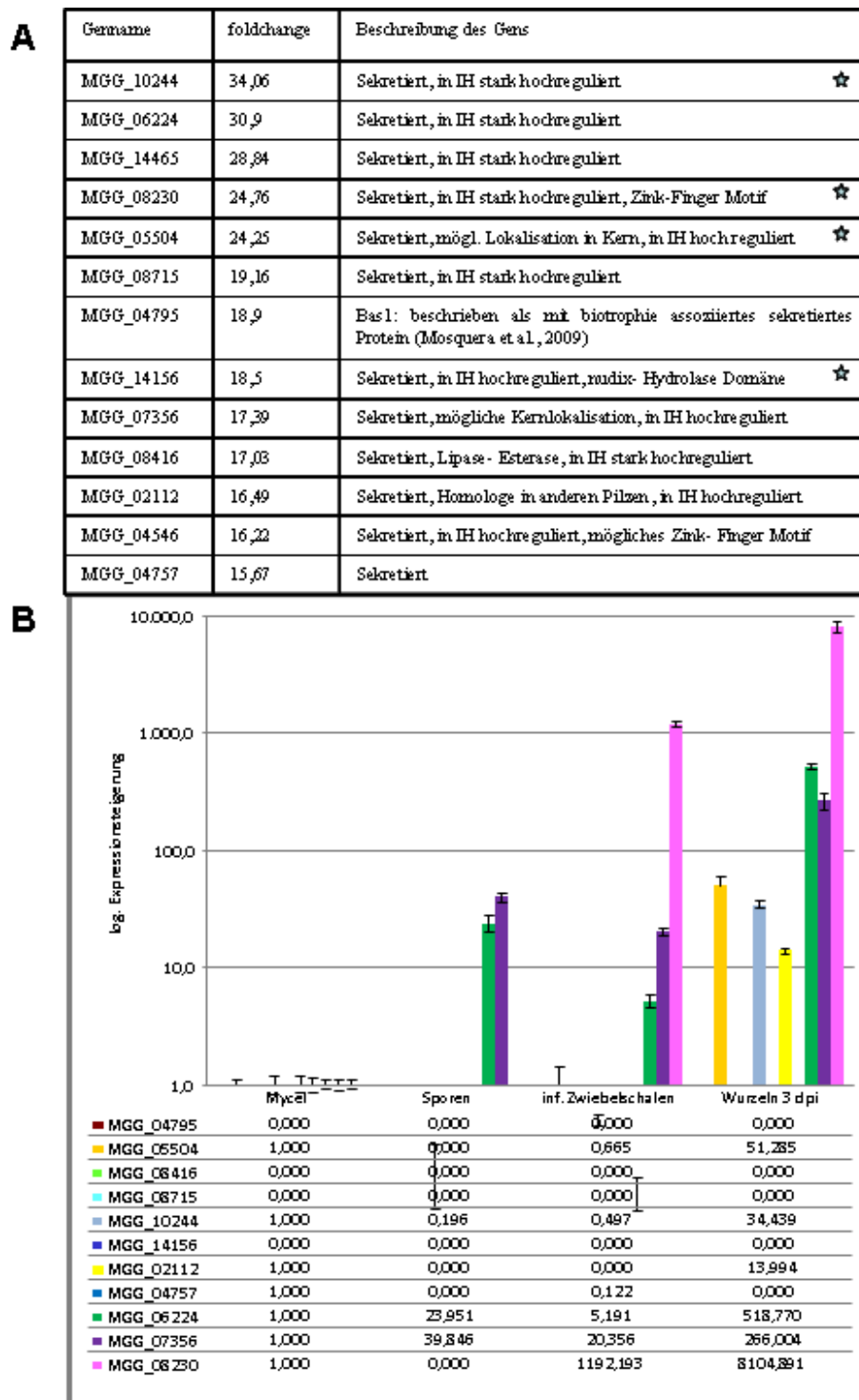


Abb. 5.1: Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Gene. In einem Microarray zum Vergleich von mit *M.oryzae* infiziertem Blattgewebe mit infiziertem Wurzelgewebe wurden 100, während der Wurzelinfektion induzierte Gene, *in silico* überprüft. In Tabelle A sind die aus diesen ersten 100 Genen der Microarray-Ergebnisse ausgesuchten Gene, welche in einer *Real Time*-PCR nochmals getestet wurden, dargestellt und beschrieben. B: Genexpressionsanalyse in infizierten Wurzeln und Zwiebelepidermis, sowie in Sporen im Vergleich zu vegetativem Mycel. Für weitere Untersuchungen wurden die mit * markierten Gene ausgewählt.

Hydrolase Effektor CtNudix in *Colletotrichum truncatum* (Bhadoria et al., 2013) publiziert wurden. Auf diese Publikationen, sowie die genauen Gründe für die Auswahl

aller vier untersuchten Gene, wird allerdings in dem Diskussionsteil dieser Arbeit (Kapitel 6.1) noch ausführlich eingegangen werden.

5.1 *in silico*-Untersuchung

5.1.1 Struktur der ausgewählten Gene

Bei allen vier ausgesuchten Genen handelt es sich um Proteine mit einem vorhergesagten Signalpeptid (Datenbank SignalP). Das bedeutet also, dass alle vier vermutlich sekretiert werden und damit mögliche Kandidaten für Effektorproteine sind.

Für das Genprodukt des Gens mit der Identifikationsnummer MGG 08230 konnte ermittelt werden, dass es sich um ein Protein mit 133 Aminosäuren handelt. Das Signalpeptid umfasst die Aminosäuren 1-19, während die Aminosäuren 91-114 eine klassische Zink-Finger Domäne (C₂H₂) umfassen. Im Folgenden soll dieses Gen aufgrund der Zink-Finger Domäne als *Zfl* bezeichnet werden. Von Aminosäure 77-97 besitzt es außerdem eine *Inhibitor of apoptosis* Domäne. Die Lokalisierung in der Zelle wurde von der PSORTII-Datenbank mit einer Wahrscheinlichkeit von 35% als Kernlokalisierung, 22% cytoplasmatisch und 17% extrazellulär angegeben. In der Sequenz des Proteins konnte allerdings keine explizite Kernlokalisierungssequenz gefunden werden. Die genomische Nukleotidsequenz des Gens enthält keine Introns.

Bei dem Genprodukt des Gens MGG 05504 handelt es sich um ein 101 Aminosäuren langes Protein, dessen Aminosäuren 1-19 als Signalpeptid identifiziert wurden. Für dieses Protein ist von Aminosäure 48-91 eine Nukleotidyltransferase-Domäne vorhergesagt, weshalb es im Weiteren als *Ntl* bezeichnet wird. In einer ersten *in silico*-Untersuchung konnte in der Sequenz eine schwache Homologie zu einer GASA-Domäne entdeckt werden. GASA-Domänen Proteine wurden zuerst in *Arabidopsis thaliana* gefunden, es handelt sich dabei um durch Gibberelinsäure stimulierte Gene (Roxrud et al. 2007). Aus der englischen Übersetzung dieses Namens leitet sich auch die Abkürzung GASA-Domäne ab (**g**ibberellic **a**cid **s**timulated **a**rabidopsis gene). Dabei würde es sich natürlich um ein sehr interessantes Gen handeln, da sich die Frage stellt, wozu ein pflanzenpathogener Pilz ein durch das Pflanzenhormon Gibberelinsäure induziertes Gen besitzt. Diese Domäne war mit ein Grund, warum dieses Gen ausgewählt wurde. Allerdings wurde diese Domäne bei einer später durchgeführten weiteren Datenbankanalyse nicht mehr angezeigt. Für die Lokalisierung des Proteins wurde mit einer Wahrscheinlichkeit von 44% eine extrazelluläre Lokalisierung, mit 22% eine Kernlokalisierung, mit ebenfalls 22% eine Lokalisierung in Mitochondrien und mit 11% eine cytoplasmatische Lokalisierung vorhergesagt. Laut der PSORTII-Datenbank konnte in der Sequenz des Proteins zwischen den Aminosäuren 53 und 57 zwei vermutete klassische Kernlokalisierungssequenzen gefunden werden. Bei einer Blastanalyse wurden

homologe hypothetische Proteine in *Verticillium sp.* und *Colletotrichum sp.* gefunden. Die genomische Sequenz dieses Proteins enthält ein 90 Basenpaare langes Intron.

Die Untersuchung des Gens MGG 10244 ergab ein Protein mit 127 Aminosäuren. Die ersten 17 Aminosäuren seiner Sequenz wurden als Signalpeptid identifiziert. Weiterhin sind in der Sequenz zwei jeweils 49 Aminosäuren lange, fast perfekte *Repeats* enthalten. Darüber hinaus konnten keine funktionalen Domänen gefunden werden. In einem Blastp wurde eine schwache Ähnlichkeit zu hypothetischen Proteinen aus *Colletotrichum higginsianum* und *Phytophthora savastanoi* gefunden. Außerdem wurde in dem NCBI-Blastp eine 45% Übereinstimmung zu einem *sialic acid binding Ig like Lectin Siglec7* festgestellt. Aufgrund der Struktur wird dieses Protein weiterhin als Llr1 (stehend für Englisch: *lectin like repeat containing gene1*) bezeichnet. Die Lokalisierung ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 55% extrazellulär und nur mit je 11% cytoplasmatisch, in der Vakuole, den Mitochondrien oder dem ER zu vermuten. In der genomischen Sequenz dieses Proteins ist kein Intron vorhanden.

MGG 14156, das vierte ausgewählte Gen, ist ein 156 Aminosäuren langes Protein, dessen Aminosäuren 1-18 als Signalpeptid identifiziert wurden. Es enthält eine von Aminosäure 32-132 reichende Nudix-Hydrolase Domäne, weshalb es zukünftig als Nud1 bezeichnet wird. Das Protein lokalisiert in Zellen mit 44% Wahrscheinlichkeit extrazellulär, mit 33% im Cytoplasma und mit 22% in der Vakuole. Die genomische Sequenz dieses Proteins enthält ein 59 Basenpaare langes Intron.

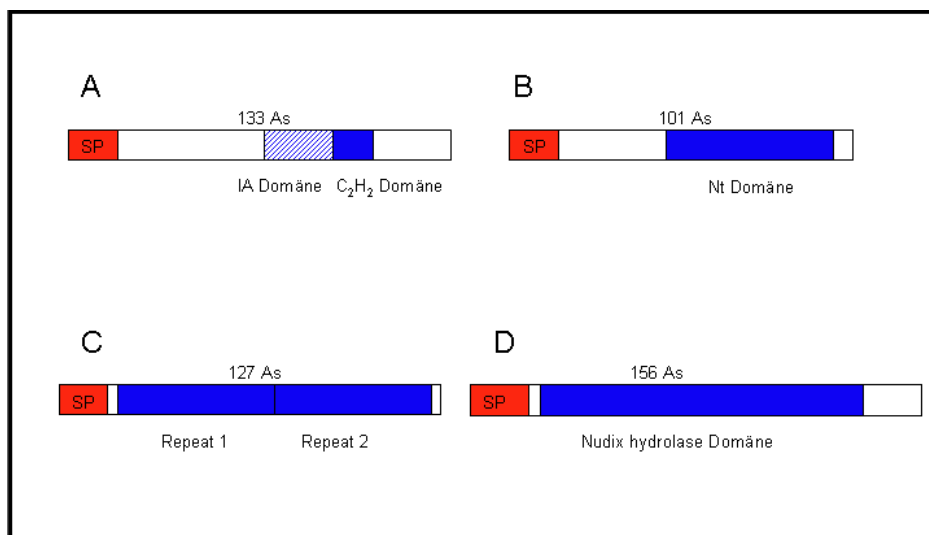


Abb. 5.2: Durch *in silico*-Analysen in verschiedenen Datenbanken ermittelte Proteinstruktur der ausgewählten Gene. A: Zf1; B: Nt1; C: Llr1; D: Nud1. Abkürzungen: As: Aminosäuren; IA: inhibitor of Apoptosis; C₂H₂: klassische Zink-Finger Domäne; Nt: Nukleotidyltransferase Domäne

5.2 Ergebnisse der Deletionsversuche von Zf1, Nt1, Llr1 und Nud1

Für alle vier Gene wurden nach dem in Kapitel 4.5.16 dargestellten Methode Knockout-Konstrukte hergestellt. Dies gestaltete sich sehr zeitaufwendig, weil schon in dem ersten Schritt, der Amplifikation der homologen Flanken, teils große Schwierigkeiten auftraten. Da für die homologe Rekombination in *M. oryzae* relativ große homologe Flanken von 1 kB Länge oder darüber sinnvoll sind, mussten diese Flanken in entsprechender Länge via PCR amplifiziert werden. Um die Rekombination zu vereinfachen, wurde zu Beginn geplant, Flanken von 2,5 kB einzusetzen. Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, konnte allerdings bei vier der acht Flanken kein Amplikon dieser Länge erhalten werden. So musste stückweise die Länge der Flanke reduziert werden, bis sie erfolgreich amplifiziert werden konnte. Auch die anschließenden Klonierungen der Konstrukte gelangen jeweils erst nach mehrfach wiederholten Versuchen und dem Testen von verschiedenen Klonierungsstrategien. In Abbildung 5.3 sind die endgültigen Konstrukte mit den Längen der einzelnen homologen Flanken sowie den für die Klonierung verwendeten Restriktionsendonucleasen für alle vier Gene schematisch dargestellt.

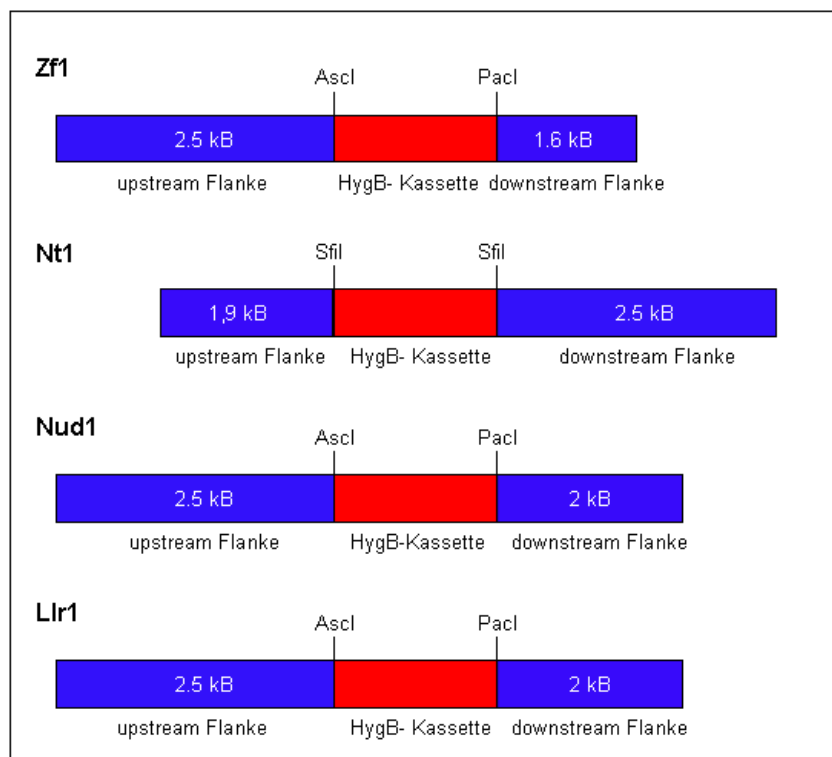


Abb. 5.3: Aufbau der zum Deletieren der einzelnen Gene verwendeten Konstrukte. Die unterschiedlichen Längen der homologen Flanken sind durch schrittweises Verkürzen der Flanke entstanden, bis eine Amplifikation durch PCR erreicht werden konnte.

Als die Konstrukte vorlagen, wurden sie durch Protoplastentransformation in den *M. oryzae* Stamm Δ Ku80 transformiert. Im Anschluss wurden die auf den Selektionsplatten

gewachsenen Kolonien in einem ersten Schritt durch eine PCR zur Amplifikation des offenen Leserahmens (engl. *open reading frame* ORF) der Gene getestet. Diese PCR wurde mit aus den Kolonien extrahierter gDNA durchgeführt. Nur in Fällen einer negativen PCR, also eines fehlenden ORF, wurde im Anschluss die richtige Integration des Konstruktes durch einen Southern Blot überprüft.

Für zwei der untersuchten Gene konnten durch einen Southern Blot bestätigte Ko-Mutanten hergestellt werden. Diese beiden Gene waren *Zfl* und *Nt1*. Für *Zfl* konnte trotz häufiger wiederholter Transformationen nur eine einzige Ko-Mutante (*Zfl*-6) erhalten werden. Für *Nt1* konnten dagegen bei einer einzigen Transformation drei unabhängige Ko-Mutanten ($\Delta Nt1$ -1, $\Delta Nt1$ -5, $\Delta Nt1$ -6) erzielt werden. Um die möglichen Transformanten durch einen Southern Blot zu testen, wurden aus der Datenbank des Broadinstitutes die Sequenz der DNA upstream und downstream der homologen Flanken auf mögliche Restriktionsschnittstellen abgesucht. Es sollte möglichst ein Restriktionsenzym verwendet werden, das sowohl in dem Konstrukt schneidet, als auch in der DNA außerhalb des Konstruktes. So sollte sichergestellt werden, dass dieses Konstrukt am richtigen Locus im Genom und auch nur einmal in das Genom integriert wurde, und es sich folglich um eine reine Deletion des Zielgenes handelt. Für das Gen *Zfl* wurde einmal mit dem Restriktionsenzym EcoRI sowie mit dem Enzym BamHI verdaut. Für beide Enzyme gibt es jeweils eine Schnittstelle in der Hygromycinresistenzkassette. EcoRI besitzt eine weitere Schnittstelle downstream außerhalb des Konstruktes, während die zweite BamHI Schnittstelle in der downstream-Flanke liegt. Als Sonde wurde ein 740 bp langes Fragment der Downflanke amplifiziert. Die erwarteten Fragmentgrößen der Knockout-Stämme liegen für die EcoRI verdaute DNA bei 3,5 kB und für die BamHI verdaute DNA bei 3 kB. In Wildtypstämmen sind für beide Enzyme eine Schnittstelle upstream des Bereichs der homologen upstream-Flanke vorhanden. Die zweite Schnittstelle liegt im Falle von EcoRI downstream des Bereichs der homologen downstream-Flanke, während die BamHI Schnittstelle wieder in der downstream-Flanke liegt. So werden in der Wildtypsituation für beide Enzyme Fragmentgrößen von ungefähr 7 kB (EcoRI: 6,9 kB, BamHI: 7,2 kB) erwartet.

Um die drei vermuteten Knockout-Stämme des *Nt1* Gens zu testen, wurde genomische DNA dieser Kolonien mit EcoRI verdaut. Für dieses Enzym sind sowohl eine Schnittstelle in der Hygromycinkassette als auch eine upstream des Bereichs der homologen upstream-Flanke vorhanden, so dass im Falle eines richtig integrierten Konstruktes ein 2,6 kB großes Fragment erwartet wird. In Wildtyp-DNA wird dagegen ein 13 kB großes Fragment erwartet. Als Sonde wurde in diesem Fall ein 270 bp langes PCR-Amplifikat innerhalb der upstream-Flanke verwendet.

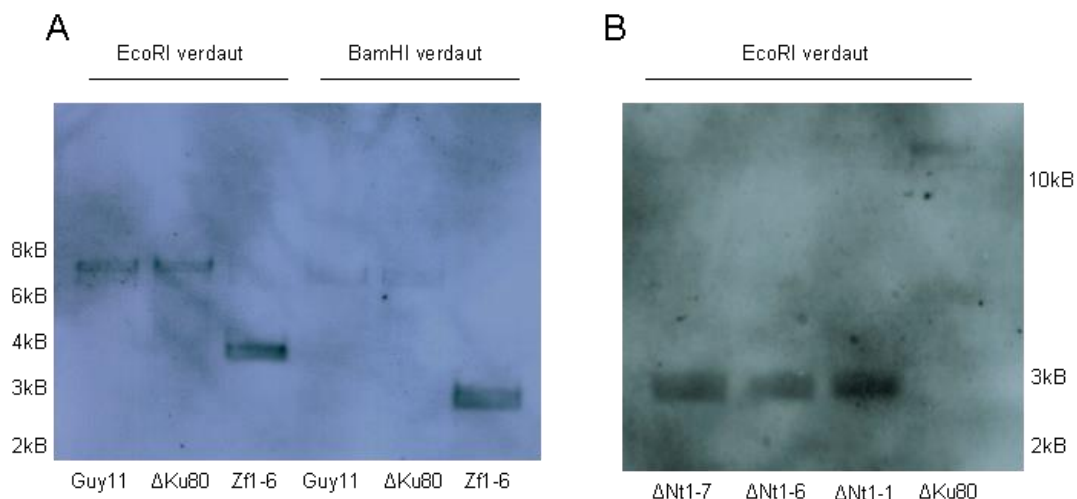


Abb. 5.4: Southern Blots zur Verifizierung der homologen Integration der Knockout-Konstrukte.
A) *Zfl* Knockout: In den ersten beiden Spuren ist jeweils die Wildtypsituation zu sehen, während die dritte Spur den Knockout zeigt. In der Wildtyp-DNA sind in beiden Fällen Banden bei ca. 7 kB zu sehen. Die Banden des *Zfl* Knockouts liegen ebenfalls bei den erwarteten 3,5 kB (EcoRI) sowie 3 kB (BamHI), und es ist keine weitere Bande eines mehrfach oder ektopisch integrierten Konstruktes zu sehen. **B) Auch im Fall des *Ntl* Knockouts sind bei allen 3 Mutanten die erwartete Fragmentgröße von ca. 2,6 kB erkennbar, während in der Wildtyp-DNA nur ein Fragment oberhalb 10 kB zu sehen ist. Es sind ebenfalls keine weiteren Banden vorhanden.**

Wie in Abb. 5.4 zu sehen ist, bestätigen die Ergebnisse der Southern Blots eine homologe Integration der Konstrukte. Es sind neben den Banden mit der erwarteten Fragmentlänge keine weiteren Banden sichtbar, so dass eine Mehrfachintegration ausgeschlossen werden kann. Dies zeigt, dass es sich bei den Transformanten um Stämme mit einer Deletion des Zielgenes handelt.

Für die beiden anderen Gene konnte trotz etlicher Versuche kein bestätigter Knock-out erreicht werden. Bei den Versuchen das Lektin-ähnliche, *Repeats* enthaltende, Gen *Llr1* zu deletieren, gab es eine Kolonie, welche in einer PCR gegen den ORF ein negatives Ergebnis zeigte. Dieser Stamm hatte also offensichtlich den *Llr1*-ORF verloren. Allerdings zeigte sich bei der Überprüfung durch einen Southern Blot, dass diese Integration nicht wie gewünscht erfolgt sein konnte, da ein nicht zu erklärendes Bandenmuster auftrat. Da so keine klar durch das Ausschalten dieses Gens hervorgerufene Phänotypisierung zu gewährleisten war, wurde nicht mit diesem Stamm weitergearbeitet. Im weiteren Verlauf der Arbeiten traten bedauerlicherweise keine weiteren möglichen Ko-Mutanten mehr auf. Insgesamt wurden mehr als 160 Kolonien, die mit diesem Ko-Konstrukt transformiert waren, ohne einen einzigen Erfolg gescreent. Dieses Gen wurde aus diesem Grund, mit Ausnahme einer Lokalisierung zum Vergleich mit *Zfl* und *Ntl* (siehe 5.4.), nicht näher charakterisiert.

Bei den Versuchen, das eine Nudix-Hydrolase Domäne enthaltende Gen *Nud1* auszuschalten, wuchs nach den einzelnen Transformationen jeweils nur eine geringe Anzahl möglicher Mutanten. Da die geringe Anzahl an Transformanten verdächtig erschien,

wurden die Sequenzen der up- und downstream Flanken nochmals genauer überprüft, um mögliche Fehler auszuschließen. In diesem Verlauf konnte festgestellt werden, dass es ein exaktes Duplikat zu diesem Gen gibt. *Nud1* liegt auf Chromosom IV, während das exakt sequenzgleiche MGG 14344 auf Chromosom I liegt (MGOS-Database). Es stimmt nicht nur der ORF beider Gene exakt überein, sondern eine Analyse der umliegenden Sequenz mit Hilfe der Broadinstitute-Datenbank ergab, dass upstream der Gene mindestens 2 kB übereinstimmen und downstream die ersten 491 Basenpaare identisch sind. Hier liegt also eine größere Duplikation der Sequenz im Genom vor. Dies kann zwar nicht erklären, warum es bei den Transformationen zu einer schlechten Transformationsrate kam, allerdings macht es den Erfolg der gewählten Knockout-Strategie für dieses Gen insgesamt fraglich. Es erscheint durchaus wahrscheinlich, dass die Verdopplung zu einer funktionellen Redundanz führt. Ein Doppel-Knockout mit diesem Konstrukt hingegen erscheint aufgrund der Unterschiede im Bereich der Downstreamsequenz, noch dazu mit den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen über die Effizienz von Gen-Knockouts in *M. oryzae*, als sehr unwahrscheinlich. Da dies leider erst zu einem sehr späten Zeitpunkt dieser Arbeit festgestellt wurde, konnte eine Ersatzstrategie zum Ausschalten dieses Gens nicht mehr praktisch umgesetzt werden. Mögliche Ansätze hierzu werden im Diskussionsenteil vorgestellt werden. Wie *Llr1* wurde dieses Gen als vergleichendes Beispiel in den Lokalisierungsexperimenten eingesetzt.

5.3 Phänotypisierung der *Zf1*- und *Nt1*- Deletionsstämme

Sowohl der $\Delta Zf1$ -Stamm, als auch die drei $\Delta Nt1$ -Deletionsstämme zeigten im normalen Wuchs auf CM-Medium im Vergleich zu den Wildtypstämmen keine Auffälligkeiten. Auch bei der Konidienbildung konnten im Verlauf der Experimente keine auffälligen Unterschiede festgestellt werden. Da die Gene aufgrund einer verstärkten Expression während der Infektion von pflanzlichen Geweben ausgewählt wurden, sollte getestet werden, ob es ein verändertes Infektionsverhalten der Ko-Stämme gab. Dazu wurden der Verlauf von Wurzelinfektionen, von Blattinfektionen und die Appressorienbildung getestet und mit von Wildtypstämmen infizierten Pflanzen verglichen.

5.3.1 Phänotypisierung der Wurzelinfektion

Wurzelinfektionen wurden wie in 4.1. beschrieben durchgeführt. Es wurden zwei Serien durchgeführt, die jeweils aus drei Ansätzen bestanden. Jeder Ansatz wiederum bestand aus je drei Fahräusagar-Platten inokuliert mit den Wildtypen Guy11 und $\Delta Ku80$ sowie der Knockout-Stämme $\Delta Zf1$ und $\Delta Nt1$. Auf jede Platte wurden vier Reiskeimlinge gelegt.

In der ersten Serie wurden von den drei $\Delta Nt1$ -Stämmen nur der Stamm $\Delta Nt1-1$ verwendet. Nach 10 Tagen wurden die Keimlinge von der Platte genommen, fotografiert und

einige Wurzelparameter bestimmt. Es wurde als Erstes der optische Eindruck der Infektionsintensität, welcher sich durch die Ausdehnung, wie auch durch die Intensität der Braunfärbung der infizierten Wurzeln ergab, bestimmt. In der ersten Serie wurde die Länge der Keimwurzel (die erste Wurzel des Keimlings, welche zu Beginn des Versuches auf das Pilzmycel gegeben wurde) und deren Anzahl an Lateralwurzeln bestimmt. Darüber hinaus wurde die Gesamtanzahl der Wurzeln des Keimlings gezählt. Da sich im Verlauf dieser Serie zeigte, dass das Zählen der Lateralwurzeln nahezu unmöglich und mit sehr großen Schwankungen, auch innerhalb eines Stammes, verbunden war, wurde in der zweiten Serie darauf verzichtet. Dies lag daran, dass die sehr feinen Lateralwurzeln auf der Platte wegen des Mycels nicht zu erkennen waren, bei der Abnahme der Wurzeln aber mit diesem verklebten, teils auch abgerissen wurden und somit nicht reproduzierbar sicher gezählt werden konnten. Stattdessen wurden in der zweiten Serie neben der Länge der Keimwurzel auch die Gesamtlänge aller Wurzeln, sowie wieder die Gesamtanzahl der Wurzeln bestimmt. In dieser Serie wurden ebenfalls die in Serie eins nicht getesteten Ko-Stämme $\Delta Nt1-6$ und $\Delta Nt1-7$ miteinbezogen. Durch den Vergleich der Infektionsintensität und der bestimmten Wurzelparameter der infizierten Pflanzen sollte festgestellt werden, ob während der Wurzelinfektion Unterschiede zwischen den mit Wildtypen und den mit Knockout-Stämmen infizierten Wurzeln zu sehen waren.

In Abbildung 5.5 sind Fotos infizierter Pflanzen gezeigt. Um die Bandbreite der Infektionen innerhalb eines Stammes, sowie den Vergleich zwischen den mit verschiedenen Stämmen infizierten Wurzeln darzustellen, wurde jeweils die am stärksten infizierte Platte (also vier Pflanzen, die innerhalb einer einzelnen Platte wuchsen) und die am schwächsten infizierte Platte eines Stammes ausgewählt. Diese sind in zwei Blöcken dargestellt und können so verglichen werden. Für den optischen Vergleich wurden alle Pflanzen, aus beiden Serien herangezogen.

Wie in Abbildung 5.5 zu sehen ist, zeigte sich bei der Betrachtung der infizierten Wurzeln, dass alle Stämme in gleichem Maß dazu in der Lage sind, die Wurzeln von Reispflanzen zu infizieren. Es konnte kein eindeutiger Unterschied bezüglich der ausgelösten Infektionssymptomen auf Wurzeln zwischen den einzelnen Stämmen festgestellt werden. Bei allen Stämmen gab es Wurzeln, die großflächige, relativ dunkle Braunfärbungen aufwiesen, ebenso wie Wurzeln, die nur sehr schwache Läsionen in kleinen Teilbereichen der Wurzeln hatten. Auch beim Verhältnis von stark infizierten zu schwächer infizierten Wurzeln konnte im Verlauf der Serien kein Unterschied zwischen den verschiedenen Stämmen festgestellt werden. Die Anzahl der insgesamt betrachteten Pflanzen betrug für die einzelnen Stämme: $\Delta Ku80$: $n = 70$, $Guy11$: $n = 53$, $\Delta Zf1-6$: $n = 68$, $\Delta Nt1-1$: $n = 49$, $\Delta Nt1-6$: $n = 47$, $\Delta Nt1-7$: $n = 33$.

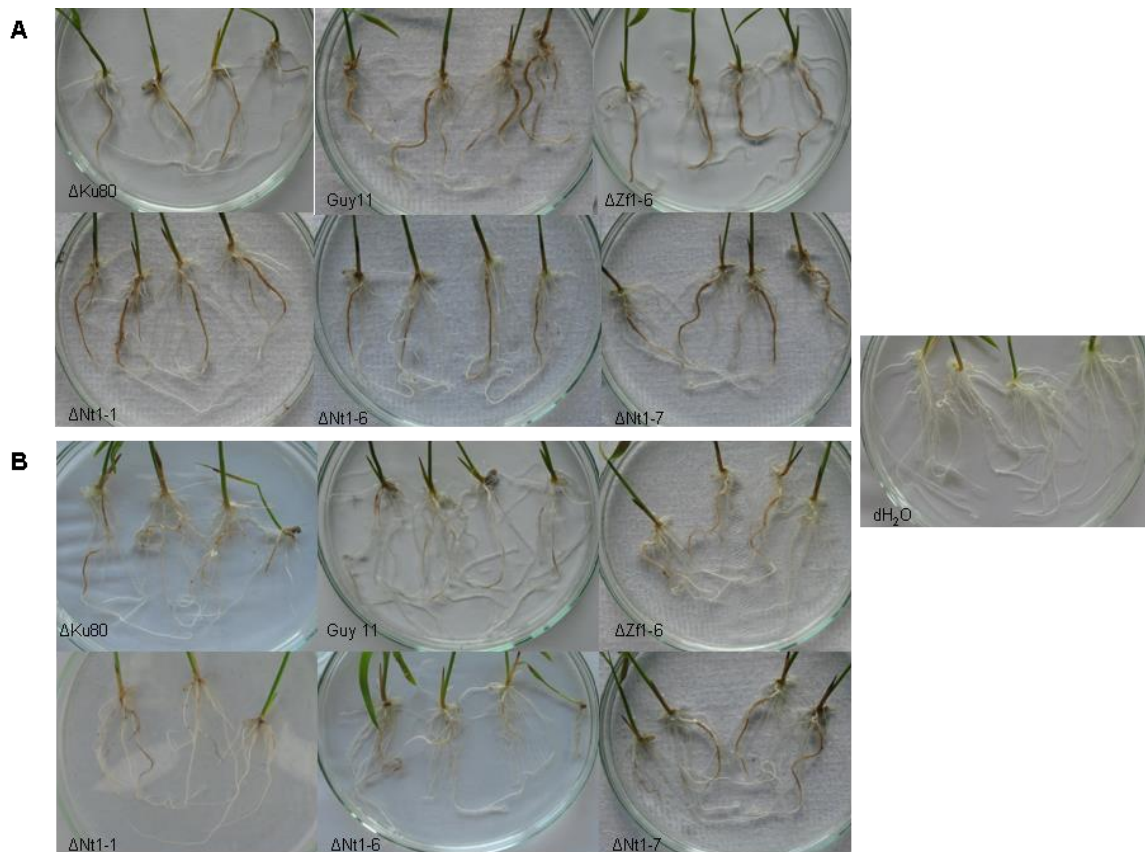


Abb.5.5: Mit den $\Delta Zf1$ - und $\Delta Nt1$ -Stämmen infizierte Reiswurzeln. Die Wurzelinfektion mit vegetativem Mycel wurde nach 10 Tagen fotografiert. In A sind jeweils die Pflänzchen mit den stärksten Infektiossymptomen dargestellt. In B sind die Pflänzchen mit den schwächsten Infektionssymptomen dargestellt, rechts daneben zum Vergleich ein Bild mit nicht infizierten Reispflanzen. Es ist zu sehen, dass es zu keinen deutlichen Unterschieden in der Infektionsausbildung zwischen den unterschiedlichen Stämmen kommt. In A sind bei allen infizierten Wurzeln deutliche, große Bereiche der einzelnen Wurzeln einnehmende Läsionen zu erkennen, während in B nur schwache, Teilbereiche einzelner Wurzeln einnehmende, Braunfärbungen zu sehen sind. Ein eindeutiger Unterschied zwischen den mit Wildtypen und den Knockout-Stämmen infizierten Wurzeln ist nicht zu erkennen.

Zusätzlich zur Betrachtung der Infektionssymptome wurden die Wurzeln vermessen, um etwaige Einflüsse der infizierenden Stämme auf die Wurzelmorphologie zu erkennen. Dies geschah aus dem Grund, da die Infektion mit *M. oryzae* oft zu einer Veränderung der Wurzelmorphologie führt: Die Wurzeln sind kürzer, der Wurzelballen insgesamt erscheint kleiner und verkümmert.

Während der ersten Serie der Infektionsversuche wurde für die mit den Wildtypen Guy11 und $\Delta Ku80$ infizierten Pflanzen eine durchschnittliche Länge der Primärwurzel von 4,9 und 5,4 cm festgestellt. Der $\Delta Zf1-6$ Stamm war mit einer durchschnittlichen Länge von 5,0 cm zwischen den Wildtypen gelegen, während der Stamm $\Delta Nt1-1$ mit 5,6 cm etwas längere Wurzeln besaß. Auch beim Betrachten der Wurzeln entstand der Eindruck, dass die Wurzeln des $\Delta Nt1-1$ Stammes oftmals besser ausgeprägt waren. Allerdings ist die Varianz zwischen den beiden Wildtypen mit 0,5 cm deutlich größer als

die 0,2 cm, welche die Primärwurzel des Knockout-Stammes im Durchschnitt länger waren, als der Wildtyp Δ Ku80.

Bei der Gesamtzahl der sproßbürtigen Wurzeln lagen alle untersuchten Stämme sehr nahe beieinander. Mit Guy11 infizierte Wurzeln hatten im Durchschnitt 10,15 Wurzeln, während mit Δ Ku80 infizierte Stämme 9,85 Wurzeln besaßen. Δ Zf1-6 infizierte Pflanzen hatten 9,73 Wurzeln, während die mit Δ Nt1-1 infizierten Pflanzen mit 10,03 Wurzeln im Mittelfeld lagen. Insgesamt hatten also die Δ Zf1-6 infizierten Pflanzen die wenigsten Wurzeln, lagen allerdings mit gut 0,1 Wurzeln im Durchschnitt weniger nur knapp hinter dem Δ Ku80 Wildtypen.

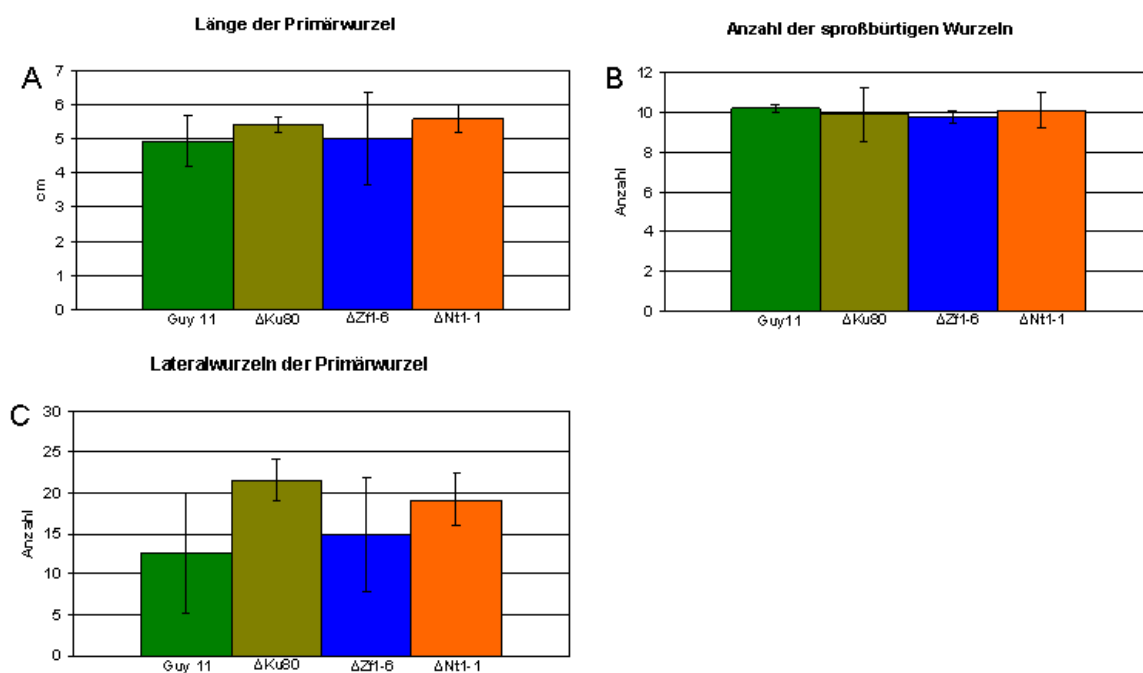


Abb. 5.6: Morphologie der mit Δ Zf1 und Δ Nt1 infizierten Reiswurzeln in der 1. Infektionsserie. Gemessen bzw. gezählt wurden die Länge der infizierten Primärwurzel (A), die Anzahl an sproßbürtigen Wurzeln, (B) sowie die Anzahl an Lateralwurzeln der infizierten Primärwurzel (C). A: Die Wurzellänge mit Δ Zf1-6 infizierter Reispflanzen lag zwischen den Längen, die für die beiden Wildtypen bestimmt wurden. Die Wurzellänge der Δ Nt1-1 infizierten Pflanzen war um 0,2 cm länger als mit Δ Ku80 infizierte Wurzeln. B: Die Anzahl an sproßbürtigen Wurzeln war nahezu identisch. C: Die Anzahl der Lateralwurzeln variierte sehr stark. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Anzahl der in Serie 1 ausgezählten Pflanzen beträgt: Guy11: n= 30, Δ Ku80: n= 26, Δ Zf1-6: n= 33, Δ Nt1-1: n= 27.

Wie oben schon erwähnt, wurde auch die Anzahl der Lateralwurzeln der infizierten Primärwurzel bestimmt. Allerdings können diese Daten nicht als aussagekräftig bezeichnet werden, da die Differenz zwischen den mit Wildtypen infizierten Pflanzen schon bei 10 Seitenwurzeln lag (bei durchschnittlich gezählten 10-20 Wurzeln), und die Fehlerbalken der Standardabweichung (siehe Abb. 5.6) teils sehr groß sind. Die Anzahl

der in dieser Serie gemessenen Pflanzen lag bei Guy11: $n=30$, ΔKu80 : $n=26$, $\Delta\text{Zf1-6}$: $n=33$, $\Delta\text{Nt1-1}$: $n=27$.

Im Verlauf der zweiten Serie wurden für die beiden Wildtypen Wurzellängen von 8,54 cm bei mit Guy11 bzw 7,67 cm bei mit ΔKu80 infizierten Primärwurzeln gemessen. Die Länge der mit $\Delta\text{Zf1-6}$ infizierten Wurzeln war mit 7,18 cm kürzer als die ΔKu80 Wurzeln. In dieser Serie wurden neben der $\Delta\text{Nt1-1}$ Mutante auch noch die beiden weiteren Transformanten $\Delta\text{Nt1-6}$ und $\Delta\text{Nt1-7}$ getestet. Die $\Delta\text{Nt1-1}$ Mutante hatte wieder die längsten Primärwurzeln mit durchschnittlich 8,73 cm. Allerdings galt dies für die beiden anderen ΔNt1 Mutanten nicht. $\Delta\text{Nt1-6}$ lag mit einer Länge der infizierten Wurzeln von 7,45 cm sogar noch unter der Länge der ΔKu80 infizierten Wurzeln, während $\Delta\text{Nt1-7}$ infizierte Wurzeln mit einer Länge von 8,24 cm zwischen ΔKu80 und Guy11 anzusiedeln sind. In dieser Serie waren also die mit $\Delta\text{Zf1-6}$ infizierten Wurzeln am kürzesten (in Serie eins im Mittelfeld zwischen den beiden Wildtypen), während die $\Delta\text{Nt1-1}$ Wurzeln erneut am längsten waren. Allerdings waren die Wurzeln der beiden anderen ΔNt1 -Mutanten deutlich kürzer als $\Delta\text{Nt1-1}$ und im Bereich der Wildtypen. Was hier insbesondere auffällt ist, dass die Wurzeln insgesamt deutlich länger waren als in Serie eins. Dieses Phänomen ist durchweg zu beobachten, egal mit welchem *M. oryzae* Stamm infiziert wurde. So lagen die Wurzellängen in Serie eins zwischen 4,9 und 5,6 cm. In Serie zwei hingegen waren Längen zwischen 7,13 und 8,7 cm zu verzeichnen. Da die Versuchsdurchführung absolut identisch war und ebenfalls die gleiche Reisvarietät CO39 verwendet wurde, lässt sich dies nicht erklären. Da dies aber alle Reispflanzen betraf, ungeachtet der Stämme, mit denen diese infiziert wurden, und in parallel mitgeführten Negativkontrollen (exakt gleich behandelte Pflanzen ohne Pilzinokulation) dieselbe Tendenz festgestellt wurde, ist dies wohl auf einen unbekanntem Faktor zurückzuführen, der aber die Versuchsdurchführung nicht beeinträchtigt, weil er sich jeweils in gleichem Maße auswirkte.

Für die Gesamtlänge aller Wurzeln, die hier anstatt der Anzahl an Lateralwurzeln bestimmt wurde, waren die Ergebnisse nahezu identisch zu den Ergebnissen der Primärwurzellänge. Dies liegt daran, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle die infizierte Primärwurzel die längste Wurzel war.

Die Anzahl der sproßbürtigen Wurzeln lag wieder bei allen Gruppen sehr dicht zusammen. So hatten die mit den Wildtypen Guy11 und ΔKu80 infizierten Pflanzen durchschnittlich 10,39 bzw. 10,09 Wurzeln. $\Delta\text{Zf1-6}$ infizierte Pflanzen hatten 10,11 Wurzeln, während der Durchschnitt bei $\Delta\text{Nt1-1}$ Mutanten exakt bei 10 liegt. Die in dieser Serie erstmals ermittelten $\Delta\text{Nt1-6}$ und $\Delta\text{Nt1-7}$ Transformanten lagen mit einer Wurzelanzahl der infizierten Pflanzen von 9,73 und 9,88 etwas niedriger. Insgesamt ist in dieser Serie zu verzeichnen, dass die $\Delta\text{Zf1-6}$ infizierten Wurzeln im Gegensatz zu Serie eins nicht die geringste Anzahl an sproßbürtigen Wurzeln aufweisen, sondern fast identisch mit dem ΔKu80 Wildtypen sind.

Die Anzahl der in Serie 2 ausgewerteten Pflanzen lag bei: Guy11: n= 23, Δ Ku80: n=44, Δ Zf1: n= 35, Δ Nt1-1: n= 22, Δ Nt1-6: n= 47, Δ Nt1-7: n= 33.

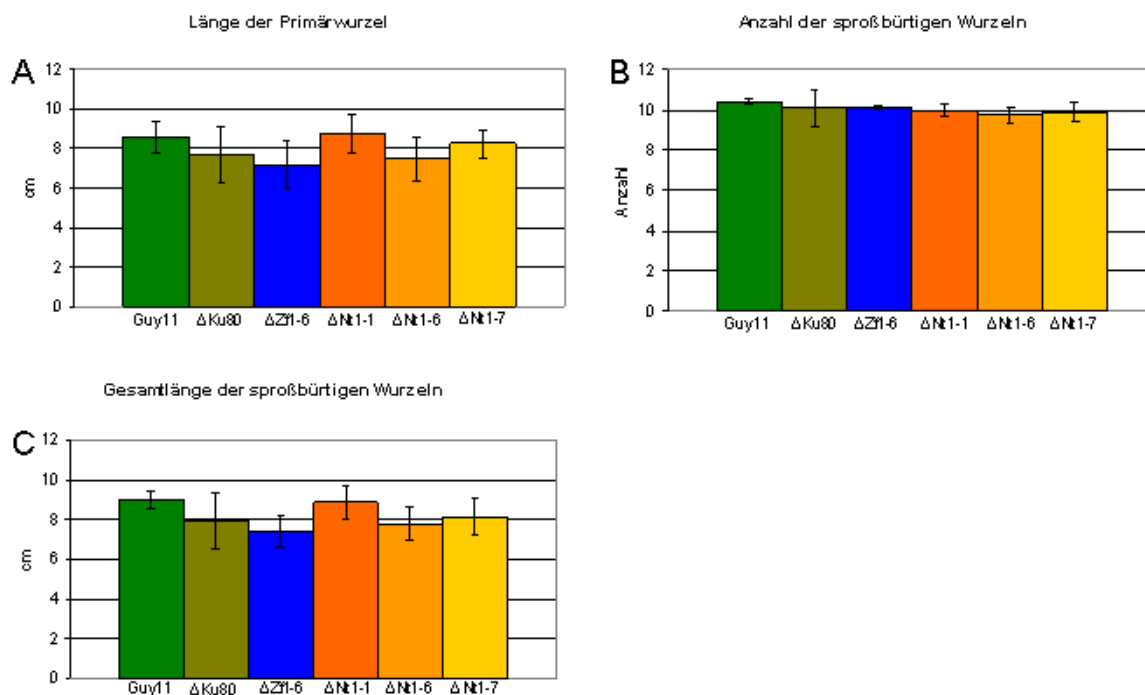


Abb. 5.7: Morphologie der mit Δ Zf1 und Δ Nt1 infizierten Reiswurzeln in Serie 2. Gemessen bzw. gezählt wurden die Länge der infizierten Primärwurzel (A), die Anzahl der sproßbürtigen Wurzeln (B) und die Länge des Wurzelballens insgesamt (C). A: Die mit Δ Zf1-6 infizierten Wurzeln waren in dieser Serie die kürzesten Wurzeln, während die mit Δ Nt1-1 infizierten Wurzeln am längsten waren. Die beiden anderen Nt1-Transformanten waren jedoch deutlich kürzer. B: Die Anzahl der Wurzeln war bei allen fast identisch. C: Die Gesamtlänge aller Wurzeln einer Pflanze unterscheidet sich nur unwesentlich von der Länge der infizierten Primärwurzel, das Verhältnis der Stämme zueinander ist wie in A. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Anzahl der in Serie 2 ausgewerteten Pflanzen lag bei: Guy11: n= 23, Δ Ku80: n=44, Δ Zf1: n= 35, Δ Nt1-1: n= 22, Δ Nt1-6: n= 47, Δ Nt1-7: n= 33.

Betrachtet man beide Serien zusammen, so ist kein signifikanter Unterschied zwischen den mit einem Wildtyp oder den mit einem Ko-Stamm infizierten Wurzeln erkennbar. Zwar hatten in beiden Serien Pflanzen, die mit Δ Nt1-1 infiziert wurden, die längsten Wurzeln. Dies wurde durch die beiden anderen Δ Nt1-Mutanten allerdings nicht bestätigt.

5.3.2 Phänotypisierung der Blattinfektion

5.3.2.1 Auswirkung auf die Appressorienbildung und die Frühphase der Infektion

Neben der Wurzelinfektion wurde auch getestet, ob die Knockout-Stämme einen Phänotyp während der Blattinfektion aufweisen. Dazu wurde als erster Schritt überprüft, ob die Knockout-Stämme ein unterschiedliches Verhalten bei der Appressorienbildung zeigen. Dabei handelt es sich um die erste sichtbare Infektionsstruktur, und eine Beeinträchtigung der Appressorienbildung würde natürlich den weiteren Verlauf der Blattinfektion massiv beeinträchtigen. Diese Appressorienbildung wurde zuerst auf einer künstlichen Folie getestet, welche eine hydrophobe Oberfläche besitzt und für die Ausbildung von Appressorien ausreichen sollte. Allerdings waren die Ergebnisse auf dieser Folie nicht konstant. So konnten in ein und derselben Probe Areale entdeckt werden, in denen fast alle Sporen Appressorien bildeten, und in anderen Bereichen waren kaum oder gar keine Sporen mit Appressorien zu sehen. Zugleich waren auch innerhalb der Stämme, auch bei den Wildtypen, große Schwankungen zwischen einzelnen Proben zu erkennen. Deshalb wurde die Appressorienbildung im Weiteren auf Zwiebelhäutchen getestet. Dieses lebende Blattgewebe hat den Vorteil, dass es sehr gut zu präparieren ist und konstant gute reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zudem ist es gut zu mikroskopieren und benötigt, im Gegensatz zu Reis, keine langen Wachstumszeiten. Die mit Sporensuspension inokulierten Proben wurden 24 Stunden nach der Inokulation ausgezählt. Insgesamt wurden für Guy11 13, für Δ Ku80 15, für Zf1-6 15, für Δ Nt1-1 12 und für Δ Nt1-6 und für Δ Nt1-7 jeweils 8 einzelne Proben ausgezählt. Dabei zeigte sich, dass bei allen Stämmen auf der Zwiebelepidermis ca. 90 % der Sporen ein Appressorium bilden. Guy11 und Δ Zf1-6 Sporen bildeten in 94 % der Fälle Appressorien. Δ Ku80 und Δ Nt1-1 Sporen lagen mit 91 bzw 90 % Appressorienbildung nur unwesentlich dahinter und auch die beiden anderen Δ Nt1-Transformanten Δ Nt1-6 und Δ Nt1-7 folgten mit 89 und 88 % sehr dicht auf (siehe Abb. 5.8).

Bei einer mikroskopischen Betrachtung von infizierter Zwiebelepidermis nach 48 Stunden wurde festgestellt, dass die Knockout- Stämme Δ Zf1-6 wie auch Δ Nt1-1 genauso wie die Wildtypen dazu in der Lage waren invasive Hyphen innerhalb der Zellen zu bilden (siehe Abb 5.9).

In diesen frühen Phasen der Blattinfektion konnten also keine Unterschiede zwischen den Wildtypstämmen und den Knockout- Stämmen gefunden werden.

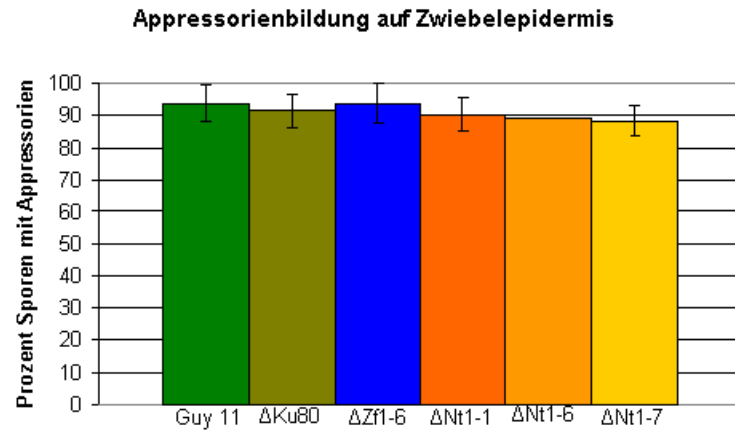


Abb. 5.8: Appressorienbildung der $\Delta Zf1$ und $\Delta Nt1$ Stämme auf Zwiebelepidermis. Bei allen getesteten Stämmen bildeten ca. 90% der Sporen Appressorien aus. Nach der Inokulation der Zwiebelepidermis mit Sporensuspension wurden nach 24 h die Appressorien ausgezählt. Neben den Deletionsstämmen wurden auch die beiden Wildtypen Guy11 und $\Delta Ku80$ getestet. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder. Anzahl ausgezählter Proben: Guy11: n= 13, $\Delta Ku80$: n= 15, $\Delta Zf1$: n= 15, $\Delta Nt1-1$: n= 12, $\Delta Nt1-6$: n= 8, $\Delta Nt1-7$: n= 8

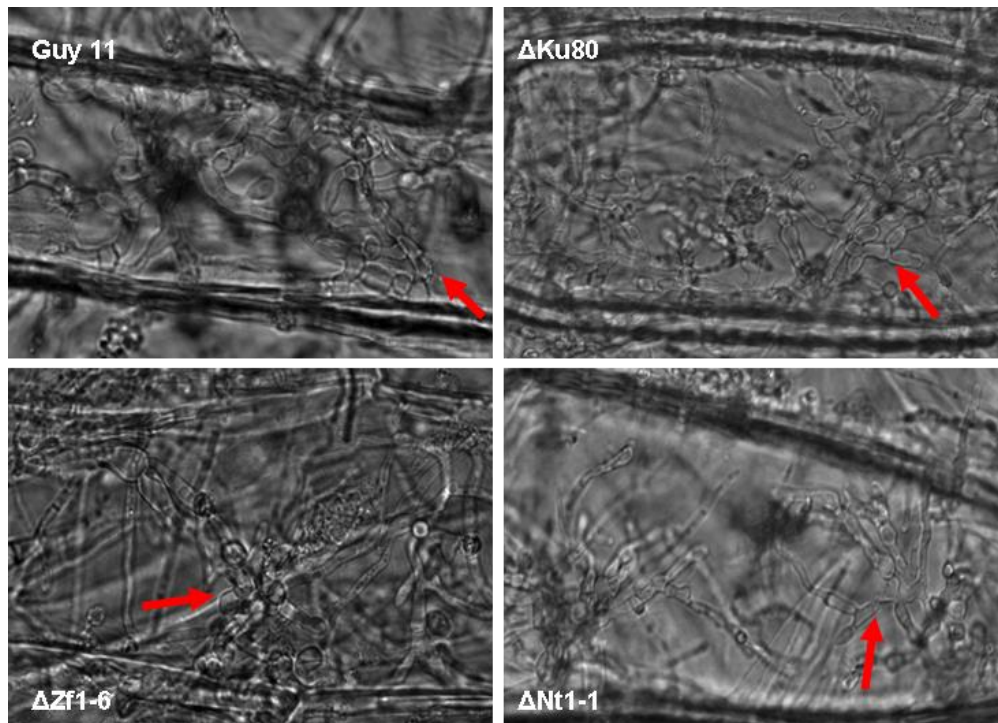


Abb. 5.9: Mikroskopaufnahmen von mit $\Delta Zf1$ und $\Delta Nt1$ infizierter Zwiebelepidermis 48 Stunden nach der Inokulation. Auch die Deletionsstämmen sind in der Lage invasive Hyphen auszubilden. Die roten Pfeile markieren invasive Hyphen in den Zwiebelzellen.

5.3.2.2 Auswirkung auf die Infektion von Reispflanzen

Um den weiteren Verlauf der Blattinfektion zu überprüfen, wurden Blattinfektionsversuche durchgeführt. Dazu wurden Reispflanzen mit einer Sporensuspension der einzelnen Stämme inokuliert und nach 4 Tagen überprüft, ob und in welchem Ausmaß die

Blätter der Pflanzen Läsionen aufwiesen. Auch hier wurden zwei Serien durchgeführt, wobei in der ersten Serie die Pflanzen mit den beiden Wildtypen bzw. $\Delta Zf1-6$ sowie $\Delta Nt1-1$ inokuliert wurden. In der zweiten Serie wurden jeweils noch die beiden anderen $\Delta Nt1$ - Mutanten mitgetestet. Jede Serie bestand aus drei Versuchsreihen, in welchen pro *M. oryzae*-Stamm jeweils fünf Pflanzen inokuliert wurden. Somit wurden jeweils 30 Pflanzen mit Guy11, $\Delta Ku80$, $\Delta Zf1-6$ und $\Delta Nt1-1$ Sporen infiziert und verglichen. Mit den beiden Mutanten $\Delta Nt1-6$ und $\Delta N1-7$ wurden je 15 Pflanzen infiziert. Um die große Bandbreite der Infektionsintensität zu zeigen, sind in Abbildung 5.10 und 5.11 einmal die Blätter mit den stärksten und die Blätter mit den schwächsten *M. oryzae* Infektionsmerkmalen gezeigt. Eine reine Verfärbung der Blätter, welche in gleichem Maß auch bei nur mit Wasser inokulierten Negativkontrollen auftrat, wurde hierfür nicht gewertet. Für die am schwächsten infizierten Blätter wurden aus allen fotografierten Blättern diejenigen ausgewählt, welche die wenigsten Läsionen aufwiesen. Blätter, die überhaupt keine Infektionsmerkmale zeigten, wurden nicht berücksichtigt. In den Abbildungen ist zu sehen, dass alle Stämme eindeutig in der Lage sind, Reispflanzen zu infizieren. Auch in der Stärke der Infektion sind keine gravierenden Unterschiede zu sehen. Beim Vergleich der Läsionen in Abbildung 5.10 ist gut zu erkennen, dass die Grundform der Läsionen gleich ist. Augenscheinlich führen die Knockouts zu keinem veränderten Infektionsverhalten der Stämme während der Blattinfektion.



Abb. 5.10: Mit den $\Delta Zf1$ und $\Delta Nt1$ Stämmen sowie den Wildtypen Guy11 und $\Delta Ku80$ infizierte Reisblätter. Die Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension besprüht und die Blätter nach vier Tagen geerntet. Hier sind jeweils die Blätter mit den stärksten Infektionsmerkmalen abgebildet. Alle getesteten Stämme sind in der Lage Reispflanzen zu infizieren. Auch im Ausmaß der Infektion ist kein gravierender Unterschied zwischen den Stämmen erkennbar.



Abb. 5.11: Mit den $\Delta Zf1$ und $\Delta Nt1$ -Stämmen sowie den Wildtypen Guy11 und $\Delta Ku80$ infizierte Reisblätter. Die Pflanzen wurden mit einer Sporensuspension besprüht und die Blätter nach 4 Tagen geerntet. Es sind die Blätter mit den schwächsten Infektionsmerkmalen abgebildet. Auf der rechten Seite sind zum besseren Vergleich Bereiche dieser Blätter mit Läsionen vergrößert dargestellt.

5.4 Lokalisierung der Proteine Zf1, Nt1, Llr1 und Nud1

Da die deletierten Gene für mögliche Effektorproteine kodieren, sollte die Sekretion, die selbstständige Wiederaufnahme des Proteins in die Wirtszelle und die Lokalisierung innerhalb der Zelle getestet werden. Durch die *in silico*-Untersuchungen ist bekannt, dass für beide Proteine ein Signalpeptid vorausgesagt wird, sowie dass beide möglicherweise im Zellkern lokalisieren. Diese Voraussage eines Zellkern lokalisierenden sekretierten Proteins ist eine sehr interessante Kombination und lässt über ein mögliches Effektorprotein, das in der Wirtszelle Einfluss auf zum Beispiel die Genexpression des Wirtes nimmt, spekulieren. Um dies zu bestätigen, wurden unterschiedliche Versuche unternommen. So wurden beide Proteine mit und ohne Signalpeptid an GFP-fusioniert in *N. benthamiana* Blättern exprimiert. Um eine mögliche Kernlokalisierung zu zeigen, wurden sie ebenfalls an GFP-fusioniert und ohne Signalpeptid in *A. nidulans* exprimiert. Darüber hinaus wurde in einem *yeast signal sequence trap* getestet, ob die vorausgesagten Signalpeptide funktionsfähig sind.

5.4.1 Expression in *N. benthamiana* Blättern

Es wurde jeweils der ORF der beiden ausgeschalteten Gene einmal mit und einmal ohne Signalpeptid in den Vektor pCGFP-RR kloniert. Damit wurde eGFP C-terminal an den ORF fusioniert und somit in den transformierten Zellen ein Fusionsprotein aus den Zielproteinen und dem grün fluoreszierenden GFP exprimiert. So konnte die Lokalisierung der Proteine in lebenden Zellen untersucht werden. Gleichzeitig vermittelte das

Plasmid zur Kontrolle eine cytoplasmatische dsRED-Expression, so dass es in den Zellen zu einer roten Fluoreszenz innerhalb des Cytoplasmas und durch eindiffundieren auch im Kern kam. Diese Konstrukte wurden mit *A. tumefaciens* transient in *N. benthamiana* transformiert und dort mikroskopiert. In Abbildung 5.12 und 5.13 sind Aufnahmen transformierter *N. benthamiana* Blätter zu sehen. Diese wurden an einem Konfokalmikroskop aufgenommen. Für das Zf1 Protein ist ein deutlicher Unterschied der grünen Fluoreszenz zwischen dem ORF mit und ohne Signalpeptid zu erkennen. Wie dsRED auch, ist das Fusionsprotein ohne Signalpeptid im gesamten Cytoplasma der Zelle lokalisiert. Daneben diffundieren sowohl dsRED als auch das Fusionsprotein in den Zellkern ein. Diese Kolo-kalisierung mit dsRED ist einerseits nicht verwunderlich, da dem Protein das Signalpeptid fehlt, allerdings könnte es bei einer möglichen Kernlokalisierung trotzdem in dem Zellkern der Zellen konzentriert werden.

Wird das Protein mit dem Signalpeptid exprimiert, ist die Lokalisierung der grünen Fluoreszenz deutlich anders als die Lokalisierung der dsRED-Fluoreszenz. Grüne Fluoreszenz ist um den Zellkern herum zu sehen, in Strukturen, die an endoplasmatisches Retikulum erinnern. Weiter ist punktförmige Fluoreszenz ebenfalls um den Zellkern, aber auch im Cytoplasma der Tabakzellen beobachtet worden. Bei diesen punktförmigen Strukturen könnte es sich um sekretorische Vesikel handeln, welche das Protein aus dem Zellinneren zur Membran transportieren. Im Bereich des Zellkerns ist hier überhaupt keine grüne Fluoreszenz zu erkennen (Abbildung 5.12), auch im Cytoplasma ist keine GFP-Fluoreszenz zu sehen.

In Abbildung 5.13 sind *N. benthamiana* Zellen gezeigt, welche das Nt1-GFP Fusionsprotein exprimieren. In diesem Fall sind zwischen den Proteinen mit und ohne Signalpeptid kaum Unterschiede zu erkennen. In beiden Fällen ist die GFP-Fluoreszenz innerhalb des Zellkerns stärker, ausserhalb des Zellkerns schwächer ausgeprägt als die dsRED-Fluoreszenz. Die gegenüber dem eindiffundierten dsRED stärkere GFP-Fluoreszenz im Zellkern könnte also auf eine gezielte Kernlokalisierung von Nt1 hinweisen. Allerdings ist ebenfalls deutlich zu erkennen, insbesondere bei dem Konstrukt ohne Signalpeptid, dass im gesamten Cytoplasma grüne Fluoreszenz vorhanden ist. Somit ist das Fusionsprotein also zumindest zum Teil mit dsRED kolo-kalisiert. Eine reine Kernlokalisierung des Fusionsproteins scheint somit fraglich. Ebenfalls fraglich ist dabei, ob das Fusionsprotein mit Signalpeptid gar nicht aus der Zelle transportiert wird, das Signalpeptid also nicht funktionstüchtig ist, oder ob es selbstständig wieder in die Zelle eindringt.

Da es sich bei Zf1 und Nt1 um mögliche im Zellkern lokalisierte Proteine handelt, wurden zum Vergleich auch die beiden anderen Gene *Nud1* und *Llr1*, die beide nicht im Zellkern vermutet werden, gleichermaßen kloniert und transformiert. Die Abbildungen 5.14 und 5.15 zeigen Konfokalmikroskopaufnahmen mit den Konstrukten transformierter Zellen. Dabei ist in Abbildung 5.14 zu sehen, dass die Verteilung von Llr1-GFP oh-

ne Signalpeptid zwar im Wesentlichen dem cytoplasmatischen dsRED entspricht, allerdings mit Ausnahme des Zellkerns. Hier ist nahezu ausschließlich dsRED-Fluoreszenz zu erkennen. Allerdings ist in dem Überlagerungsbild nirgendwo GFP-Fluoreszenz alleine zu erkennen. Sie ist überall mit der für Cytoplasma kennzeichnenden dsRED-Fluoreszenz gemischt, weshalb in der Überlagerung gelbe Farbe zu sehen ist. Es scheint also so, dass Llr1 ohne Signalpeptid im Cytoplasma lokalisiert, jedoch nicht in den Zellkern diffundiert. Mit Signalpeptid ist die GFP-Fluoreszenz allerdings sehr stark auf punktförmige Bereiche konzentriert. Es gibt keine größeren zusammenhängenden grün fluoreszierenden Strukturen, sondern ausschließlich mehr oder weniger starke Ansammlungen von einzelnen, an Vesikel erinnernden Punkten. Diese Vesikel sind sowohl um den Zellkern anzutreffen, als auch im restlichen Cytoplasma der Zelle. Dabei ist bemerkenswert, dass die grüne Fluoreszenz und die rote Fluoreszenz nicht an den gleichen Stellen zusammen erscheinen, sondern getrennt voneinander sind. Dies ist besonders in den Teilabbildungen J-L der Abbildung 5.14 zu sehen. Hierbei handelt es sich um eine Aufnahme des Cytoplasmas einer Epidermiszelle. Die GFP-Fluoreszenz ist hier in der gesamten Bildebene in Vesikeln konzentriert angeordnet. In der dsRED-Aufnahme sieht man eine Vielzahl an runden, nicht fluoreszierenden Flecken. Diese werden in der Überlagerungsaufnahme zu einem großen Teil von grüner Fluoreszenz ausgefüllt, was zeigt, dass diese Bereiche mit dem Llr1-GFP Fusionsprotein kein Cytoplasma enthalten.

Nud1-GFP-Fluoreszenz hingegen sieht komplett anders aus: Wie in Abb 5.15 zu sehen, ist die GFP-Fluoreszenz hier in der kompletten Zelle mit dem dsRED Protein kolokalisiert und ist im gesamten Cytoplasma, sowie im Zellkern zu sehen. Dies gilt sowohl für das Fusionsprotein mit Signalpeptid, wie auch ohne Signalpeptid.

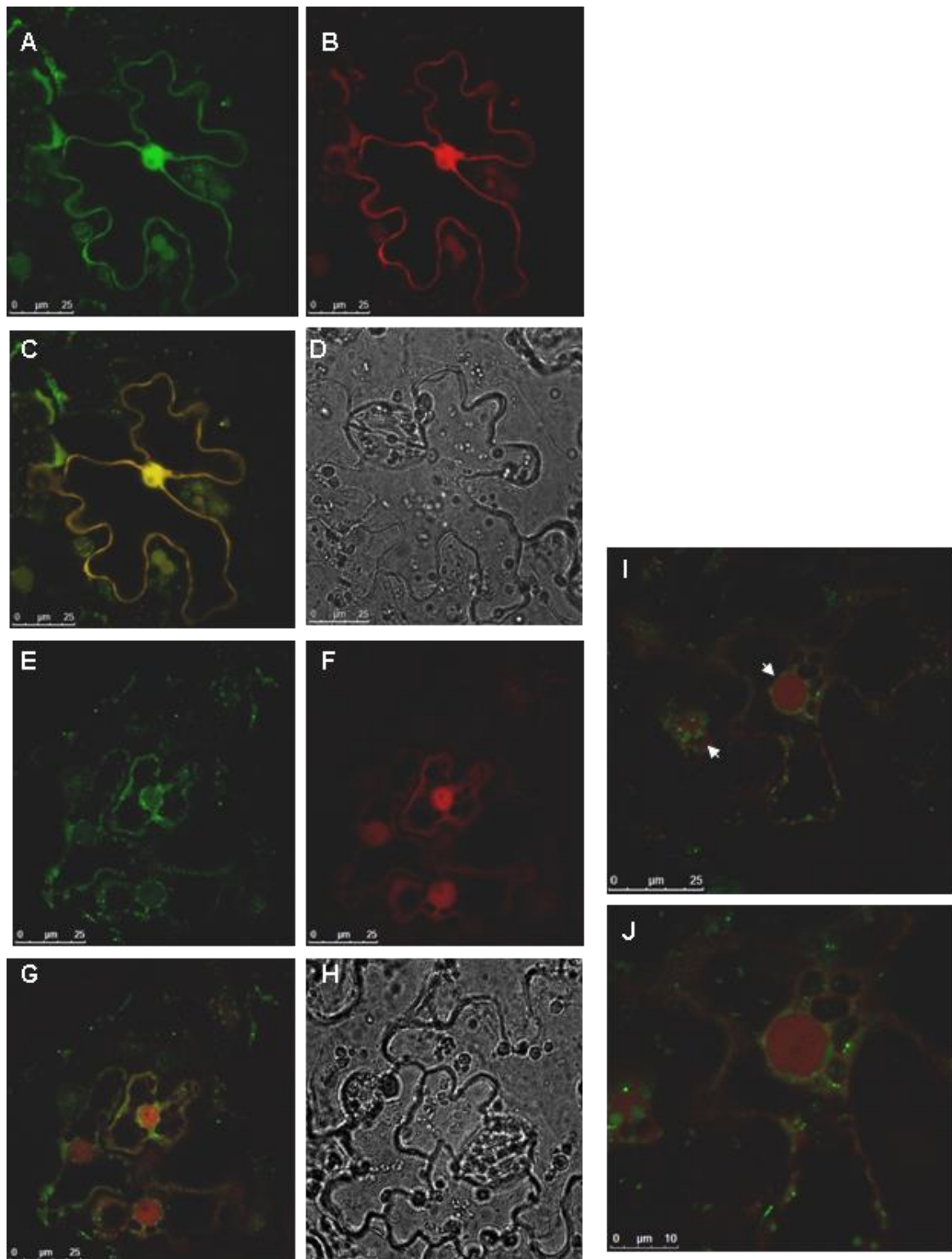


Abb. 5.12: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit dem Zf1-GFP transformierten repräsentativen *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die Blätter wurden 3 Tage nach der *Inokulation mit Agrobacterium tumefaciens* betrachtet. Zu sehen ist das Fusionsprotein ohne Signalpeptid (A), sowie mit Signalpeptid (E). Als Kontrolle das im Cytoplasma und Kern lokalisierende dsRED (B,F) eine Überlagerung der Fluoreszenzen (C,G), sowie eine Hellfeldaufnahme (D,H). In I und J Fluoreszenzüberlagerung einer anderen mit Zf1 mit Sp transformierten Zelle. Ohne Signalpeptid kolokalisiert Zf1 mit dsRED im Cytoplasma und Zellkern (A-C). Mit Signalpeptid lokalisiert Zf1 in ER-ähnlichen Strukturen um den Zellkern, sowie in Vesikeln (A,I,J). Pfeile markieren Zellkerne.

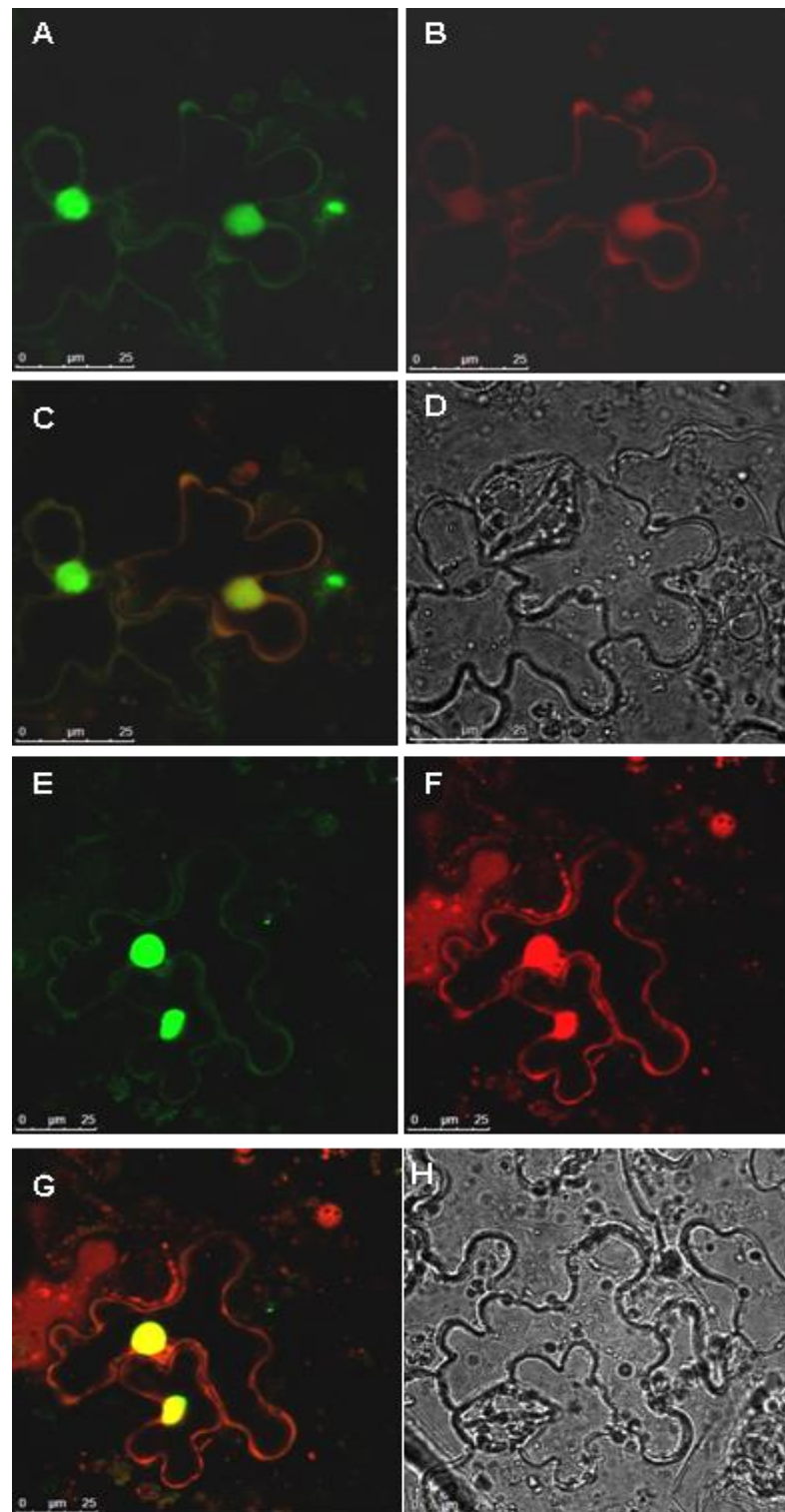


Abb. 5.13: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit Nt1-GFP transformierten repräsentativen *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die Blätter wurden drei Tage nach der Inokulation mit *Agrobacterium tumefaciens* betrachtet. Zu sehen ist das Fusionsprotein ohne Signalpeptid (A), sowie mit Signalpeptid (E). Als Kontrolle das im Cytoplasma und Kern lokalysierende dsRED-Protein (B,F) eine Überlagerung der Fluoreszenzen (C,G), sowie eine Hellfeldaufnahme (D,E). Sowohl mit als auch ohne Signalpeptid lokalysiert das Nt1-GFP im Zellkern und in geringerem Maß auch im Cytoplasma (A,E). dsRED lokalysiert im Cytoplasma und diffundiert in den Zellkern (B,F).

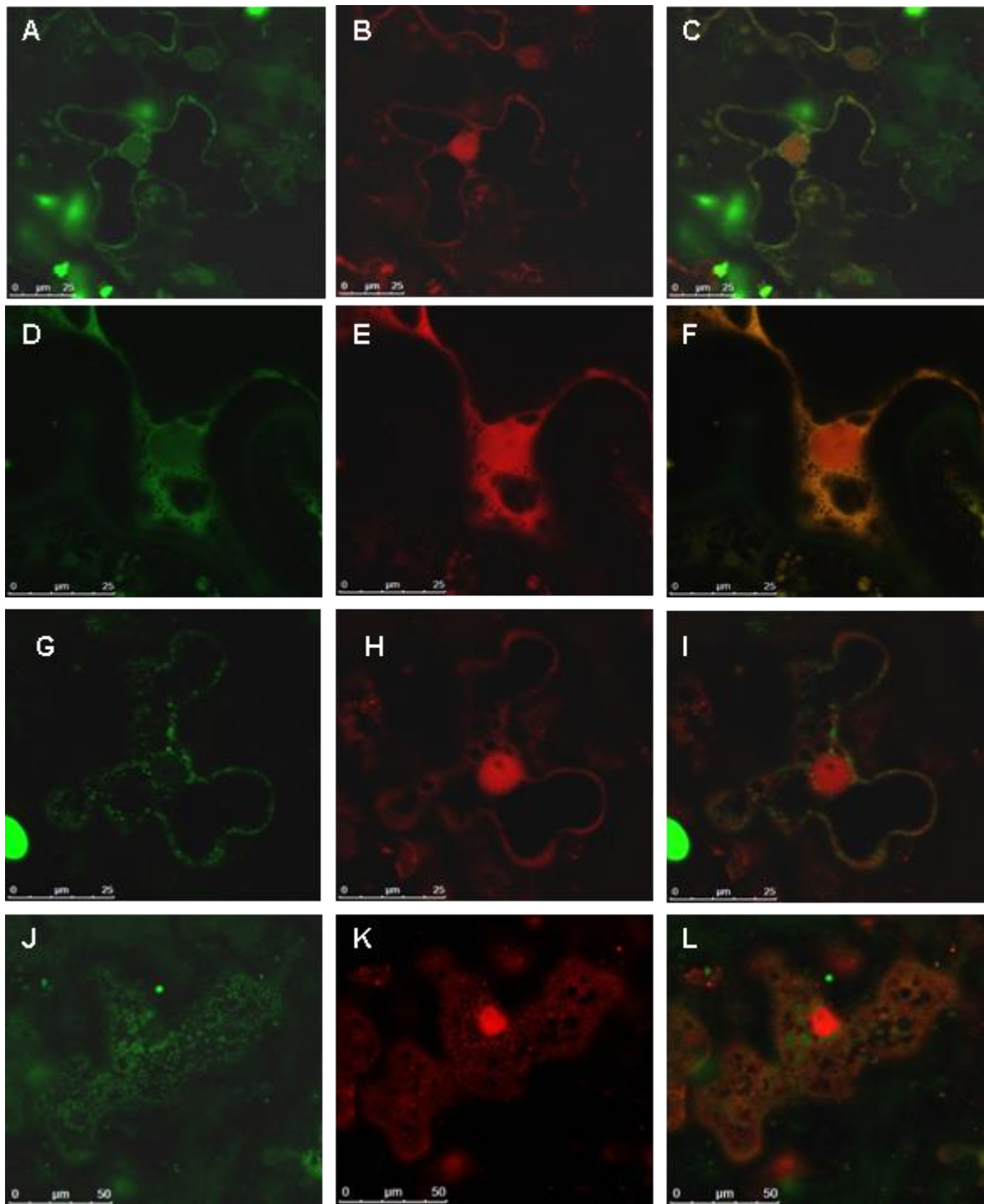


Abb. 5.14: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit Llr1-GFP transformierten repräsentativen *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die Blätter wurden 3 Tage nach der Inokulation mit *A. tumefaciens* betrachtet. Zu sehen ist das Fusionsprotein ohne Signalpeptid (A,D), das Fusionsprotein mit Signalpeptid (G,J), dsRED Fluoreszenz im Cytoplasma und dem Zellkern (B,E,H,K), sowie jeweils eine Überlagerung der Fluoreszenzbilder (C,F,I,L). LIR1 ohne Signalpeptid kolokalisiert mit dsRED, allerdings ohne in den Zellkern zu diffundieren (C). In einer Detailaufnahme eines Zellkerns (D-E) ist zu erkennen, dass die GFP-Fluoreszenz mit der dsRED ohne den Zellkern übereinstimmt. Mit Signalpeptid lokalisiert Llr1 in Vesikeln, die um den Zellkern (G) und im Cytoplasma der Zellen (J) zu sehen sind. Es findet keine Kolokalisierung mit dsRED statt (I,L).

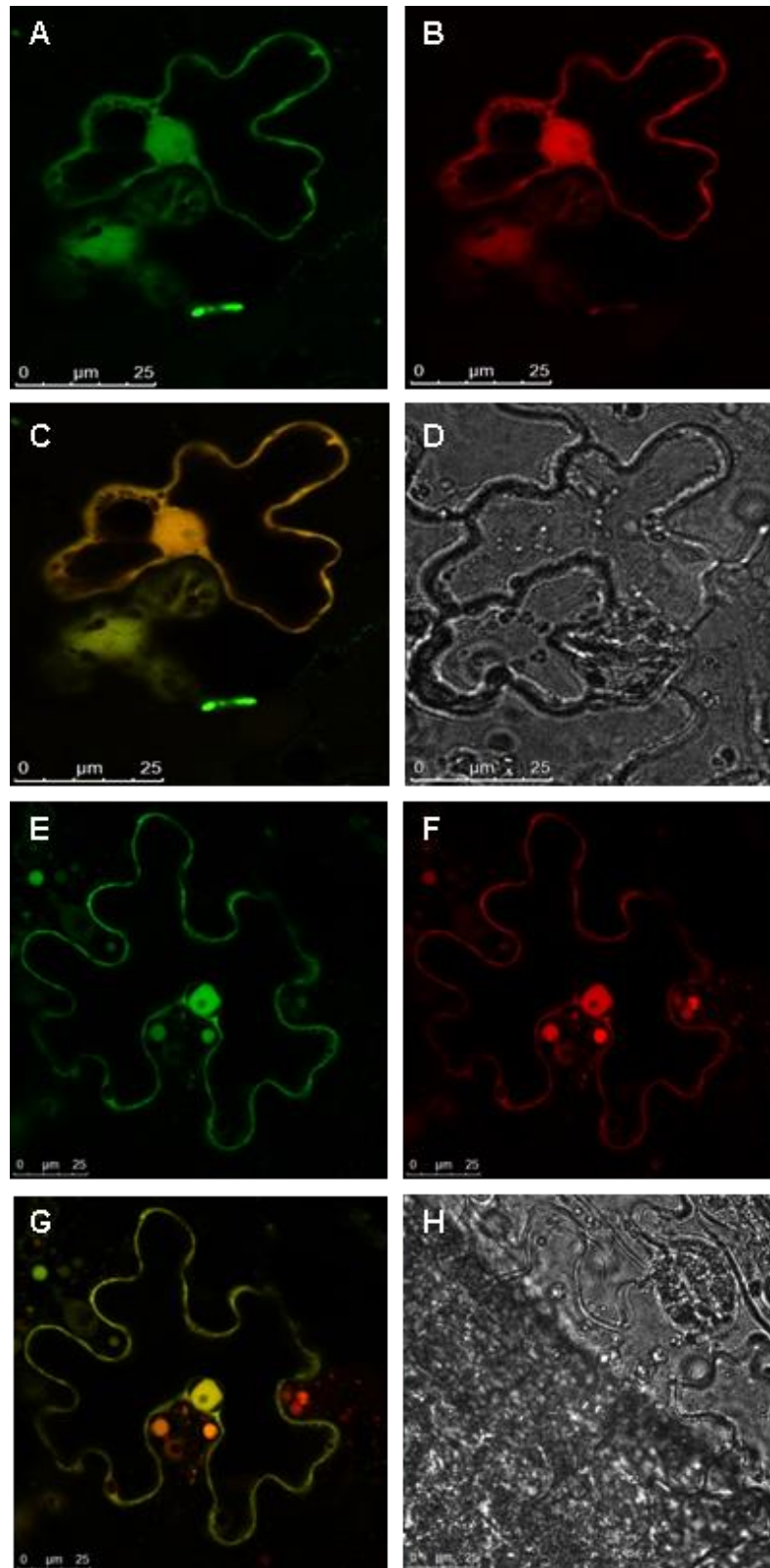


Abb. 5.15: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von mit Nud1-GFP transformierten repräsentativen *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die Blätter wurden drei Tage nach der Inokulation mit *Agrobacterium tumefaciens* betrachtet. Zu sehen ist das Fusionsprotein ohne Signalpeptid (A), sowie mit Signalpeptid (E). Als Kontrolle das im Cytoplasma und Kern lokalisierende dsRED-Protein (B,F), eine Überlagerung der Fluoreszenzen (C,G), sowie eine Hellfeldaufnahme (D,H). Sowohl mit als auch ohne Signalpeptid ist die GFP-Fluoreszenz mit der dsRED-Fluoreszenz kolokalisiert.

5.4.2 Lokalisierung von Zf1 und Nt1 während der Infektion

Weiterhin wurde auch der Versuch unternommen, die Lokalisierung der Proteine während der Infektion direkt in *M. oryzae* zu untersuchen. Hierzu wurde der ORF, mit Signalpeptid fusioniert, an mRFP in *M. oryzae* transformiert. In diesem Konstrukt (das verwendete Plasmid war pSK-Tox-mRFP) ist das Gen unter Kontrolle des konstitutiven ToxA Promotors. Zur Selektion enthält es eine Basta-Resistenzkassette. Das Konstrukt wurde durch Protoplastentransformation in *M. oryzae* transformiert und auf Selektionsplatten gewachsene Kolonien wurden durch Southern Blot mit einer Sonde gegen die Basta-Resistenzkassette auf das Vorhandensein der Bastaresistenz, und somit auf die Integration des Konstruktes, getestet. Anschließend wurden mit diesen Stämmen Zwiebelepidermisinfektionen durchgeführt und diese nach 48 Stunden mikroskopiert und auf Fluoreszenz innerhalb der Pflanzenzellen untersucht. Sowohl im Fall von mit Nt1-mRFP transformierten, als auch im Fall von mit Zf1-mRFP transformierten Stämmen, konnte keine mRFP-Fluoreszenz in den infizierten Zwiebelepidermiszellen festgestellt werden. In beiden Fällen traten nur identische Formen von Autofluoreszenz auf (Ergebnisse nicht gezeigt), und es konnte keine spezifische Fluoreszenz festgestellt werden. Für Nt1 erscheint dies durch die Ergebnisse der anderen Versuche (siehe 5.4.3) folgerichtig zu sein, während es für Zf1 im ersten Moment etwas verwundert. Darauf jedoch wird in der Diskussion noch eingegangen werden (Kapitel 6.4).

5.4.3 Funktionsfähigkeit des Signalpeptides von Zf1 und Nt1

Zum Test, ob es sich bei den deletierten Proteinen Zf1 und Nt1 um sekretierte Proteine handelt, wurden sie in einem ysst-Versuch getestet. Dazu wurden die kompletten ORF fusioniert an das *suc2*-Gen, eine Hefeinvertase, in einem Δ *suc2*-Hefestamm exprimiert. Enthalten die ORF, ein funktionales Signalpeptid, so wird das Fusionsprotein mit der Invertase sekretiert. Diese so sekretierte Invertase spaltet die Saccharose im Selektionsmedium und der Stamm kann wachsen. Ohne Signalpeptid erfolgt keine Sekretion der Invertase und damit auch kein Wachstum. In Abbildung 5.16 ist das Ergebnis dieser ysst-Versuche gezeigt. Hefekolonien, die mit dem Zf1-*suc2* Konstrukt transformiert sind, können auf Saccharose-haltigem Medium wachsen. Es ist auch zu erkennen, dass diese einen typischen Hof um sich haben, was durch die sekretierte Invertase zu erklären ist. Diese spaltet Saccharose, die dann natürlich nicht nur von der sekretierenden Kolonie, sondern auch von in unmittelbarer Umgebung wachsenden, nicht transformierten Kolonien genutzt werden kann. Das Signalpeptid von Zf1 ist also in der Lage, das Fusionsprotein aus der Zelle zu transportieren. Dieses Ergebnis untermauert den deutlich zu sehenden Unterschied zwischen mit dem Vollprotein und ORF ohne Signalpeptid transformierten *N. benthamiana* Blättern.

Für Nt1 konnte dies nicht gezeigt werden. Auf Saccharose-Selektionsplatten ausplattierte transformierte Hefen wuchsen nicht zu Kolonien heran. Auf SD-Leucin Medium,

welches zur Selektion auf Vorhandensein des *ysst*-Plasmids dient, konnte jedoch Wachstum festgestellt werden. Dies zeigt, dass die Transformation an sich funktioniert hat und das fehlende Wachstum auf Saccharose-Medium nicht auf eine misslungene Transformation zurückzuführen sein kann, sondern das Signalpeptid von Nt1 in Hefe nicht funktioniert. Da auch in *N. benthamiana* keine Sekretion dieses Proteins festgestellt wurde, deutet dies stark darauf hin, dass Nt1 auch in *M. oryzae* nicht sekretiert wird. Um dies zu bestätigen wurde in einem weiteren Versuch nur das putative Signalpeptid von Nt1 in den Vektor pCGFP-RR kloniert und so an GFP fusioniert. Mit diesem Konstrukt transformierte *N. benthamiana* Blätter zeigten ebenfalls eine eindeutig cytoplasmatische GFP-Fluoreszenz. Die GFP-Fluoreszenz war identisch zu der dsRED-Fluoreszenz (Abbildung 5.16), was zeigt, dass das Signalpeptid in der Tat nicht funktionsfähig ist. Somit handelt es sich bei Nt1 offensichtlich nicht um ein sekretiertes Protein.

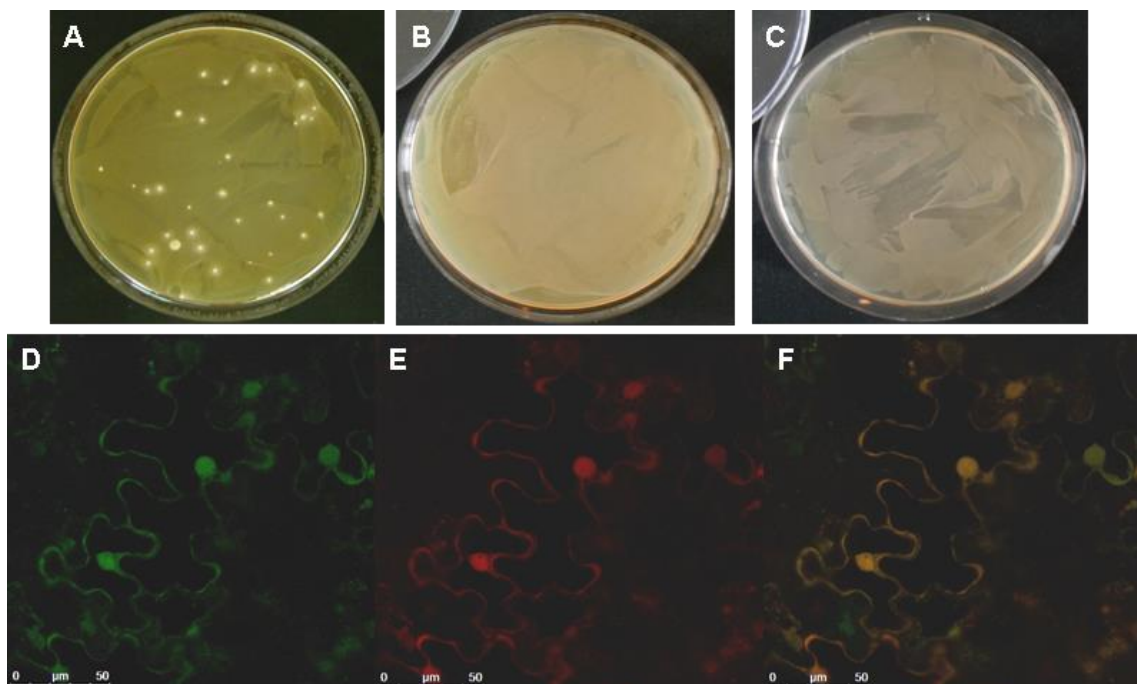


Abb. 5.16: Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Signalpeptids in Zf1 und Nt1.

A) Auf Saccharose-Selektionsmedium ausplattierte mit Zf1-suc2 transformierte Hefen des *ysst*-Versuchs. Es wachsen Hefekolonien heran, was anzeigt, dass das Signalpeptid von Zf1 funktional ist und das Fusionsprotein aus den Hefen transportiert. Der Hof um die Kolonien entsteht durch direkt benachbarte untransformierte Kolonien, die von der sekretierten Invertase profitieren. **B)** Mit Nt1-suc2 transformierte Hefen können auf dem Saccharose-Medium nicht wachsen, was zeigt, dass das Signalpeptid nicht funktionsfähig ist. **C)** Zum Vergleich: Nicht transformierte Hefen des verwendeten Stammes auf Saccharosemedium ausplattiert (**D,E,F**). Konfokalmikroskopische Aufnahme von mit dem an GFP fusionierten Signalpeptid von Nt1 transformierten repräsentativen *N. benthamiana* Epidermiszellen. Die Blätter wurden drei Tage nach der Inokulation mit *Agrobacterium tumefaciens* betrachtet. Das Fusionsprotein aus Signalpeptid und GFP (**D**) zeigt eine eindeutige Kolokalisation (**F**) mit dem im Cytoplasma und den Kern lokalisierenden dsRED (**E**).

5.4.4 Lokalisierung von Zf1 und Nt1 in *A. nidulans*

Um die mögliche Kernlokalisierung von Zf1 und Nt1 zu klären, wurden die ORF ohne das Signalpeptid fusioniert an GFP in *A. nidulans* transformiert. Bei *A. nidulans* handelt es sich ebenfalls um einen filamentösen Ascomyceten (wie *M. oryzae*), der eingesetzt wurde, da in ihm ein in unserem Labor etabliertes, gut funktionierendes und zuverlässiges Expressionssystem mit einem induzierbaren Promotor vorliegt. Es wurde zuvor schon erfolgreich eingesetzt, um die Kernlokalisierung eines Effektorproteins zu zeigen (Kloppholz et al., 2011). In dem verwendeten Plasmid pMT-sGFP steht das so entstehende Fusionsprotein unter Kontrolle des alcA-Promoters. Durch diesen Promoter der Alkoholdehydrogenase ist es möglich, die Expression des Fusionsproteins zu kontrollieren. In Glucose enthaltendem Medium wird der Promoter reprimiert und das Protein nicht exprimiert. In Glycerol enthaltendem Medium wird die Repression aufgehoben und das Protein exprimiert, während in threoninhaltigem Medium die Expression induziert wird. Transformierte *Aspergillus*-Sporen wurden in Minimalmedium mit der jeweiligen Kohlenstoffquelle angeimpft und über Nacht bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden sie an einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. In Abbildung 5.17 ist sowohl Zf1 als auch Nt1 Fluoreszenz im Cytoplasma der gekeimten *Aspergillus*-Sporen zu finden. Die vermutete Kernlokalisierung konnte also nicht bestätigt werden.

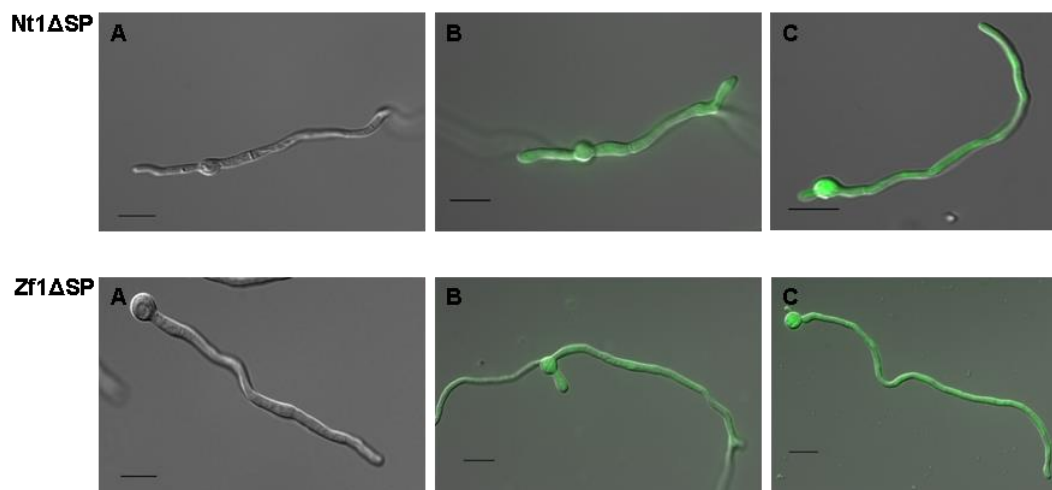


Abb. 5.17: Lokalisierung von Zf1 und Nt1 ohne Signalpeptid als Fusionsprotein mit GFP in gekeimten Sporen von *Aspergillus nidulans*. Die Expression erfolgt unter dem alcA-Promoter, wodurch eine Expressionskontrolle durch die Medienzusammensetzung erfolgen kann. A) Glucosehaltiges Medium, die Expression wird reprimiert, es ist keine Fluoreszenz zu sehen. B) Glycerolhaltiges Medium, die Repression ist aufgehoben und grüne Fluoreszenz ist im Cytoplasma zu sehen. C) Threoninhaltiges Medium, die Expression wird induziert. Es zeigt sich deutlich, dass die grüne Fluoreszenz im ganzen Cytoplasma zu sehen ist. Die Größenbalken stehen jeweils für 10µm.

5.4.5 Suche nach Interaktionspartnern von Zf1 und Nt1

Um mögliche Interaktionspartner von Zf1 und Nt1 zu finden, wurde mit beiden eine *yeast two hybrid* Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen einer Bachelorarbeit (Bachelorarbeit Jasmin Götzenberger, 2011) eine cDNA-Bank aus infiziertem Reis des Kultivars CO39 angelegt. Dazu wurde RNA aus mit *M. oryzae* infizierten Reisblättern sowie aus infizierten Reiszurzen isoliert. Daraus wurde cDNA hergestellt und mit dieser nach dem „matchmaker library construction and screening kit manual“ von Clontech eine cDNA-Bank hergestellt, die sowohl pilzliche als auch pflanzliche cDNA enthält. In einem anschließenden Praktikum wurde ebenfalls durch Jasmin Götzenberger das Mating mit dem Zf1-Protein durchgeführt. Vier im X- α Galactosidase Test als stark interagierend gefundene Klone wurden noch im Verlauf dieses Praktikums identifiziert. Im Anschluss wurden durch mich weitere 12 Klone ausgewählt und identifiziert (siehe Tabelle 5.1). Alle identifizierten möglichen Interaktionspartner waren pflanzlicher Herkunft. Aus diesen wurden die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine echte Interaktion ausgesucht. Da, wie in Tabelle 5.1 zu sehen ist, von den 16 sequenzierten Klonen 7 Klone die gleiche cDNA eines Ring-Finger Domänen Proteins und 3 Klone die gleiche Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase waren, wurden aus den 16 ausgewählten Klonen insgesamt nur 8 mögliche Interaktionspartner identifiziert. Das Ring-Finger Protein sowie das 3-Methylcrotonyl CoA carboxylase-Protein wurden ausgeschlossen, da in einem ebenfalls durchgeführten *yeast two hybrid* mit Nt1 diese Proteine genauso gefunden wurden, und sie somit höchst wahrscheinlich falsch positive Interaktionen darstellen (siehe Tabelle 5.2). Die Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase wurde ebenfalls ausgeschlossen, da sie in früheren y2h-Analysen anderer Mitglieder der Arbeitsgruppe schon als falsch positive Interaktionspartner aufgetreten waren. Somit blieben 4 mögliche Interaktionspartner übrig, die weiter getestet werden sollten. Es handelt sich dabei um ein Protein, welches eine PCNA-Domäne enthält, was für *proliferating cell nuclear antigen* steht. PCNA-Proteine sind Hilfsproteine bei der DNA-Replikation und umgeben während dieser die DNA. Weiter wurde eine Phosphoglucomutase gefunden, welches ein Enzym ist, das die Verschiebung von Phosphatgruppen innerhalb eines Glukosemoleküls katalysiert und an mehreren Stoffwechselwegen beteiligt sein kann. Auch ein Protein mit einer AACs ähnlichen Domäne wurde weiter getestet, da es sich dabei um eine uncharakterisierte Aceto-Acetyl CoA-Synthetase handelt. Enzyme dieses Typs stehen unter anderem am Anfang der Isoprenoidsynthese. Isoprenoide sind eine zentrale Stoffgruppe in Pflanzen, welche eine Vielzahl von teils auch infektionsrelevanten Funktionen besitzen. Schließlich wurde auch ein CBS-Domänenprotein (CBS steht für Cystathionine Beta Synthetase) getestet. Nach Informationen aus der Domänenbeschreibung der SMART-Datenbank kommen CBS-Domänen in unterschiedlichen Proteinen vor, wobei sie möglicherweise durch Bindung von Adenosinderivaten eine regulie-

rende Wirkung auf vorhandene andere Proteindomänen haben. Sie könnten auch als Sensoren für den Energiestatus innerhalb der Zelle dienen.

Tabelle 5.1: Mögliche Interaktionspartner für Zf1. Die Klone mit fett gedruckten Nummern wurden weiter untersucht.

Klonnr.	Blastx-Ergebnis: Beschreibung	E- Wert
11	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$2e^{-34}$
81	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$3e^{-37}$
94	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$2e^{-34}$
147	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$7e^{-36}$
151	Os02g0818000, hypothetisches Protein mit Cystathionin Beta Synthase (CBS)- Domäne	$5e^{-36}$
269	Os02g0760300, Peptidyl- Prolyl cis trans Isomerase	$1e^{-39}$
318	Os10g0189100, Phosphoglucomutase ähnliches Protein	$3e^{-100}$
327	Os02g0760300, Peptidyl- Prolyl cis trans Isomerase	$4e^{-31}$
347	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$1e^{-34}$
355	hypothetisches Protein, AACs ähnliche Domäne mit AMP und CoA Bindestelle, uncharakterisierte Acyl CoA Synthetase	$9e^{-87}$
397	Os12g0605800, 3- Methylcrotonyl CoA carboxylase biotin enthaltende Untereinheit	$8e^{-61}$
402	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$2e^{-34}$
407	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$9e^{-38}$
425	Os02g0805200, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)- Domäne enthaltendes Protein	$8e^{-62}$

453	hypothetisches Protein, AACS ähnliche Domäne mit AMP und CoA Bindestelle, uncharakterisierte acyl CoA Synthetase	$4e^{-84}$
473	Os02g0760300, Peptidyl-Prolyl cis trans Isomerase	$1e^{-31}$

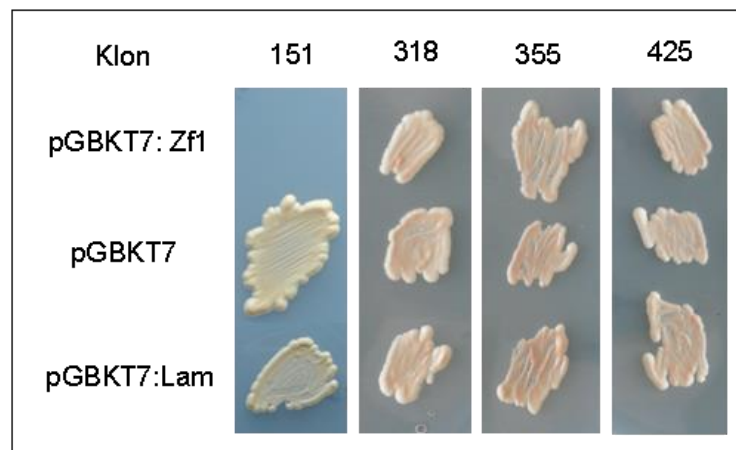


Abb. 5.18: Verifizierung der putativen Interaktionspartner von Zf1. Die in dem y2h gefundenen Interaktionspartner wurden in einer Co-Transformation gegen Zf1, den leeren Vektor mit der DNA-Bindedomäne sowie den Vektor mit dem Laminprotein getestet. Auf SD-LWHA konnten auch mit dem Leervektor und dem Vektor mit Lamin Co-transformierte Hefen wachsen. Somit handelt es sich bei der Aktivierung der Reportergene nicht um eine spezifisch durch die Interaktion mit Zf1 ausgelöste Interaktion. Bei der Zf1:151 Co-Transformation war auch auf SD-LW kein Wachstum zu sehen, so dass die Co-Transformation nicht gelungen war. Aufgrund der Interaktion von Klon 151 mit dem Leervektor und Lamin wurde sie jedoch nicht wiederholt.

In einem ersten Schritt sollte die Interaktion zwischen Zf1 und den putativen Interaktionspartnern nochmals getestet und ihre Spezifität verifiziert werden. Dazu wurden jeweils die Plasmide mit den putativen Interaktionspartnern in einer Co-Transformation zusammen mit entweder pGBKT7-Zf1, dem leeren pGBKT7-Vektor, der nur die DNA-Bindedomäne enthält, oder mit einem pGBKT7-Lamin-Vektor transformiert. Lamin wird als Test darauf eingesetzt, ob es sich um eine spezifische Interaktion handelt, da dieses Protein laut Clontech- Manual keine Komplexe bildet und nicht mit anderen Proteinen interagieren soll. Es wurde jeweils ein gefischtes Plasmid mit einem der pGBKT7-Varianten zusammen in den Hefestamm AH 109 transformiert und dieser dann auf SD-LW Medium sowie auf SD-LWHA Medium ausplattiert. Durch das SD-LW Medium wird ausschließlich auf Vorhandensein beider Plasmide selektiert, also das Gelingen der Co-Transformation, während SD-LWHA Medium auf eine Aktivierung der Reportergene selektiert. In allen vier Fällen wurde eine Aktivierung der Reportergene sowohl bei den mit der DNA-Bindedomäne alleine als auch bei den mit Lamin Co-transformierten Hefen festgestellt. Dies zeigt, dass keine der angezeigten Interaktionen

eine spezifisch durch die Interaktion mit Zf1 ausgelöste Interaktion war, und es sich dabei um falsch positive Kandidaten gehandelt hat. Zf1 selbst wurde zu Beginn der Arbeit negativ auf eine Selbstaktivierungsfähigkeit hin getestet. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit somit kein pflanzlicher Interaktionspartner für Zf1 gefunden werden.

Für Nt1 wurde ebenfalls ein *yeast two hybrid* Versuch mit derselben oben beschriebenen cDNA-Bank durchgeführt. Auch hier wurde der Versuch nach den Angaben des „matchmaker library construction and screening kit“ Manual durchgeführt. Es wurden 5 Klone sequenziert (siehe Tabelle 5.2), wobei festgestellt wurde, dass es sich bei allen um Klone handelt, welche ebenfalls in dem Zf1 *yeast two hybrid* gefunden wurden. So konnten diese vermeintlichen Interaktionspartner sowohl hier als auch für Zf1 als spezifische Interaktionspartner ausgeschlossen werden. Da sich im Verlauf dieser Arbeiten immer deutlicher zeigte, dass es sich bei Nt1 nicht um ein sekretiertes Protein handelt, wurde auf eine weitere Suche nach Interaktionspartnern verzichtet. Zwar enthält die cDNA-Bank auch pilzliche cDNA aus den infizierten Pflanzengeweben, allerdings dürften diese im Vergleich zu den pflanzlichen cDNAs sehr schwach konzentriert sein. Da das Protein nicht sekretiert wird, kämen aber nur solche pilzlichen Proteine als Interaktionspartner in Frage. Darüber hinaus war Ziel der Arbeit die Suche nach sekretierten Effektorproteinen, was Nt1 offensichtlich nicht ist.

Tabelle 5.2: Mögliche Interaktionspartner für Nt1. Alle gefischten Klone sind allerdings auch schon für Zf1 gefischt worden und fallen somit als spezifische Interaktionspartner für beide Proteine aus.

Klonnr.	Blastx, Beschreibung	E-Wert
3	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$2e^{-35}$
5	Os12g0605800, 3- Methylcrotonyl CoA carboxylase biotin enthaltende Untereinheit	$2e^{-60}$
34	Os12g0605800, 3- Methylcrotonyl CoA carboxylase biotin enthaltende Untereinheit	$6e^{-36}$
35	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$2e^{-35}$
36	Os04g0571800, Zinkfinger, Ringtyp-Domäne enthaltendes Protein	$2e^{-60}$

6 Diskussion

Pathogene Mikroorganismen, insbesondere auch Pilze, haben einen sehr großen Einfluss auf die Landwirtschaft. Dies kann, wie in Geschichtsbüchern beschrieben, bis zu Totalausfällen der Ernte und strengen Hungersnöten führen. So ist zum Beispiel die große Hungersnot 1845 in Irland auf den Erreger der Kraut- und Knollenfäule *Phytophthora infestans* zurückzuführen. Natürlich sind die technischen Fortschritte in Sachen Pflanzenschutz beträchtlich, allerdings ist es, wie anfangs schon erwähnt, immer noch so, dass zum Beispiel der Hauptprotagonist dieser Arbeit *M. oryzae* für einen jährlichen Verlust von 10- 30% der Reisernte verantwortlich ist. In der Zeit des Verfassens dieser Arbeit wurde durch Medienberichte bekannt, dass in Zentralamerika eine Epidemie des Kafferoestes massive Schäden an Kaffepflanzen verursacht, was einen wirtschaftlichen Schaden von mehr als 400 Millionen Euro nach sich zieht (dpa- Meldung vom 6. 5. 2013). Es ist also von entscheidender Bedeutung, die Interaktion von Mikroorganismen und Pflanzen detaillierter zu untersuchen, um zu verstehen, wie sie ablaufen und wie gegebenenfalls unter landwirtschaftlichen Gesichtspunkten darauf Einfluss genommen werden kann. Ein zentraler Punkt dieser Forschung der letzten Jahre ist die Suche nach Effektorproteinen. Es konnte in Genomanalysen gezeigt werden, dass in Pathogenen dafür eine Vielzahl an möglichen Kandidaten vorliegt. So hat *M. oryzae* zum Beispiel 739 Proteine die vermutlich sekretiert sind, was einer doppelt so hohen Anzahl als zum Beispiel bei *Neurospora crassa* gefundenen sekretierten Proteinen entspricht (Dean et al., 2005). Dabei wurden, wie in der Einleitung dieser Arbeit schon beschrieben, in den letzten Jahren beträchtliche Fortschritte bei der Suche nach neuen Effektoren gemacht. So wurden in vielen Pathogenen neue Effektoren gefunden und in einigen Fällen konnte auch beschrieben werden, auf welche Weise diese Effektoren zu einer erhöhten Virulenz des Pathogens beitragen (Rafiqi et al., 2012). Auch für *M. oryzae* sind schon eine Anzahl Effektoren beschrieben worden, die allerdings oft nur anhand einer Avirulenzreaktion der beteiligten Effektoren identifiziert werden (Li et al., 2013). Im Laufe meiner Diplomarbeit wurde nach *M. oryzae* Proteinen gesucht, welche während der Wurzelinfektion stärker exprimiert waren, als während der Blattinfektion. Aus den gefundenen Genen wurden gezielt mögliche Effektorproteine, also Proteine mit einem Signalpeptid, ausgesucht, um sie weiter zu untersuchen. Dafür wurden 4 Proteine ausgewählt, welche als interessanteste Kandidaten angesehen wurden. Die genauen Gründe für die Auswahl dieser Gene soll im Folgenden erläutert werden.

6.1 Auswahl der untersuchten Proteine

Bei Zf1 handelt es sich laut Datenbankvoraussagen um ein sekretiertes Protein, welches eine klassische Zink Finger (C_2H_2) Domäne mit 23 Aminosäuren Länge enthält. Als erstes wurden Zink Finger Domänen in dem Transkriptionsfaktor TFIIIA aus *Xaenopus laevis* beschrieben (Miller et al., 1985). Hier wurde festgestellt, dass dieser Transkriptionsfaktor eine Region enthält, die aus 9 ca. 30 Aminosäuren langen gleichen Untereinheiten besteht. Diese hatte jeweils zwei Cystidine und zwei Histidine (daher der Name C_2H_2), mit denen ein Zinkatom gebunden wird. Auf diese Weise wird ein „Finger“ geformt, mit dem auf spezifische Weise DNA gebunden wird, wie Pavlevich und Pabo (1991) für den Zink Finger Transkriptionsfaktor Zif 268 veröffentlichten. Jeder Finger bindet dabei über drei Aminosäuren je ein Basenpaar der DNA. In weiteren Studien wurde dieses Modell noch verfeinert, so dass nun zu den drei Bindungen noch eine vierte Bindung hinzukam (Klug, 2010). Laut der Beschreibung durch die für das Finden von Proteindomänen verwendeten Internetdatenbank SMART sind C_2H_2 Zink Finger die am weitesten verbreiteten DNA-Bindedomänen in eukaryotischen Transkriptionsfaktoren.

Bei der ebenfalls angezeigten *inhibitor of apoptosis*-Domäne handelt es sich nach der Pfam-Datenbank Domänenbeschreibung um Proteine, die eine Rolle in der Apoptose, Cytokinproduktion oder Chromosomsegregation haben. Dieser Domänentyp wurde ursprünglich in Baculoviren gefunden, wo er die Verteidigung durch Apoptose in infizierten Insektenzellen unterbinden soll. Dafür interagieren sie mit und hemmen Caspasen. Sie kommen in vielzelligen Organismen von der Fruchtfliege bis zu Säugetieren vor, sollen aber nicht in Pflanzen zu finden sein (Verhagen et al., 2001). Zwar sind soweit mir bekannt ist, keine Homologe zu tierischen Caspasen in Pflanzen publiziert, allerdings werden seit einiger Zeit Caspasen-ähnliche Proteine in Pflanzen, sowie eine Funktion dieser im Verlauf des programmierten Zelltods, insbesondere während der Hypersensitive Response der Pflanzenabwehr, diskutiert (Chichkova et al., 2004; Bonneau et al., 2008; Xu & Zhang, 2009; Lord et al., 2013). Dieser Domänentyp gehört nach der Domänenbeschreibung ebenfalls zu der Zink-Finger Domänenfamilie. Eine Zink-Finger Domäne in Kombination mit einem Signalpeptid, ist natürlich eine äusserst interessante Kombination! Welchen Grund sollte ein Pathogen besitzen, einen Transkriptionsfaktor zu sekretieren? Dabei drängt sich selbstverständlich der Verdacht auf, dass dieser möglicherweise Einfluss auf die Genexpression des Wirtes nehmen könnte. Dazu kommt, dass dieses Gen, im Vergleich zu Mycel, in beiden Infektionswegen sehr stark hoch reguliert ist (8000 fach in der Wurzelinfektion und 1190 mal stärker während der Blattinfektion). Es könnte sich dabei also durchaus um ein für die Infektion allgemein sehr wichtiges zentrales Effektorprotein handeln. Gleichermassen lässt sich auch spekulieren, dass die angezeigte Inhibitor of Apoptosis Domäne wirklich eine hemmende Wirkung auf die diskutierten Caspase-ähnlichen Proteasen haben könnte, und so mög-

licherweise eine hemmende Wirkung auf die Pflanzenabwehr durch *Hypersensitive Response* nimmt.

Für die beiden Gene *Nt1* und *Llr1* sprach zuallererst, dass sie eine rein wurzelspezifische Expression zeigten. Zum Zeitpunkt der Auswahl wurde für *Nt1* auch noch eine schwache Homologie zu einer GASA-Domäne vorhergesagt, was, wie im Ergebnisteil schon angeführt wurde, natürlich ebenfalls eine sehr interessante Kombination für ein sekretiertes pilzliches Protein ist. Allerdings rechtfertigt auch die *in silico* gefundene Nukleotidylyl- Transferase Domäne alleine durchaus ebenfalls eine weitere Untersuchung. Die Funktion von Nukleotidylyl- Transferasen ist allgemein das Übertragen von Nukleosidmonophosphaten von Nukleosidtriphosphaten auf ein Empfängermolekül. Es gibt vielfältige Beispiele für die Arbeit von Nukleotidylyl- Transferasen, insbesondere von Adenylyl- Transferasen. Dieser Übertrag kann sowohl von stabiler Natur sein, oder es kann sich auch nur um eine transiente Nukleotidylylierung handeln. Das erste bekannt gewordene Beispiel für eine stabile Nukleotidylylierung ist die Glutaminsynthetase in *E. coli*. Diese Glutaminsynthetase wird durch eine Adenylyl- Transferase reguliert. Weiter ist in diesem Prozess ein Protein namens PII beteiligt, das durch eine Uridylyl- Transferase aktiviert wird (Stadtman, 2001). Beispiele für eine transiente Adenylylierung von Substraten, die auch als Adenylation und AMPylation bezeichnet wird (Itzen et al., 2011) sind etwa bei DNA- Polymerasen, tRNA- Synthetasen und anderen stoffwechselrelevanten Enzymen zu finden (Kuchta et al., 2009). Ebenfalls 2009 wurden auch 2 bakterielle sekretierte Proteine publiziert, der Effektor VopS aus *Vibrio parahaemolyticus* (Yarbrough et al., 2009) und das *Immunoglobulin binding proteine A* IbpA aus *Histophilus somni* (Worby et al., 2009), die beide dazu in der Lage sind, Rho- GTPasen ihrer Wirte zu adenylylieren, wodurch in beiden Fällen die Aktivität dieser Rho- GTPasen unterbunden wird. Allerdings besitzen beide dafür eine sogenannte FIC- Domäne und keine Nukleotidylyl- Transferase Domäne. Es zeigt aber doch das Potential von Nukleotidylylierungen im Verlauf von Infektionen. Im Jahr 2010 wurde veröffentlicht, dass ein Effektorprotein aus *Legionella pneumophila* DrrA (Müller et al., 2010) in einer N- terminalen Domäne eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit einer Nukleotidylyl- Transferase Domäne aufweist und in der Lage ist, das Regulatorprotein Rab1 zu adenylylieren. Diese allgemein regulierenden Funktionen von Nukleotidylyl- Transferase Domänen sowie die bekannt gewordenen adenylylierenden Effektoren sind starke Indizien, um sich weiter mit einem möglicherweise sekretierten Nukleotidylyl- Transferase- Protein wie *Nt1* zu beschäftigen.

Wie schon erwähnt, ist auch *Llr1* ein Protein, das spezifisch nur während der Wurzelinfektion und nicht bei vegetativem Wachstum oder während der Blattinfektion exprimiert wird. Es kommt durch ein vorausgesagtes Signalpeptid somit als wurzelinfektionsspezifisches Effektorprotein in Frage. Das Protein weist keine bekannten Domänen auf, besteht aber fast komplett aus zwei nahezu identischen *Reapeats* (zweimal 49 Aminosäu-

ren lang von insgesamt 127 Aminosäuren des Proteins, dazu 17 Aminosäuren Signalpeptid). Weiter wurde in einem Blastp festgestellt, dass dieses Protein Ähnlichkeit mit einem menschlichen Sialinsäure- bindenden Lektin besitzt. Proteine die *Repeats* enthalten, besitzen als grundlegende Gemeinsamkeit, dass sie in aller Regel Funktionen in der Protein- Protein Interaktion wahrnehmen (Andrade et al., 2001; Main et al., 2003). Auch bei Lektinen handelt es sich um Proteine, die definiert sind als Proteine, die Kohlenhydrate binden, aber keine Enzyme oder Antikörper sind. Das in dem Blastp gefundene Siglec7 ist ein menschliches Lektin, welches wie die anderen Mitglieder der Siglec- Familie spezifisch Sialinsäure bindet (Angata & Varki, 2000). Sialinsäuren sind α - Ketosäuren und bestehen aus einem 9 Kohlenstoffatome umfassenden Gerüst. Es gibt mehr als 50 strukturell unterschiedliche Mitglieder innerhalb dieser Familie (Angata & Varki, 2002). Sialinsäuren kommen in großer Zahl in Vertebraten vor, außerdem sind sie in einigen Pilzen, aber allgemein nicht in Pflanzen anzutreffen (Angata & Varki, 2002). Mitglieder der Siglec- Familie erfüllen in Vertebraten vielen Funktionen, wie beispielsweise die Erkennung von körpereigenen Zellen anhand der auf Zelloberflächen exponierten Sialinsäuren (insbesondere im Rahmen der Immunabwehr), aber auch das Erkennen von Pathogenen, die Sialinsäuren auf ihrer Oberfläche besitzen (Angata & Varki, 2002; Dam & Brewer, 2010). Für Lektine in Pflanzen diskutierten Peumann & van Damme (1995) Funktionen in der Abwehr von sowohl pathogenen Mikroorganismen als auch von Herbivoren und kamen zu dem Schluss, dass diese von Pflanzen als passive Abwehrproteine benutzt werden. So erwähnten sie insbesondere eine wachstumshemmende Wirkung von pflanzliches Chitin-bindenden Lektinen auf einige Pilze. Insgesamt erscheint es also durchaus wahrscheinlich, dass es sich bei Llr1 um ein Protein handelt, welches nach der Sekretion ein anderes Protein, Glycoprotein bzw. ein Kohlenhydrat binden soll. Dabei besteht sowohl die Möglichkeit, dass es mit einem Wirtsmolekül interagieren soll, als auch dass es, vergleichbar dem Chitin bindenden Effektor Slp1 (Mentlak et al., 2012), ein pilzeigenes Molekül binden und so zur Tarnung der Hyphen dienen soll. Sollte das Protein tatsächlich Sialinsäure binden, wie man durch die Ähnlichkeit zu Siglec7 vermuten kann, so würde es sogar sehr wahrscheinlich, dass es pilzeigene Strukturen tarnen soll, da wie oben erwähnt, Sialinsäure in Pflanzen nicht bestätigt nachgewiesen werden konnte.

Weiter wurde das Protein Nud1 ausgewählt. Da es zwar in dem durchgeführten Microarray 19 mal stärker während der Wurzelinfektion als während der Blattinfektion exprimiert war, sich dies aber in der durchgeführten Real Time PCR nicht bestätigte, wurde dieses Gen nicht von Anfang an miteinbezogen. Als allerdings die mögliche Bedeutung der Nudix- Hydrolase Domäne deutlicher wurde, wurde auch dieses Gen in die Reihe der zu untersuchenden Gene aufgenommen. Wie in dem Ergebnisteil schon erwähnt, verstärkte sich dieser Eindruck, aufgrund von publizierten Ergebnissen, immer weiter. Ein erster Bezug der Nudix- Hydrolase Domäne zu dem Bereich Pflanzenpatho-

gene bzw. Pflanzenabwehr zeigte die Entdeckung der Wirkung der Nudix- Hydrolase NUDT7 (Ge et al., 2007). Allgemein handelt es sich bei Nudix- Hydrolasen um relativ kleine Proteine, je nach Quelle zwischen 16- 21 bzw. 16- 35 kDa (Nud1 hat ca. 17 kDa). Der Name steht für **n**ucleoside **d**iphosphate linked to moiety **x** – Hydrolasen, was eine große Vielfalt an Substraten, wie zum Beispiel dNTPs, Nukleotid- Zucker bzw. Alkohole, Dinukleosid- Polyphosphate, Dinukleotid- Coenzyme und andere Substanzen mit einem Pyrophosphat bedeuten kann. Für die Hydrolyse der Substrate besitzen sie eine hochkonservierte Aminosäuresequenz, die als Nudix- Box bezeichnet wird (McLennan, 2005; Kraszeska, 2008). Das oben schon erwähnte *NUDT7*- Gen fanden Ge et al. (2007) als sie in einem T- DNA Insertionsmutantenscreen in *A. thaliana* eine Mutante fanden, die eine erhöhte Resistenz gegen *P. syringae* aufwies und dann feststellten, dass es sich dabei um die schon zuvor NUDT7 genannte Nudix- Hydrolase handelt. Sie zeigten, dass NUDT7 innerhalb einer halben Stunde nach der Inokulation mit *P. syringae* stark exprimiert wird. In der Insertionsmutante trat eine Hyperaktivierung von pathogenitätsrelevanten Genen auf, die durch eine Komplementation des mutierten NUDT7 durch eine Wildtypversion wieder aufgehoben wurde. Diese Hyperaktivierung trat sowohl ebenfalls bei einer Inokulation mit Pathogenen wie nicht pathogenen Bakterien auf. Ge et al. schlossen aus ihren Ergebnissen, dass es sich bei NUDT7 um einen negativen Regulator der pflanzlichen Abwehr handelt, der eine übertriebene Stimulierung der Abwehr verhindern soll. In einer späteren Veröffentlichung konnten Olejnik et al. (2011) das regulatorische Protein RACK1A als Interaktionspartner für NUDT7 präsentieren. Dieses Protein wurde in einem *Yeast two Hybrid* mit NUDT7 als *Bait*- Protein gefunden und durch bimolekulare Fluoreszenzkomplementation bestätigt. Durch Fusion der beiden Interaktionspartner jeweils an GFP konnte eine Kollokalisierung im Cytoplasma und dem Zellkern gezeigt werden, was ebenfalls durch die bimolekulare Fluoreszenzkomplementation als Orte der Interaktion der beiden Proteine ermittelt werden konnte. Diese die Abwehr hemmende Wirkung einer pflanzlichen Nudix- Hydrolase legt nahe, dass eine von einem Pathogen sekretierte Nudix- Hydrolase durchaus diese Wirkung kopieren könnte. Auf diese Weise könnte sich ein Pathogen das Leben sehr erleichtern, wenn es dazu in der Lage wäre, seinen Wirt dazu zu bringen, es nicht oder zumindest weniger intensiv zu bekämpfen. Tatsächlich konnten Dong et al. (2011) bei ihrer Suche nach dem für das Avr3a Avirulenzprotein gehörenden Gen feststellen, dass es sich dabei um eine Nudix- Hydrolase handelt. In transient transformierten *N. benthamiana* Blättern, die mit *Phytophthora capsici* und *P. parasitica* inokuliert wurden, konnten sie nachweisen, dass Avr3a eine virulenzsteigernde Wirkung hatte. Weiter konnte durch den Einsatz einer Version von Avr3a mit mutierter Nudix- Hydrolase Domäne gezeigt werden, dass diese für die virulenzsteigernde Wirkung verantwortlich ist. Avr3a scheint eine die ETI unterdrückende Wirkung zu haben, die ebenfalls von der Nudix- Domäne abhängig ist. Erst kürzlich wurde ein weiteres Effektorprotein mit einer Nudix- Hydrolase Domäne veröffentlicht. Bei diesem handelt es sich um den *Colle-*

totrichum truncatum Effektor CtNUDIX (Bhadauria et al., 2013). In einem Blastp mit CtNUDIX fanden Bhadauria et al., dass es in *C. graminicola* sowie in *M. oryzae* sehr gut übereinstimmende ebenfalls sekretierte Nudix-Hydrolasen gibt. Bei den von ihnen in *M. oryzae* gefundenen Hydrolasen handelt es sich dabei um *Nud1* (die in dieser Arbeit untersuchte Nudix-Hydrolase) und ihr Genduplikat *Nud2*. Sie konnten für CtNUDIX feststellen, dass das Protein spezifisch in der späten biotrophen Phase exprimiert ist. Durch Expression von CtNUDIX mit und ohne Signalpeptid *in planta* in *N. tabacum* Blättern, stellten sie fest, dass beginnend vier Tage nach der Inokulation das Gewebe der Infiltrationsstelle kollabierte und nach sieben Tagen papierartig wurde. Durch Expression von CtNUDIX mit Signalpeptid und C-terminaler GFP Fusion in Tabakblättern exprimierten, fanden sie, dass das Protein offensichtlich an der Plasmamembran lokalisiert ist, wohin es durch Vesikel transportiert worden war. Bhadauria et al. überexprimierten CtNUDIX in *C. truncatum* und *M. oryzae* und infizierten mit diesen Stämmen Linsen (mit *C. truncatum*) bzw. Gerste (mit *M. oryzae*). Die Überexpressionsstämme wiesen keine für das jeweilige Pathogen typischen Symptome auf. Bei einer mikroskopischen Analyse fanden sie, dass die Infektion der Pathogene genauso erfolgte wie bei den Wildstämmen. Allerdings wurden keine nekrotrophen Hyphen gebildet (*C. truncatum*) bzw. die Hyphen wuchsen nicht in die nächsten Zellen weiter (*M. oryzae*). Die Wirtszellen färbten sich nach der Penetration braun, was auf Zelltod hindeutet. Daraus schlossen Bhadauria et al., dass CtNUDIX Überexpression dazu führt, dass es in der biotrophen Phase zu einem Zelltod kommt, wodurch ein Umschwenken in die nekrotrophe Phase verhindert wird. CtNUDIX ist also ein für die hemibiotrophe Lebensweise wichtiges Gen.

Auch wenn die beiden besprochenen Nudix Effektoren zu Beginn der Arbeiten mit *Nud1* noch nicht bekannt waren, so beweisen sie, dass die Auswahl dieses Genes sich im Nachhinein als eindeutig richtig erwies.

6.2 Herstellen von Deletionsmutanten für *Zf1*, *Nt1*, *Llr1*, *Nud1*

Für die beiden Gene *Zf1* und *Nt1* konnten jeweils Knockouts hergestellt werden. Diese wurden sowohl durch eine negative PCR gegen den ORF (Ergebnisse nicht gezeigt), sowie anschließend durch einen Southern Blot überprüft. Wie in Abbildung 5.4 zu sehen ist, zeigten diese Southern Blots für beide Gene die jeweils erwarteten Bandengrößen und keine weiteren Banden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Knockout-Konstrukte wirklich homolog in das Genom integriert sind. Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass sie nur einmal integriert wurden und keine weiteren ektopischen Integrationen vorliegen. Alle, möglicherweise im Folgenden zu sehenden Unterschiede im Verhalten der Transformanten, im Vergleich zum Wildtyp, können also mit dem Knockout in Verbindung gebracht werden. Bei diesen Experimenten zeigte sich deut-

lich, dass es sehr große Unterschiede in der Möglichkeit der Deletion mittels homologer Rekombination der unterschiedlichen Gene zu geben scheint. So konnte *Nt1* in einem einzigen Anlauf deletiert werden. Dabei wurden auch gleich drei Transformanten mit bestätigtem Knockout erhalten. Im Gegensatz dazu steht *Llr1*, bei welchem trotz der Analyse von 160 Transformanten keine einzige Deletion erhalten werden konnte. Auch bei *Zfl* wurde, trotz vielfältiger Versuche, nur ein einziger Knockout-Stamm erzeugt. Und dies alles, obwohl mit dem $\Delta Ku80$ -Stamm (Villalba et al., 2008) schon ein Stamm verwendet wurde, welcher eine erleichterte homologe Rekombination gewährleisten sollte.

Für *Llr1* und *Nud1* erscheint es somit nicht weiter sinnvoll, einen Genknockout mit dieser Methode versuchen zu wollen. Bei *Llr1* erscheint es zwar durchaus möglich diesen zu erhalten, allerdings ist nach 160 negativ getesteten Transformanten fraglich wie viel weitere Zeit darin investiert werden müsste.

Ein möglicher anderer Ansatz um *Llr1* auszuschalten wäre es, die Gene durch die Insertion eines Markers zu unterbrechen. So werden diese zwar nicht komplett aus dem Genom entfernt und können möglicherweise dadurch immer noch eine Restfunktion behalten. Wie in Publikationen zu lesen ist, wurde diese Methode in *M. oryzae* allerdings schon angewandt und hat auch zu Erfolgen geführt. So entwickelten Hamer et al. (2001) eine Methode, die sie TAGKO nannten. Dabei wird mit Hilfe eines Transposons *in vitro* in eine Gensequenz innerhalb eines Cosmids eine Markerkassette eingefügt. Anschließend werden diese Konstrukte dann in *M. oryzae* transformiert. Mit dieser Methode erstellte Konstrukte sollen im Vergleich zu anderen Vektoren eine erhöhte gezielte Integration zeigen. Allerdings fanden Hamer et al. auch, dass eine gezielte Integration bei homologen Regionen, die kürzer als 5 kB waren, generell gering war und diese durch längere homologe Sequenzen gesteigert werden konnte. Die hier geforderten 5 kB homologen Sequenzen für eine gezielte Integration entsprechen in der Summe genau den in dieser Arbeit angestrebten 2,5 kb upstream- und downstream-Flanken. Allerdings konnten diese Flanken wie berichtet nicht in allen Fällen mit entsprechender Länge erhalten werden. In Villalba et al. (2008) wird aber von gelungenen Knockoutkonstrukten berichtet, die eine homologe Sequenz upstream und downstream von je 1,5 kB besitzen. In der gleichen Arbeit wurden sogar Knockouts durchgeführt, in denen homologe Flanken von 1 kB und 0,7 kB Verwendung fanden. Weiter fanden Hamer et al. (2001) heraus, dass je nach dem, wo das Transposon in dem Zielgen integriert wurde, unterschiedliche Varianten mit unterschiedlichem Grad an Genexpression und Funktion entsteht. Einschränkend war auch zu sehen, dass die Transposons nicht gleichmäßig gut in alle Sequenzen integriert wurde, sondern vielmehr in bestimmte Sequenzen bevorzugt inserierten. Der schon erwähnte Effektor MC69 (Saitoh et al., 2012) wurde mit einer auf TAGKO basierenden Methode gefunden. Dazu wurde eine 8,7 kB große Gensequenz,

welche MC69 enthält, amplifiziert und dann in dieses Gen eine Insertion (bei Aminosäure 11) eingefügt.

Problematisch an dieser Methode erscheint mir, neben den schon von Hamer et al. genannten Problemen, die hierfür benötigten sehr langen PCR-Amplikons zu erhalten. Nach den in dieser Arbeit gemachten Erfahrungen mit erheblich kürzeren Fragmenten scheint dies oftmals nicht trivial. Ein Vorteil ist dagegen, dass durch diese Methode in großem Stil ganze Cosmid-Banken untersucht werden können. Auf diese Weise konnten zum Beispiel Saitoh et al. Insertionen in 78 Genen durchführen.

Bei *Nud1* ist die Situation durch die festgestellte Duplikation einer großen Gensequenz eine andere. Wie zuvor schon vorgestellt, handelt es sich bei den beiden Nudix-Hydrolase Genen *Nud1* (MGG_14156) und *Nud2* (MGG_14344) um exakte Duplikationen. Dies betrifft nicht nur den eigentlichen ORF, sondern auch mindestens 2kB upstream des Gens wie 491 bp downstream des Gens. Diese weitgehende, aber doch nicht ausreichende Sequenzübereinstimmung macht einen Knockout eines dieser Gene oder sogar beider Gene durch homologe Rekombination verhältnismäßig schwierig. Bei einem gelungenen Einzelknockout ist es durchaus wahrscheinlich, dass kein Effekt entsteht, da die Gene möglicherweise redundant wirken. Ein Doppelknockout mit nur einem Konstrukt, ist jedoch durch die nicht einmal 500 Bp große Übereinstimmung der Downstreamflanken unwahrscheinlich. Also bliebe nur der Doppelknockout mit zwei getrennten Konstrukten in zwei aufeinanderfolgenden Transformationen übrig, wobei sich allerdings nach der ersten transformation die Frage stellt, wie die erhaltenen Transformanten auf eine Deletion des ORF getestet werden sollen (bei einem identischen zweiten im Genom).

Eine weitere Möglichkeit, um insbesondere auch *Nud1* zusammen mit *Nud2* auszuschalten, wäre ein RNA-Interferenz-Ansatz. Bei RNAi-Ansätzen wird nicht das Gen an sich ausgeschaltet, sondern die mRNA des entsprechenden Gens nach der Transkription und vor der Translation abgebaut. Dadurch wird die Expression des Zielproteins herunterreguliert. RNAi ist ein natürlich vorkommendes Phänomen in Eukaryoten und dient verschiedenen Zwecken. Neben der Genregulation dient es auch, insbesondere bei Pflanzen, als Verteidigung gegen RNA-Viren sowie zur Kontrolle von Transposons. Zusammengefasst werden dabei doppelsträngige RNA Stücke durch eine RNase III Endonuclease in so genannte *small interfering RNA* (siRNA) geschnitten. Diese siRNAs werden dann in einem Multienzymkomplex RISC (RNA interference silencing complex) als Vorlage verwendet, um gezielt komplementäre mRNA abzubauen (Zamore et al., 2000; Kadotani et al., 2003). Auf der Basis dieser Methode wurde auch schon in *M. oryzae* eine Herunterregulierung eines Gens durchgeführt (Kadotani et al., 2003). Dazu wird durch Transformation mit RNAi-Konstrukten, welche die Sequenz des Zielgenes in *sense* und *antisense* Richtung enthalten, in dem Organismus eine künstliche doppelsträngige RNA geschaffen, die den RNAi-Prozess aktiviert. Da es sich bei den hier

herunterregulierten Genen um während der Infektion exprimierte Gene handelt, kommt auch eine Variante der RNAi- Methode, die host induced gene silencing (HIGS)- Methode in Frage. Bei dieser Methode wird das RNAi- Konstrukt nicht in das Pathogen transformiert, sondern in dem Wirtsorganismus exprimiert, von wo es in das eng interagierende Pathogen gelangt. Diese Methode wurde schon bei dem obligat biotrophen Pathogen *Blumeria graminis* (Nowara et al., 2010) wie auch dem ebenfalls obligat biotrophen Mykorrhizapilz *Glomus sp* (Helber et al., 2011) erfolgreich angewandt.

6.3 Die Deletion von *MoZf1* und *MoNt1* zeigt keinen Einfluss auf die Infektion von Reis durch *M. oryzae*

Ziel der Arbeit war es, mögliche in einem *Microarray* gefundene putative Effektorproteine zu deletieren und diese Knockout- Stämme auf einen Phänotyp während der Pflanzeninfektion und damit ihre Wirkung und Wichtigkeit während der Infektion zu untersuchen. Hintergedanke war, dass auf diesem Weg die Effektortätigkeit der Proteine bestätigt und neue, insbesondere wurzelspezifische Effektoren gefunden werden können. Wie in den Infektionsversuchen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, haben die Deletionen der Gene *Zf1* und *Nt1* allerdings keinen erkennbaren Einfluss auf die Infektion, weder die der Blätter noch der Wurzeln. Dies war, insbesondere für *Zf1*, sehr enttäuschend, da dieses Protein aufgrund seiner starken Expression in beiden Infektionswegen sowie wegen seiner Domänenstruktur sehr vielversprechend schien. Eine Möglichkeit, einer weiteren Charakterisierung der Deletionsmutanten, wäre es, die Knockout- Stämme mit einem Fluoreszenzprotein wie dem grün fluoreszierenden Protein GFP zu markieren, so dass ihr Wachstum während der Wurzelinfektion mikroskopisch verfolgt werden kann. Auf diese Weise könnte das Wachstum der Hyphen innerhalb der Reiwurzeln beobachtet werden, um so eventuelle Veränderungen im Wachstum der invasiven Hyphen zu erkennen. Dies wurde im Laufe dieser Arbeit schon in Angriff genommen.

Allerdings muss im Nachhinein auch erkannt werden, dass das Fokussieren auf einen Infektionsphänotyp als Zeichen und Beweis für die Effektortätigkeit wahrscheinlich nicht die richtige Strategie war. Es ist natürlich der naheliegendste Gedanke, die Funktion eines Proteins während eines Prozesses durch das Ausschalten des kodierenden Gens und eine Untersuchung der Auswirkungen auf den Prozess zu bestimmen. Allerdings hat sich gezeigt, dass dies für Effektoren nicht gilt, da bei ihnen häufig kein Phänotyp festgestellt werden kann. So haben schon Mosquera et al. (2009) für die von ihnen publizierten Effektoren BAS1-3 berichtet, dass Gendeletionen dieser Gene keinen Phänotyp während der Infektion auslösten. Vor kurzem berichteten dann Saitoh et al. (2012), dass sie mit Hilfe von Insertionsmutanten 78 mögliche sekretierte Effektorproteine untersucht hätten, wobei nur eine einzige Mutante einen Phänotyp aufwies (der schon erwähnte Effektor MC69). Somit kann durch einen fehlenden Phänotyp während

der Infektion nicht geschlossen werden, dass es sich nicht um einen Effektor handelt. Umgekehrt erweist sich die Suche nach Effektoren durch Mutantenphänotypisierung als eine sehr langwierige und fehleranfällige Methode, da offensichtlich viele Effektoren dabei nicht erfasst und gefunden werden können. Ein Grund für die Tatsache, dass die Deletion von Effektoren zu keinem Phänotyp führt, kann in einer funktionellen Redundanz von Effektoren liegen. So zeigten Kvitko et al. (2009) für Effektoren des bakteriellen Pflanzenpathogens *Pseudomonas syringae* eine solche Redundanz. Sie stellten fest, dass häufig nur durch die Deletion mehrerer Effektoren ein Effekt ausgelöst wurde, da diese Effektoren gemeinsam wirkten bzw. funktionell überlappen. Wurden jedoch die einzelnen Effektoren alleine deletiert, konnte kein Effekt festgestellt werden. Eine ähnliche funktionelle Redundanz wird auch für Effektoren von Oomyceten beschrieben (Birch et al., 2008).

6.4 Die zelluläre Lokalisierung von Zf1, Nt1, Llr1 und Nud1

Die in dieser Arbeit in verschiedenen Organismen durchgeführten Untersuchungen zu der Lokalisierung und der Sekretion der Proteine sind möglich gewesen, da es bei Signalpeptiden weniger auf die genaue Sequenz als einen physikalischen Grundaufbau ankommt. So bestehen sie in aller Regel aus einem N-terminalen Bereich mit positiv geladenen Aminosäuren, auf den ein Kernbereich mit hydrophoben Aminosäuren folgt. C-terminal des Kerns folgen wieder ein Bereich geladener Aminosäuren und ein durch neutrale Aminosäuren gekennzeichneter Bereich zur Abspaltung des Signalpeptids. Dies hat zur Folge, dass Signalpeptide zwischen verschiedenen Organismen ausgetauscht werden können und dabei ihre Funktionsfähigkeit behalten (Martoglio & Dobberstein, 1998).

Im Zuge der transienten Transformation von *N. benthamiana* Blättern konnte gezeigt werden, dass sich das Zf1 Vollprotein in seinem Lokalisierungsverhalten von dem Protein ohne Signalpeptid unterscheidet. So kolokalisiert das Protein ohne Signalpeptid mit dem Kontrollprotein dsRED im Cytoplasma und dem Zellkern der Pflanzenzelle. Wird das Protein dagegen mit Signalpeptid exprimiert, so ist seine Lokalisierung auf Bereiche um den Zellkern, die sehr an ER erinnern, sowie auf vermutliche Vesikel im Bereich des Cytoplasma der Zelle beschränkt. In dem Zellkern ist hier keine Fluoreszenz zu sehen. Diese Beobachtungen deuten sehr stark auf eine Sekretion des Proteins über das ER, anschließenden vesikulären Transport und schließlich Exocytose des Proteins hin. Dieser durch das ER über Vesikel führende Weg ist der klassische Sekretionsweg der großen Mehrheit eukaryotischer sekretierter Proteine (Lee et al., 2006) und, wie Yi et al. (2009) zeigen konnten, auch der höchst wahrscheinlich von Effektoren in *M. oryzae* benutzte Weg der Sekretion. Kloppholz et al. (2010) konnten mit demselben System für den Effektor SP7 zeigen, dass dieser anschließend selbstständig wieder in die Pflanzen-

zelle eindrang, da er, trotz funktionierendem Signalpeptid, in dem pflanzlichen Zellkern lokalisierte. Dieser selbstständige Wiedereintritt ist für Zf1, trotz der vorhergesagten Kernlokalisierung und der Transkriptionsfaktordomäne, nicht der Fall. Da das Protein ohne Signalpeptid sowohl in *Nicotiana* als auch in *Aspergillus* eindeutig im Cytoplasma zu finden war, müsste es bei einem erfolgreichen selbstständigen Wiedereintritt in die Pflanzenzelle auch bei einer Expression mit Signalpeptid im Cytoplasma der Pflanzenzelle vorzufinden sein, was jedoch nicht der Fall ist. Die Sekretion des Proteins, legen einerseits die gesehenen Ergebnisse der *Nicotiana*-Transformation, wie auch die Ergebnisse des *yeast signal sequence trap* Versuchs nahe. Es stellt sich also wiederum die Frage, warum *M. oryzae* ein Protein mit den beschriebenen Proteindomänen sekretiert, das nicht selbstständig in die Pflanzenzelle gelangt?

Dafür können zwei mögliche Gründe genannt werden: 1. das Protein verbleibt im Apoplasten und 2. das Protein kann nicht selbstständig in die Zellen eindringen, sondern benötigt die Gegenwart von pilzlichen Strukturen und/oder Molekülen für den Eintritt in die Pflanzenzelle. Für die erste Variante kann als Beispiel der zuvor besprochene Slp1 Effektor (Mentlak et al., 2012) aus *M. oryzae* dienen. Wie bereits bekannt ist, können Zink-Finger auch der Protein-Protein Interaktion dienen, wie am Beispiel des FOG-1 Proteins gezeigt wurde (Fox et al., 1999; Matthews & Sunde, 2002). Es besteht also die Möglichkeit, dass die Zink-Finger Domäne einer Interaktion mit einem Protein entweder des Pathogens oder des Wirtes im Apoplasten dienen soll.

Ein Argument für die Variante der notwendigen Gegenwart des Pathogens, ist der von Khang et al. (2010) beobachtete *biotrophic interfacial complex* (BIC). Dieser Komplex wurde als Ort beschrieben, an dem cytoplasmatische Effektoren bevorzugt auftraten, bevor sie in das Cytoplasma sekretiert wurden. Er könnte also eine für *M. oryzae* typische Struktur zur Effektorsekretion sein. Ist dies der Fall, müsste das Protein in Gegenwart des Pilzes in die pflanzlichen Zellen eindringen können. Zu diesem Zwecke wurde C-terminal mRFP an das Protein fusioniert und dieses Konstrukt in *M. oryzae* transformiert. Mit diesem Stamm wurden Zwiebelepidermisinfektionen durchgeführt und mikroskopiert. Allerdings wurde dabei keinerlei spezifische mRFP-Fluoreszenz innerhalb der infizierten Zelle festgestellt. Da die Transformation durch einen Southern Blot überprüft, sowie die Klonierungsregion des Plasmids auf korrekten Einbau des ORF sequenziert wurde, scheint es unwahrscheinlich, dass die fehlende Fluoreszenz auf einen handwerklichen Fehler zurückzuführen ist. Dieses Ergebnis spricht gegen eine cytoplasmatische Lokalisierung innerhalb der Pflanzenzelle. Allerdings haben Khang et al. (2010) ähnliche Versuche mit cytoplasmatischen Effektoren, die an Fluoreszenzproteine fusioniert waren, vorgestellt und dabei von sehr geringer Fluoreszenz berichtet. Dies scheint an der großen Verdünnung der fluoreszenten Proteine in der Pflanzenzelle zu liegen. Sie fusionierten deshalb zusätzlich eine Kernlokalisierungssequenz an ihre Proteine, um sie so im Zellkern zu konzentrieren und nachweisen zu können. Möglicher-

weise ist dieser Verdünnungseffekt im Cytoplasma der Pflanzenzelle ein Grund für die fehlende Fluoreszenz des Zf1-Fusionsproteins. Von der Proteinstruktur erscheint eine cytoplasmatische Funktion des Proteins insgesamt sogar wahrscheinlicher. Im Cytoplasma könnte das Protein neben der Proteinbindung auch eine Interaktion mit RNA des Wirtes eingehen und so indirekt dessen Genexpression beeinflussen (mögliche Interaktion mit mRNA oder rRNA). Dass Zink-Finger Proteine auch an RNA binden können, wurde ebenfalls schon publiziert (Matthews & Sunde, 2002; Hall, 2005). In diesem Umfeld könnte auch die festgestellte *Inhibitor of Apoptosis* Domäne eine der zuvor schon besprochenen Funktionen wahrnehmen. Um die noch offenen Fragen für dieses Protein zu klären, muss als erstes noch die Lokalisation des Proteins nach der Sekretion festgestellt werden. Ein erster Schritt dazu wäre, die schon durchgeführte Expression eines fluoreszierenden Zf1 Fusionsproteins um die oben erwähnte Komponente des künstlichen Konzentrierens im Zellkern zu erweitern, um so eine mögliche stark „verdünnte“ Fluoreszenz im Cytoplasma sichtbar zu machen. Anschließend muss je nach dem Ergebnis der Lokalisation die Suche nach einem möglichen Interaktionspartner des Proteins wieder aufgenommen werden. Dazu kann weiter nach einem Protein, bei cytoplasmatischer Lokalisierung vielleicht gezielt der Interaktion mit einem der bekannten Caspase-ähnlichen Proteine, gesucht werden. Ebenfalls bei cytoplasmatischer Lokalisierung von Zf1 könnte auch eine Interaktion mit RNA in Betracht kommen. Um diese zu finden, können Co-Immunopräzipitations-Verfahren angewendet werden, wie sie in einigen Publikationen zum Finden von RNA-Liganden bekannter RNA-bindender Proteine angewandt wurden (z. B. Brooks & Rigby, 2000; Itoh et al., 2002)

Im Falle des Proteins Nt1 zeigte die Expression des Fusionsproteins in *N. benthamiana*, sowohl mit als auch ohne Signalpeptid ein identisches Fluoreszenzmuster. In beiden Fällen war eine starke GFP-Fluoreszenz im Zellkern zu sehen, allerdings ebenfalls grüne Fluoreszenz im Cytoplasma der Zelle. Da die *in silico* Analysen ergaben, dass in der Sequenz dieses Proteins Kernlokalisierungssequenzen gefunden wurden, war diese zumindest in Teilen cytoplasmatische Lokalisierung *in planta* überraschend. Sie wurde aber noch deutlicher bei einer Expression eines Nt1-GFP Fusionsproteins in *Aspergillus nidulans* bestätigt, wo das Fusionsprotein eindeutig im Cytoplasma lokalisierte. Der fehlende Unterschied in der Proteinlokalisierung mit oder ohne Signalpeptid lässt sich auf zwei mögliche Ursachen zurückführen. Entweder das Protein wird gar nicht erst sekretiert, oder es dringt nach der Sekretion sofort wieder selbstständig in die Zelle ein. Um dies zu testen wurde das Signalpeptid alleine vor GFP kloniert und dieses Konstrukt ebenfalls in *N. benthamiana* transformiert. Dabei wurde deutlich, dass das Signalpeptid nicht in der Lage war, das Fusionsprotein aus der Zelle zu führen. Dieses Ergebnis wurde auch durch einen *yeast signal sequence trap* Versuch bestätigt. Somit führte das putative Signalpeptid in zwei unterschiedlichen Expressionssystemen nicht zu einer Sekretion von Nt1, was eine Sekretion in *M. oryzae* ebenfalls sehr unwahrscheinlich

macht. Damit konnte also gezeigt werden, dass es sich bei Nt1 nicht um ein Effektorprotein handelt, sondern um ein spezifisch während der Wurzelinfektion exprimiertes Protein, das jedoch eine Funktion innerhalb des Pathogens hat. Da das Protein nicht sekretiert wird, ist die in *A. nidulans*, ebenfalls einem filamentösen Ascomyceten, beobachtete deutliche Cytoplasmalokalisation die auch in *M. oryzae* wahrscheinlichste Lokalisation von Nt1.

Da für die beiden zuvor besprochenen Proteine jeweils eine Kernlokalisierung vorhergesagt wurde, wurden zum Vergleich die beiden Proteine Lr1 und Nud1 ebenfalls in *N. benthamiana* exprimiert. Diese beiden Proteine sollen laut Vorhersage nicht im Zellkern lokalisieren. Im Laufe der Experimente zeigte sich allerdings eine ziemlich deutliche Übereinstimmung der gesehenen Verteilung innerhalb von *N. benthamiana* Zellen. So sah die Lokalisierung bei Lr1 ohne Signalpeptid aus wie die cytoplasmatische dsRED Fluoreszenz, nur dass innerhalb des Zellkerns keine grüne Fluoreszenz zu sehen war. Aus irgendeinem Grund kann dieses Protein also die Kernmembran nicht passieren. An der Größe des Proteins kann dies nicht liegen, da es sich weder um das kleinste noch das größte der untersuchten Proteine handelt. Alle anderen konnten jedoch auch innerhalb des Zellkerns festgestellt werden, in den sie offensichtlich eindiffundierten (alle untersuchten Proteine haben eine Masse von weniger als 20 kDa). Somit muss dieses Verhalten mit der besonderen Struktur dieses Proteins zusammenhängen. Da es in der Literatur eine Vielzahl an Publikationen über *Repeats* enthaltende Proteine im Zellkern gibt, kann dies nicht auf die enthaltenen *Repeats* zurückgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre, dass es durch seine dreidimensionale Struktur an der Diffusion durch die Kernporen gehindert wird. Wird das Protein allerdings mit Signalpeptid exprimiert, so zeigt es eine der Verteilung von Zf1 mit Signalpeptid sehr ähnliche Lokalisation. Auch hier ist das Protein in Vesikeln innerhalb des Cytoplasmas konzentriert und scheint in diesen transportiert zu werden. Wie bei Zf1 kann auch hier kein Anzeichen für einen selbstständigen Wiedereintritt des Proteins erkannt werden. Allerdings ist es für Lr1 aufgrund der einem Siglec-Lektin ähnlichen Struktur naheliegend, dass es als apoplastisches Protein fungiert. Allerdings gilt hier wie bei Zf1, dass die Funktion und Lokalisierung des Proteins weiter untersucht werden muss, um eine gesicherte Aussage treffen zu können.

Nud1 wiederum lokalisiert in *N. benthamiana* Epidermiszellen, egal ob mit oder ohne Signalpeptid, gleichermaßen im Cytoplasma wie im Zellkern. Da mit diesem Protein keine weiteren Versuche wie für Zf1 und Nt1 durchgeführt wurden, kann es nur aufgrund der Lokalisierungsergebnisse nicht näher charakterisiert werden. Es müsste wie bei Nt1 zuerst geklärt werden, ob das Signalpeptid überhaupt funktionsfähig ist. Wenn dies der Fall ist, wäre das ein überzeugender Hinweis, dass Nud1 ein cytoplasmatischer Effektor sein könnte. Ist dies jedoch nicht der Fall, so handelt es sich, wie bei Nt1, um ein Protein, welches lediglich eine Funktion innerhalb des Pathogens hat. Allerdings

sind einige der in der oben schon erwähnten Publikation von Bhadauria et al. (2013) gemachte Beobachtungen interessant. So berichteten diese über den von ihnen untersuchten sekretierten CtNUDIX Effektor, dass er bei transienter Expression in Tabak eine Membranlokalisierung aufwies. In einer Blastp Suche fanden Bhadauria et al., dass dieses Protein eine sehr große Ähnlichkeit zu Nud1 aufweist (e-Value $< 10^{-15}$). Insofern ist es interessant zu sehen, dass die in dieser Arbeit gefundene Lokalisierung von Nud1 sehr deutlich von der von CtNUDIX abweicht. Für Nud1 wurden weder die membrangebundene Lokalisation, noch ein vesikulärer Transport, wie für CtNUDIX berichtet, festgestellt. Auch konnte für Nud1 der berichtete Zelltod an Injektionsstellen bei CtNUDIX nicht gesehen werden. Allerdings wurden die transformierten Zellen hier nie länger als 5 Tage beobachtet. Wenngleich dies noch weiterer Untersuchungen bedürfte, legt doch die sehr unterschiedliche Verteilung des Proteins in der Zelle schon nahe, dass sich die Proteine in ihrer Funktion unterscheiden. Aufgrund der mit Nt1 gemachten Erfahrungen müsste für Nud1 aufgrund der Lokalisierungsergebnisse zuerst getestet werden, ob es sich um ein sekretiertes Protein handelt, welches direkt wieder in die Pflanzenzelle eindringt oder ob es gar nicht erst sekretiert wird. Dazu können die gleichen Versuche wie für Nt1 (Expression einer Sp-GFP Fusion sowie *yeast signal sequence trap*) genutzt werden.

6.5 Putative Interaktionspartner für Zf1

Leider konnte keiner der bislang gefundenen möglichen Interaktionspartner bestätigt werden. Auffallend ist, dass sehr häufig ein Protein mit einer Ring- Finger Domäne unter den Kandidaten war. Da dieses sowohl in dem y2h mit Zf1 als *Bait* als auch mit Nt1 als *Bait* gefunden wurde, ist es wie auch die Methyl-Crotonyl-CoA Carboxylase sehr sicher eine falsch positive Interaktion. Dies folgt daraus, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass so unterschiedliche Proteine wie Zf1 und Nt1 die gleichen Interaktionspartner haben, zumal Nt1 offensichtlich nicht sekretiert wird und gar keine Reisproteine spezifisch binden kann. Neben der ebenfalls von vorneherein ausgeschlossenen Peptidyl-Prolyl-cis-trans Isomerase, welche schon in früheren Arbeiten als falsch positive auffiel, wurden aber vier weitere gefundene Interaktionspartner als Kandidaten für eine echte Interaktion eingestuft. In dem darauf folgenden Versuch diese Interaktionen zu bestätigen, zeigte sich allerdings, dass alle vier Proteine die Markergene auch ohne Zutun von Zf1 aktivierten, sie also ebenfalls keine echten Interaktionspartner, sondern falsch positive sind. Unter den insgesamt 16 sequenzierten Klonen die mit Zf1 als *Bait* gefischt wurden, waren also keine Interaktionspartner gefunden worden. Da es sich bei dem für die cDNA-Bank verwendeten Gewebe um mit *M. oryzae* infizierte Reisblätter bzw. Wurzeln (die eingesetzte RNA aus Blättern und Wurzeln stammte zu circa 70% aus Blättern und 30% aus Wurzeln) handelte, sollten mögliche Interaktionspartner für Zf1 im Überfluss exprimiert werden. cDNA von Reisproteinen, welche konstitutiv expri-

miert werden, müsste, durch die stark überwiegende Menge an pflanzlichen Zellen in dem eingesetzten Gewebe, reichlich vorhanden sein. Auch durch die Infektion induzierte cDNA von Abwehrproteinen muss in dem Gewebe hoch präsent sein. Wenn Zf1 also mit einem Reisprotein interagiert, sollte dies verhältnismäßig einfach zu finden sein. Dabei spielt es theoretisch keine Rolle, ob es mit einem apoplastischen oder einem cytoplasmatischen Protein interagiert. Allerdings muss die Interaktion in Hefe im Zellkern stattfinden, so dass der nun wieder funktionsfähige Transkriptionsfaktor Gal 4 die Expression der Markergene aktivieren kann. Zu diesem Zweck wurde bei der Klonierung des Baitkonstruktes Zf1 ohne das Signalpeptid kloniert. Für die cDNA der Datenbank gilt dies allerdings nicht; dort besitzen die möglichen Interaktionspartner noch ihre eventuell vorhandenen Signalpeptide. Somit ist es möglich, dass sekretierte oder membranständige Proteine nicht als Interaktionspartner für Zf1 gefunden werden, da diese nicht in den Zellkern der Hefen gelangen, sondern in Richtung Sekretion umgelenkt werden. Dies könnte für den Fall einer Funktion von Zf1 als apoplastischem Effektor erklären, warum in dem *yeast two hybrid* keine Interaktionspartner gefunden wurden. Dasselbe gilt auch für den theoretischen Fall einer Interaktion mit anderen von *M. oryzae* sekretierten Proteinen. Hier gilt noch zusätzlich, dass in dem zur cDNA-Synthese verwendeten Gewebe nur verhältnismäßig wenig pilzliche Zellen vorliegen. Somit sind auch nur geringe Mengen an cDNA des Pilzes in der cDNA-Bank vorhanden, wodurch diese erheblich schwieriger zu finden sind. Aus diesem Grund, und da das Protein Nt1 durch in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht mehr als Effektorprotein in Frage kommt, wurde auch die Analyse weiterer möglicher Nt1 Interaktionspartner eingestellt. Was mit diesem Ansatz überhaupt nicht gefunden werden kann, ist eine mögliche Interaktion von Zf1 mit RNA, wobei es sich aber ebenfalls um eine laut Literatur vorhandene Möglichkeit handelt. Um solch eine Interaktion zu finden, könnten die oben schon beschriebenen Methoden angewendet werden. Natürlich sind dies nicht die einzigen Erklärungen für das negative Ergebnis. So gibt es mehrere typische Begründungen für einen nicht funktionierenden *yeast two hybrid*, wie eine nicht korrekte Faltung des Fusionsproteins im Zellkern der Hefen, für die Interaktion nicht geeignete Bedingungen im Zellkern oder noch weitere für die Interaktion notwendige Modifikationen oder Partnermoleküle, die in Hefe nicht vorkommen. Da eine hohe Anzahl von falsch positiven Klonen relativ häufig vorkommt, wäre es auch möglich, dass bei dem Test von weiteren Klonen irgendwann noch eine spezifische Interaktion gefunden würde. Dies war allerdings in dem zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Insgesamt erscheint es durch die oben beschriebenen, systembedingten Probleme mit sekretierten Interaktionspartnern als sinnvoll, zuerst die Lokalisierung von Zf1 nach der Sekretion aus den Hyphen im Wirtsgewebe weiter voranzutreiben.

6.6 Fazit und Ausblick

In den letzten Jahren wurde verstärktes Augenmerk auf die Erforschung des Einflusses von Effektoren auf die Interaktion von symbiontischen Pilzen mit Pflanzen gelegt. Dies hat dazu geführt, dass ein großer Fortschritt sowohl in der Anzahl bekannter Effektoren als auch in der Erkenntnis über ihre Funktionen gemacht wurde. Insgesamt wurde in dieser Arbeit mit vier Genen, welche für mutmaßliche Effektorproteine kodieren, gearbeitet. Sie waren innerhalb eines Microarray-Experiments zum Vergleich von Blatt und Wurzelinfektion als während der Wurzelinfektion verstärkt exprimiert gefunden worden.

Zusammenfassend konnte für Zf1 gezeigt werden, dass es während der Infektion sowohl von Blättern als auch in noch stärkerem Maße in Wurzeln stark exprimiert wird, nicht jedoch bei vegetativem Wachstum oder in Sporen. Es handelt sich um ein sekretiertes Protein, welches allerdings nicht in der Lage ist selbstständig wieder in Pflanzenzellen einzudringen, eine Fähigkeit, die schon für einige Effektoren gezeigt wurde. Ein Knockout des Proteins hat keinen erkennbaren Einfluss auf Infektionen von Reisblättern und Wurzeln, sowie auf die Appressorienbildung gezeigt. Eine durch *in silico* Untersuchungen vermutete Kernlokalisierung des Proteins liegt nicht vor. Damit kann die anfangs erhoffte Funktion als ein von dem Pilz sekretierter Transkriptionsfaktor zur Beeinflussung der Genexpression des Wirtes nicht bestätigt werden, eine Effektortätigkeit allgemein ist jedoch wahrscheinlich. Über die genaue Funktion des Proteins nach der Sekretion durch das Pathogen bzw. seine Angriffspunkte können allerdings nur Vermutungen angestellt werden. Anhand der gefundenen Proteindomänen handelt es sich um ein Protein, das vermutlich andere Proteine, eventuell Caspase-ähnliche Proteine der Hypersensitiv Response, möglicherweise aber auch RNA bindet. Ob es sich dabei um ein apoplastisch wirkendes Protein oder ein ins Cytoplasma der Pflanzenzelle eingeschleustes Protein handelt, konnte allerdings nicht endgültig geklärt werden. In einem zum Finden von Interaktionspartnern durchgeführten *yeast two hybrid* konnten leider nur falsch positive Interaktionspartner gefischt werden, weshalb die genaue Funktion des Proteins in weiteren Untersuchungen festgestellt werden muss.

Für Nt1 kann eine Effektorfunktion des Proteins jedoch durch die Ergebnisse dieser Arbeit ausgeschlossen werden. Ein Ausschalten dieses Proteins hat ebenfalls keinerlei erkennbare Konsequenz auf die Virulenz von *M. oryzae*. Eine Sekretion des Proteins erscheint durch die erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen, wodurch es sich bei diesem Protein lediglich um ein spezifisch während der Wurzelinfektion exprimiertes cytoplasmatisches Protein in *M. oryzae* handelt.

Da für Llr1 durch seine infektionsspezifische Expression, die Sekretion und die gefundene Domänenstruktur wahrscheinlich ist, dass es eine Effektorfunktion hat, wäre es sehr interessant zu sehen, ob ein Ausschalten dieses Proteins einen Phänotyp im Verlauf

der Infektion hat. Mögliche Alternativstrategien zu den in dieser Arbeit angewendeten wurden zuvor beschrieben. Auch eine Suche nach Interaktionspartnern erscheint vielversprechend. Für Nud1 sollte als erstes festgestellt werden, ob es sich dabei wirklich um ein sekretiertes Protein handelt, bevor es eventuell weiter untersucht wird.

Literaturverzeichnis

- Akiyama, K., Matsuzaki, K., and Hayashi, H. (2005).** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi, *Nature* **435**, 824- 827
- Anderson, I.C., and Cairney, J.W.G. (2007).** Ectomycorrhizal fungi: Exploring the mycelial frontier. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 388-406
- Andrade, M.A., Perez-Iratxeta, C. and Ponting, C.P. (2001).** Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.* **134 (2-3)**, 117-131
- Angata, T. and Varki, A. (2000).** Siglec-7: a sialic acid binding lectin of the immunoglobulin superfamily. *Glycobiology* **10 (4)**, 431-438
- Ardourel, M., Demont, M., Debellé, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J., Dénarié, J. and Truchet, G. (1994).** Rhizobium meliloti Lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**, 1357- 1374
- Bhadauria, V., Banniza, S., Vandenberg, A., Selvaraj, G. and Wei, Y. (2013).** Over-expression of a novel biotrophy-specific *Colletotrichum truncatum* effector, CtNUDIX, in hemibiotrophic fungal phytopathogens causes incompatibility with their host plants. *Eukaryot Cell* **12 (1)**, 2-11
- Birch, P.R.J., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Hein, I., Pritchard, L. and Whisson, S.C. (2008).** Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11 (4)**, 373-379
- Böhnert, H.U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. and Lebrun, M. (2004).** A putative polyketide synthase/Peptide Synthetase from Magnaporthe grisea signals pathogen attack to resistant rice. *Plant Cell* **16**, 2499-2513
- Bonneau, L., Ge, Y., Drury, G.E. and Gallois, P. (2008).** What happened to plant caspases? *J. Exp. Bot.* **59 (3)**, 491-499
- Brooks, S.A. and Rigby, W.F.C. (2000).** Characterisation of the mRNA ligands bound by the RNA binding protein hnRNP A2 utilizing a novel in vivo technique. *Nucleic Acids Res.* **28 (10)**, E49
- Campos- Soriano, L., García- Martínez, J. and San Segundo, B. (2012).** The arbuscular mycorrhizal symbiosis promotes the systemic induction of regulatory defence-related genes in rice leafes and confers resistance to pathogen infection. *Mol. Plant. Pathol.* **13 (6)**, 579- 592

- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Farma Penmetsa, V., Journet, E., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. and Dénarié, J. (2000).** Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**, 1647-1665
- Caracuel-Rios, Z. and Talbot, N.J. (2007).** Cellular differentiation and host invasion, by the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Curr opin microbiol* **10**, 339-345
- Chichkova, N.V., Kim, S., Titova, E.S., Kalkum, M., Morozov, V.S., Rubzov, Y.P., Kalinina, N.O., Taliansky, M.E. and Vartapetian, A.B. (2004).** A plant Caspase-like protease activated during the hypersensitive response. *Plant Cell* **16**, 157-171
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G. (2006).** The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465- 476
- Collins, T.J., Moerschbacher, B.M. and Read, N.D. (2001).** Synergistic induction of wheat stem rust appressoria by chemical and topographical signals. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **58**, 259-266
- Couch, B.C. and Kohn, L.M. (2002).** A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicates segregation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *Magnaporthe grisea*. *Mycologia* **94** (4), 683-693
- Crawford, M.S., Chumley, F.G., Weaver, C.G., and Valent, B. (1986).** Characterisation of the heterokaryotic and vegetative diploid phases of *Magnaporthe grisea*. *Genetics* **114**, 1111-1129
- Dagdas, Y.F., Yoshino, K., Dagdas, G., Ryder, L.S., Bielska, E., Steinberg, G. and Talbot, N.J. (2012).** Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Science* **336** (6088), 1590-1595
- Dam, T.K. and Brewer, C.F. (2010).** Lectins as pattern recognition molecules: The effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* **20** (3), 270-279
- Dangl, J.L. and Jones, J.D. (2001).** Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** (6839), 826-833
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E. and Birren, B.W. (2005).** The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature* **434**, 980-986

- de Jong, J.C., McCormack, B.J., Smirnov, N. and Talbot, N. (1997).** Glycerol generates turgor in rice blast. *Nature* **389** (6648), 244
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinja, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J. and Thomma, B.P.H.j. (2010).** Conserved fungal LysM Effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science* **329**, 953-955
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., Feussner, K., Meinicke, P., Stierhof, Y., Schwarz, H., Macek, B., Mann, M. and Kahmann, R. (2011).** Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* **478** (7369), 395- 398
- Dong, S., Yin, W., Kong, G., Yang, X., Qutob, D., Chen, Q., Kale, S., Sui, Y., Zhang, Z., Dou, D., Zheng, X., Gijzen, M., Tyler, B.M. and Wang, Y. (2011).** *Phytophthora sojae* avirulence effector Avr3a is a secreted NADH and ADP-ribose Pyrophosphorylase that modulates plant immunity. *PLoS Pathog.* **7** (11), e1002353
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X. and Tyler, B.M. (2008).** RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avrbl into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* **20** (7), 1930- 1947
- Dufresne, M., and Osbourn, A.E. (2001).** Definition of tissue-specific and general requirements for plant infection in a phytopathogenic fungus. *Mol. Plant Microbe Interact* **14**, 300-307
- Ebbole, D.J. (2007).** Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **45**, 437- 456
- El Gueddari, N.E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B.M. and Deising, H.B. (2002).** Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytol.* **156**, 103-112
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T. (1999).** Plants have sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18** (3), 265- 276
- Fox, A.H., Liew, C., Holmes, M., Kowalski, K., Mackay, J. and Crossley, M. (1999).** Transcriptional cofactors of the FOG family interact with GATA protein by means of multiple zinc fingers. *EMBO J.* **18** (10), 2812-2822
- Gage, D.J. (2004).** Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 280-300
- García-Garrido, J.M. and Ocampo, J.A. (2002).** Regulation of plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J. Exp. Bot.* **53** (373), 1377-1386

- Ge, X., Li, G., Wang, S., Zhu, H., Zhu, T., Wang, X. and Xia, Y. (2007).** AtNUDT7, a negative regulator of basal immunity in *Arabidopsis* modulates two distinct defense response pathways and is involved in maintaining redox homeostasis. *Plant Physiol.* **145**, 204-215
- Gelvin, S.B., (2009).** Agrobacterium in the genomics age. *Plant Physiol.* **150**, 1665-1676
- Genre, A., Chabaud, M., Timmers, T., Bonfante, P. and Barker, D.G. (2005).** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**, 3489- 3499
- Genre, A., Chabaud, M., Faccio, A., Barker, D.G. and Bonfante, P. (2008).** Prepenetration apparatus assembly presets and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*. *Plant Cell* **20**, 1407- 1420
- Genre, A., Ortu, G., Bertoldo, C., Martino, E. and Bonfante, P. (2009).** Biotic and abiotic stimulation of root epidermal cells reveals common and specific responses to arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* **149**, 1424-1434
- Glacebrook, J. (2005).** Contrasting mechanisms of defence against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**, 205-227
- Güimil, S., Chang, H., Zhu, T., Sesma, A., Osbourn, A., Roux, C., Ioannidis, V., Oakeley, E.J., Docquier, M., Descombes, P., Briggs, S.P. and Paszkowski, U. (2005).** Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (22), 8066- 8070
- Guether, M., Neuhäuser, B., Balestrini, R., Dynowski, M., Ludewig, U. and Bonfante, P. (2009).** A mycorrhizal-specific ammonium transporter from *Lotus japonicus* acquires nitrogen released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* **150**, 73-83
- Godfrey, D., Böhlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J. and Thordal-Christensen, H. (2010).** Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics* **11**, 317
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Göttfert, M., and Mendgen, K. (1997).** A putative amino acid transporter is specifically expressed in Haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **10** (4), 438-445
- Hall, T.M. (2005).** Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15** (3), 367-373
- Hamer, J.E., Howard, R.J., Chumley, F.G., and Valent, B. (1988).** A mechanism for surface attachment of spores in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Science* **239**, 288- 290

- Hamer, L., Adachi, K., Montenegro-Chamorro, M., Tanzer, M.M., Mahatny, S.K., Lo, C., Tarpay, R.W., Skalchunes, A.R., Heiniger, R.W., Frank, S.A., Darveaux, B.A., Lampe, D.J., Slater, T.M., Ramamurthy, L., DeZwaan, T.M., Nelson, G.H., Shuster, J.R., Woessner, J. and Hamer, J.E. (2001).** Gene discovery and gene function assignment in filamentous fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (9), 5110-5115
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R., and Liu, J. (2002).** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**, 2413- 2429
- Hassan, S. and Mathesius, U. (2012).** The role of flavonoids in root- rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant- microbe interactions. *J. Exp. Bot.* **63** (9), 3429-3444
- Heath, M.C. (2000).** Nonhost resistance and non-specific plant defence. *Curr. opin. plant biol.* **3**, 315-319
- Heath, M.C. (2001).** Nonhost resistance to plant pathogens: non- specific defence or the result of specific recognition events. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **58**, 53- 54
- Helber, N., Wippel, K., Sauer, N., Schaarschmidt, S., Hause, B. and Requena, N. (2011).** A versatile monosaccharide transporter that operates in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus* sp is crucial for the symbiotic relationship with plants. *Plant Cell* **23** (10), 3812- 3823
- Heupel, S., Roser, B., Kuhn, H., Lebrun, M.C., Villalba, F., and Requena, N. (2009).** Erh1 a novel ERA- like GTPase from *Magnaporthe oryzae* is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. *Mol. Plant Microbe Interact.*, (in press)
- Horton, T.R., and Bruns, T.D. (2001).** The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black box. *Mol. ecol.* **10**, 1855-1871
- Howard, R.J., Ferrari, M.A., Roach, D.H. and Money, N.P. (1991).** Penetration of hard substrates by a fungus employing enormous turgor pressures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11281-11284
- Howard, R.J., and Valent, B. (1998).** Infection related development in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 491-512
- Ivanov, S., Fedorova, E., and Bisseling, T. (2010),** Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Cur. Opin. Plant. Biol.* **13**, 372-377
- Itoh, M., Haga, I., Li, Q. and Fujisawa, J. (2002).** Identification of cellular mRNA targets for RNA-binding protein Sam68. *Nucleic Acids Res.* **30** (24), 5452-5464

- Itzen, A., Blankenfeldt, W. and Goody, R.S. (2011).** Adenylylation: renaissance of a forgotten post-translational modification. *Trends Biochem. Sci.* **36 (4)**, 221-228
- Javot, H., Varma Penmetsa, R., Terzaghi, N., Cook, D.R. and Harrison, M.J. (2007).** Amedicago truncatula phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104 (5)**, 1720-1725
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006).** The plant immune system. *nature* **444**, 323-329
- Joosten, M.H.A.J., Vogelsang, R., Cozijnsen, T., Verberne, M.C. and de Wit, P.J.G.M. (1997).** The biotrophic fungus *Cladosporium fulvum* circumvents Cf-4-mediated resistance by producing unstable AVR4 elicitors. *Plant Cell* **9**, 367-379
- Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. (2003).** RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16 (9)**, 769-776
- Kang, S., Sweigard, J.A. and Valent, B. (1995).** The PWL host specificity gene family in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8 (6)**, 939-948
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C.B., Shan, W. and Tyler, B.M. (2010).** External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* **142 (2)**, 284-295
- Kankanala, P., Czymmek, K., and Valent, B. (2007).** Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the rice blast fungus. *Plant Cell* **19**, 706- 724
- Kaku, H., Nishizawa, J., Ishii- Minami, N., Akimoto- Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. (2006).** Plant cells recognize chitin fragments for defense signalling through a plasma membrane receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **103 (29)**, 11086- 11091
- Keane, P., Kerr, A. and New, P. (1970).** Crown gal of stone fruit II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates. *Aust. Jnl. of Bio. Sci.* **23**, 585-596
- Keen, N.T. (1990).** Gene- for gene complementarity in plant- pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 447- 463
- Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M., and Voegelé R.T. (2005).** Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18 (11)**, 1130-1139

- Khang, C.H., Berruyer, R., Giraldo, M.C., Kankanala, P., Park, S., Czymmek, K., Kang, S., and Valent, B. (2010).** Translocation of Magnaporthe oryzae effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement. *Plant Cell* **22**, 1388-1403
- Kistner, C., Winzer, T., Pitzschke, A., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Judith Webb, K., Szczyglowski, K. and Parniske, M. (2005)** Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* **17**, 2217- 2229
- Kloppholz, S., Kuhn, H. and Requena, N. (2011).** A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* **21 (14)**, 1204-1209
- Klug, A. (2010).** The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome modulation. *Q. Rev. Biophys.* **43 (1)**, 1-21
- Koh, S., André, A., Edwards, H., Ehrhardt, D. and Sommerville, S. (2005).** *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infection. *Plant J.* **44**, 516- 529
- Kosuta, S., Chabaud, M., Loughon, G., Gough, C., Dénarié, J., Barker, D., G. and Becard, G. (2003).** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiotic specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **131**, 952-962
- Kosuta, S., Hazledine, S., Sun, J., Miwa, H., Morris, R., J., Downie, A. and Oldroyd, G.E.D. (2008).** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signalling pathways of legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105 (28)**, 9823-9828
- Kraszewska, E. (2008).** The plant nudix hydrolase family. *Acta Biochim. Pol.* **55 (4)**, 663-671
- Kuhn, H., Küster, H. and Requena, N. (2010).** Membrane steroid binding protein 1 induced by a diffusible signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* **185 (3)**, 716- 733
- Kuchta, K., Knizewski, L., Wyrwicz, L.S., Rychlewski, L. and Ginalska, K. (2009).** Comprehensive characterisation of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel protein families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res* **37 (22)**, 7701-7714
- Kvitko, B.H., Park, D.H., Velásquez, A.C., Wei, C., Russell, A.B., Martin, G.B., Schneider, D.J. and Collmer, A. (2009).** Deletions in the repertoire of *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC 3000 Type III secretion effector genes reveal functional overlap among effectors. *PloS Pathog* **5 (4)**, e1000388
- Laluk, K. and Mengiste, T. (2010).** Necrotroph attacks on plants: wanton destruction or convert extortion. *Arabidopsis Book*

- Lee, Y.H., and Dean, R.A. (1994).** Hydrophobicity of contact surface induces appressorium formation in *Magnaporthe grisea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **115**, 71- 76
- Lee, S., Kelley, B.S., Damasceno, C.M.B., John, B.S., Kim, B., Kim, B and Rose, J.K.C. (2006).** A functional screen to characterize the secretomes of eukaryotic pathogens and their hosts in planta. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19 (12)**, 1368-1377
- Liu, X.H., Lu, J.P., and Lin, F.C. (2007).** Autophagy during conidiation, conidial germination, and turgor generation in *Magnaporthe grisea*. *Autophagy* **3:5**, 472-473
- Liu, J., Maldonado- Mendoza, I., Lopez- Meyer, M., Cheung, F., Town, C.D. and Harrison, M.J. (2007).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* **50 (3)**, 529-544
- Liu, W., Liu, J., Ning, Y., Ding, B., Wang, X., Wang, Z. and Wang, G.L. (2013).** Recent progress in understanding PAMP-and effector-triggered immunity against the rice blast fungus *Maganporthe oryzae*. *Mol. Plant.* **6 (3)**, 605-620
- Lopez, M.J., Dietz, S., Grunze, N., Bloschies, J., Weiß, M., and Nehls, U. (2008).** The sugar porter gene family of *Laccaria bicolor*: function in ectomycorrhizal symbiosis and soil- growing hyphae. *New Phytol.* **180**, 365- 378
- Lord, C.E.N., Dauphinee, A.N., Watts, R.L. and Gunawardena, A.H.L.A.N. (2013).** Unveiling interactions among mitochondria, caspase like proteases, and the actin cytoskeleton during plant programmed cell death. *PLoS ONE* **8 (3)**, e57110
- Main, E.R.G., Jackson, S.E. and Regan, L. (2003).** The folding and design of repeat proteins: reseaching a consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 482-589
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech- Pages, V., Haouey, A., Gueunier, M., Cromer, L., Giraudet, D., Formey, D., Niebel, A., Andres Martinez, E., Driguez, H., Bécard, G. and Dénarié, J. (2011).** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* **469**, 58- 63
- Manner, J. and Gay, J.L. (1982).** Transport, translocation and metabolism of C- photosynthates at the host- parasite interface of *Pisum sativum* and *Erysiphe pisi*. *New Phytol.* **91**, 221-244
- Martoglio, B. and Dobberstein, B. (1998).** Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8**, 410-415
- Matthews, J..M. and Sunde, M. (2002).** Zinc fingers-folds for many occasions. *IUBMB Life* **54**, 351-355
- McLennan, A.G. (2005).** The nudix Hydrolase superfamily. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 123-143

- Mendgen, K., and Hahn, M. (2002).** Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends plant sci.* **7 (8)**, 352- 356
- Mentlak, T.A., Kombrink, A., Shinja, T., Ryder, L.S., Otomo, I., Saitoh, H., Terauchi, R., Nishizawa, Y., Shibuya, N., Thomma, B.P.H.J. and Talbot, N.J. (2012).** Effector- mediated suppression of chitin triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *Plant Cell* **24 (1)**, 322- 335
- Miller, J., Mclachlan, A.D. and Klug, A. (1985).** Repetitive zinc binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* **4 (6)**, 1609-1614
- Mims, C.W., Rodriguez- Lother, C. and Richardson, E.A. (2002).** Ultrastructure of the host- pathogen interface in daylily leaves infected with the rust fungus *Puccinia hemerocallidis*. *Protoplasma* **219**, 221- 226
- Moore, L., Warren, G. and Strobel, G. (1997).** Involvement of a plasmid in the hairy root disease in plants caused by *Agrobacterium rhizogenes*. *Plasmid* **2**, 617-626
- Mosquera, G., Giraldo, M.C., Khang, C.H., Coughlan, S., and Valent, B. (2009).** Interaction transkriptom analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS 1-4 as biotrophy associated secreted proteins in rice blast disease. *Plant Cell* **21**, 1273- 1290
- Müller, M.P., Peters, H., Blümer, J., Blankenfeld, W., Goody, R.S. and Itzen, A. (2010).** The Legionella effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* **329**, 946-949
- Münch, S., Lingner, U., Floss, D.S., Ludwig, N., Sauer, N. and Deising, H.B. (2008).** The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *J. Plant Physiol.* **165**, 41-51
- Nowara, D., Gay, A., Lacomme, C., Shaw, J., Ridout, C., Douchkov, D., Hensel, G., Kumlehn, J. and Schweizer, P. (2010).** HIGS: host-induced gene silencing in the obligate biotrophic fungal pathogen *Blumeria graminis*. *Plant Cell* **22**, 3130-3141
- O´Connel, R.J., and Panstruga, R. (2006).** Tête à tête inside a plant cell: establishing compatibility between plants and biotrophic fungi and oomycetes. *New Phytol.* **171**, 699- 718
- Oldroyd, G.E.,D., Murray, J.D., Poole, P., S. and Downie J.A. (2011).** The rules of engagement in legume- rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 119-144
- Olejnik, K., Bucholc, M., Anielska-Mazur, A., Lipko, A., Kujawa, M., Modzelan, M., Augustyn, A. and Kraszewska, E. (2011).** *Arabidopsis thaliana* nudix hydrolase AtNUDT7 forms complexes with the regulatory RACK1A protein and Ggamma subunits of the signal transducing heterotrimeric G protein. *Acta Biochim. Pol.* **58 (4)**, 609- 616

- Park, J.Y., Jianming, J., Lee, Y.W., Kang, S., and Lee, Y.H. (2009).** Rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) infects *Arabidopsis* via a mechanism distinct from that required for the infection of rice. *Plant Physiol.* **149**, 474- 486
- Pavletich, N.P. and Pabo, C.O. (1991).** Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2,1 Å. *Science* **252**, 809-817
- Peumans, W.J. and van Damme, E.J.M. (1995).** Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* **109**, 347-352
- Pfeffer P.E., Duods Jr., D.D., Becard, G. and Shachar- Hill, Y. (1999).** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* **120**, 587- 598
- Pryce- Jones, E., Carver, T. and Gurr, S.J. (1999).** The roles of cellular enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**, 175- 182
- Quandt, H.J., Pühler, A., and Broer, I. (1993).** Transgenic root nodules of *Vicin hirsuta*. A fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate- type nodules. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **6** (6), 699- 706
- Rafiqi, M., Gan, P.H.P., Ravensdale, M., Lawrence, G.J., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R. and Dodds, P.N. (2010).** Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* **22** (6), 2017-2032
- Rafiqi, M., Ellis, J.G., Ludovici, V.A., Hardham, A.R. and Dodds, P.N. (2012).** Challenges and progress towards understanding the role of effectors in plant-fungal interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**,477-482
- Rauscher, M., Mendgen, K. and Deising, H. (1994).** Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Exp. Mycol.* **19**, 26-34
- Requena, N., Serrano E., Ocón, A., and Breuninger, M. (2007).** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68**, 33-40
- Ribot, C., Césarie, S., Abidi, I., Chalvon, V., Bournaud, C., Vallet, J., Lebrun, M.H., Morel, J.B. and Kroj, T. (2012).** The *Magnaporthe oryzae* effector AVR1-CO39 is translocated into rice cells independently of a fungal-derived machinery. *Plant J.* **74** (1), 1-12
- Saitoh, H., Fujisawa, S., Mitsuoka, C., Ito, A., Hirabuchi, A., Ikeda, K., Irieda, H., Yoshino, K., Yoshida, K., Matsumura, H., Tosa, Y., Win, J., Kamoun, S., Takano, Y. and Terauchi, R. (2012).** Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identi-

fies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogen. *PLoS Pathog.* **8** (5)

Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R. (2003). Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **41**, 641- 667

Sesma, A., and Osbourn, A.E. (2004). The rice leaf blast undergoes developmental processes typical of root- infectin fungi. *Nature* **431**, 582- 586

Skamnioti, P., and Gurr, S.J. (2009). Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends Biotechnol.* **27** (3), 141- 150

Spaink, H.P. (1995), The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and outs of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**, 345- 368

Stadtman, E.R. (2001). The story of glutamine synthetase regulation. *J. Biol. Chem.* **276** (48), 44357-44364

Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W., and Walter, M.H. (2003). Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical and molecular aspects. *J. Chem. Ecol.* **29** (9), 1955- 1979

Stringer, M.A., Dean, R.A., Sewall, T.C. and Timberlake, W.E. (1991). Rodletless, a new *Aspergillus* developmental mutant induced by directed gene inactivation. *Genes Dev.* **5**, 1161-1171

Struck, C., Hahn, M. and Mendgen, K. (1996). Plasma membrane H⁺ ATPase activity in spores, germ tubes, and haustoria of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 30-35

Sweigard, J.A., Carroll, A.M., Kang, S., Farral, L., Chumley, F.G. and Valent, B. (1995). Identification, cloning and characterization of PWL2 a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *Plant Cell* **7**, 1221-1233

van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., Kijne, J.W. (1992). Induction of pre- infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo- oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**, 70-72

van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H.A., Vervoort, J. and de Wit, P.J.G.M. (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19** (12), 1420- 1430

van der Hoorn, R.A.L. and Kamoun, S. (2008). From guard to decoy: a model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* **20**, 2009- 2017

- van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J.G.M. and Thomma, B.P.H.J. (2007).** The chitin binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* **20** (9), 1092-1101
- van Kan, J.A.L. (2006).** Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci.* **11** (5), 247- 253
- van Schöll, L., Smits, M.M., and Hoffland E. (2006).** Ectomycorrhizal weathering of the soil minerals muscovite and hornblende. *New Phytol.* **171**, 805-814
- Veneault- Furrey, C., Barooah, M., Egan, M., Wakely, G., and Talbot, N.J. (2006).** Autophagic fungal cell death is necessary for infection in the rice blast fungus, *Science* **312**, 580- 583
- Verhagen, A.M., Coulson, E.J. and Vaux, D.L. (2001).** Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* **2** (7), 3009.1-3009.10
- Villalba, F., Collemare, J., Landraud, P., Lambou, K., Brozek, V., Cirer, B., Morin, D., Bruel, C., Beffa, R., Lebrun, M. (2008).** Improved gene targeting in *Magnaporthe grisea* by inactivation of MgKU80 required for non-homologous end joining. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 68-75
- Voegelé, R.T., Struck, C., Hahn, M., and Mendgen, K. (2001).** The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98** (14), 8133- 8138
- Voegelé, R.T. (2006).** *Uromyces fabae*: development, metabolism and interactions with its host *Vicia faba*. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**, 165- 173
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2003).** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* **33**, 949-956
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L. and Birch, P.R.J. (2007).** A translocation signal for delivery of oomycete effector protein in host plant cells. *Nature* **450** (7166), 115-118
- Worby, C.A., Mattoo, S., Kruger, R.P., Corbeil, L.B., Koller, A., Mendez, J.C., Zekarias, B., Lazar, C. and Dixon, J.E. (2009).** The Fic domain: A new paradigm for adenylylation. *Mol. Cell* **34** (1), 93
- Wu, S.C., Ham, K.S., Darvill A.G., and Albersheim, P. (1997).** Deletion of two endo- β -1,4- xylanase genes reveals additional isozymes secreted by the rice blast fungus. *Mol. Plant- Microbe Interact.* **10** (6), 700- 708
- Xu, Q. and Zhang, L. (2009).** Plant caspase-like proteases in plant programmed cell death. *Plant Signal. Behav.* **4** (9), 902-904

- Yaeno, T., Li, H., Chaparro- Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S. and Shirasu, K. (2011).** Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (35), 14682-14687
- Yarborough, M.L., Li, Y., Kinch, L.N., Grishin, N.V., Ball, H.L. and Orth, K. (2009).** AMPylation of the Rho GTPases by *Vibrio* Vops disrupts effector binding and downstream signalling. *Science* **323**, 269-272
- Yi, M., Chi, M., Khang, C.H., Park, S., Kang, S., Valent, B. and Lee, Y. (2009).** The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* **21**, 681-695
- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. and Bartel, D.P. (2000).** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**, 25-33
- Zhang, Y., Lubberstedt, T. and Xu, M. (2012).** The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. *J. Genet. Genomics* **40** (1), 23-35
- Zellerhof, N., Jarosch, B., Groenewald, J.Z., Crous, P.W. and Schaffrath, U. (2006).** Nonhost resistance of barley is successfully manifested against *Magnaporthe grisea* and closely related *Pennisetum*-infection lineage but is overcome by *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19** (9), 1014-1022
- Zipfel, C. (2008).** Pattern- recognition receptors in plant innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 10-16

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich und inhaltlich übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht. Weiter versichere ich die Satzung des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis befolgt zu haben.

Karlsruhe, den 05.06.2013

Raphael Kist

Danksagung

Insbesondere möchte ich mich bei Natalia Requena für die Möglichkeit diese Arbeit durchzuführen und ihre große Unterstützung im Verlauf derselben bedanken.

Mein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Peter Nick für die Übernahme der Aufgabe des Korreferenten für diese Arbeit.

Bei allen Mitgliedern der Mycorrhizagruppe bedanke ich mich besonders für ihre jederzeit gewährte Unterstützung, ihre Hilfsbereitschaft sowie für das geschaffene sehr gute Arbeitsklima. Im Besonderen danke ich Stephanie Heupel für ihre Bereitschaft mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich die ganze Zeit in jeder Hinsicht voll unterstütz haben und mir so ermöglichten meinen Weg zu gehen!

Lebenslauf

Dipl.-Biol. Raphael Kist.

Persönliche Informationen

Familienstand: ledig

Nationalität: deutsch

Alter: 34 (15.06.1978)

Geburtsort: Bühl

beruflicher und wissenschaftlicher Werdegang

08/1989-06/1998

Schule

Windeck- Gymnasium Bühl

Allgemeine Hochschulreife, Note 2,9

09/1998-09/1999

Zivildienst

09/2000-01/2003

Studium

Fachhochschule Offenburg

Studiengang Verfahrens- und Umwelttechnik

vorzeitig beendet

09/2003-12/2009

Studium

Universität Karlsruhe (TH)

Studiengang Biologie, Diplom

Hauptfach: Mikrobiologie

Nebenfächer: Zoologie, Ingenieurbiologie

Diplomarbeit

Institut für Botanik, Pflanzen-Mikroben Interaktionen

Thema: Identifizierung von für die Wurzelinfektion
von *Oryza sativa* durch *Magnaporthe oryzae*
essentiellen Genen

Abschluss: Dipl.-Biol. Note: 1,3

seit 01/2010

Promotion

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Institut für Botanik, molekulare Phytopathologie

Thema: Deletion und Charakterisierung von im
Verlauf der Wurzelinfektion von *Oryza sativa*
durch *Magnaporthe oryzae* exprimierten
po tenziellen Effektorproteinen

Konferenzteilnahmen

03/2011

26th Fungal Genetics Conference, Asilomar (USA)

Posterpräsentation

Kist, R., Heupel, H., Andresen, K., Thines, E., Requena, R.The way to the root in *Magnaporthe oryzae* plant interaction

04/2011

VAAM Jahrestagung 2011, Karlsruhe

Posterpräsentation

Kist, R., Heupel, H., Andresen, K., Thines, E., Requena, R.Colonisation of the host plant root by *Magnaporthe oryzae*